

# PARTICULARITĂȚILE DEPISTĂRII ȘI DIAGNOSTICĂRII PUTREGAIULUI INELAR AL TUBERCULILOR DE CARTOF (*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SP. SEPEDONICUS*) LA CARTOFUL SEMINCER IMPORTAT

Valentina IORDOSOPOL

Departamentul Horticultură și Silvicultură, sp. 0811. 5 – Protecția plantelor, Facultatea de Științe Agricole Silvice și ale Mediului, Universitatea Tehnică a Moldovei, or. Chișinău.

Autorul corespondent: Sergiu Panuța, [sergiu.panuta@spp.utm.md](mailto:sergiu.panuta@spp.utm.md)

Coordonator științific: Sergiu PANUȚA, dr., conf. univ., FȘASM, UTM

**Rezumat.** Acest articol reflectă datele referitoare la depistarea și diagnosticarea putregaiului inelar al tuberculilor de cartof (*Clavibacter michiganensis sp. sepedonicus*) la cartoful semincer importat. Respectiv, articolul dat include date referitor la numărul de probe (loturi) diagnosticate cu putregaiul inelar al tuberculilor de cartof (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), pe parcursul anilor 2020-2023, cât și referitor la metodele de depistare al acestui agent patogen, în condiții de laborator (imunofluorescență, creșterea pe mediu de cultură, testele de patogenitate și testele biochimice).

**Cuvinte cheie:** Cartof, *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, import, imunofluorescență, mediu de cultură, teste de patogenitate, teste biochimice.

## Introducere.

*Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus* - a fost semnalat pentru prima dată în 1914 de către Spieckermann și Kotthoff, iar despre arealul de răspândire pot menționa că boala în cauză este destul de des depistată luând în considerație faptul că este o boală de carantină fitosanitară, conform hotărârii de guvern nr. 558 din 22-07-2011, privind măsurile de urgență din domeniul fitosanitar pentru a preveni introducerea și răspândirea în Republica Moldova a unor organisme de carantină.

În prezent în unele țări din Europa precum: Belarus, Bulgaria, Germania, Grecia, Danemarca, Letonia, Lituania, Norvegia, Polonia, Rusia, România, Slovacia, Turcia, Ucraina, Finlanda, Cehia, Suedia, Estonia. În Asia: Kazahstan, China, Coreea, Nepal, Pakistan, Taiwan, Uzbekistan, Japonia. Pe continentul African a fost depista în Algeria, iar în America de Nord a fost depistat în S.U.A. și Canada.

Referitor la importanța economică pot menționa că boala produce o diminuare cantitativă și calitativă a recoltei. Producția de cartofi poate să scadă mai mult din cauza golurilor pe care boala le produce în cultură și a recoltei slabe a plantelor atacate. Tuberculii atacați nu vor fi folosiți la plantat, iar capacitatea de păstrare peste iarnă este mult mai scăzută, datorită suprainfecțiilor cu paraziți și saprofiti secundari care desăvârșesc putrezirea.

## Biologia și ecologia bolii.

**Patografia bolii** - în cazul unui material de înmulțire infectat se constată, că în unele cuiburi plantele nu răsar sau răsar mai târziu, având lăstari subțiri cu frunze mici, încrețite sau răsucite ușor de-a lungul nervurii mediane, uneori de culoare verde-gălbuie. Plantele bolnave vegetează slab, se ofilesc, sunt clorozate. Seceta grăbește evoluția bolii. Plantele atacate formează tuberculi cu putregaiul inelar, astfel încât numărul de tuberculi cu simptome de boală este proporțional cu numărul lăstarilor atacați.

**Simptome** - spațiile interne ale frunzelor devin de la verde deschis până la galben pal apoi frunzele încep apoi să se ofilească și se rulează ușor la margini.

Pe măsură ce boala progresează, frunzele devin necrotice, începând de la margini, Frunzele infectate sunt adesea reduse în dimensiune și plantele sunt ocazional pipernicite sau chiar pot muri în cele din urmă.

**Agentul fitopatogen** - *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Această bacterie are forma de bastonașe de 0,6-1,4×0.3-0.6 μm, atrihe la un capăt polar prezentând uneori câteva umflături, de asemenea este o bacterie Gram-pozitivă - care reține colorația violetului de gențiană în urma metodei de colorație Gram, perete celular mai gros, compus din mai multe straturi de peptidoglican. Gram-pozitive sunt mai sensibile la acțiunea antibioticelor. Pe mediu de cultură coloniile de *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* sunt mucilaginoase, albe translucide. Celulele sunt pleomorfe predominând cele solitare aranjate palisadic.

**Epidemiologie** - bacteriile se transmit de la un an la altul prin tuberculi și resturi vegetale. În sol, boala pierde datorită antagonistului microbial. În perioada plantării, bacteriile se propagă de la un tubercul la altul cu ocazia secționării acestora în timpul manipulării. Contaminarea se realizează în mare măsură și toamna la recoltare, când tuberculii sănătoși vin în contact cu tuberculii bolnavi. Toamnele ploioase facilitează infecția deoarece în aceste condiții, tuberculii se maturizează încet și cu coaja insuficient suberificată, umiditatea condiționează dezvoltarea bacteriei

**Patogeneza** - bacteria pătrunde prin răni și circulă prin vase până la frunze și tuberculi, unde se înmulțește, putând obtura lumenul vaselor. Patogenul hidrolizează amidonul din tuberculi, provocând putrezirea moale a pulpei, suberul rămânând însă intact. Boala este favorizată de reacția acidă a solului, îngrășămintele potasice măresc rezistența plantelor. Temperatura optimă a solului pentru dezvoltarea bolii este de 19-28°C. La temperaturi mai mari dezvoltarea bolii este oprită.

#### Material și metode de cercetare

Însuși cercetarea constă în monitorizarea locală, a importului, exportului și reexportului a tubercuilor prin depistarea agentului patogen *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* în condiții de laborator. Conform E.P.P.O. PM 7/59(2), standardul de depistare a *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, pentru ca o probă să se considere pozitivă trebuie să efectuăm 4 analize de bază.

1. Imunofluorescența.
2. Creșterea bacteriei pe mediul de cultură.
3. Test de patogenitate.
4. Test biochimic.

Imunofluorescența (IF) este o tehnică de laborator pentru vizualizarea prin microscopie în ultraviolet a antigenilor sau anticorpilor localizați în celule sau țesuturi cu ajutorul anticorpilor fluorescenți. Imunofluorescența utilizează anticorpii marcați cu un compus fluorescent (izotiocianat de fluoresceină, sulfat de rodamină) numit fluorocrom, iar preparatul microscopic după ce a fost tratat cu anticorpi fluorescenți este examinat la microscop în lumină ultravioletă.

Imunofluorescența prezintă o valoare mare diagnostică, fiind mai ieftină comparativ cu alte procedee.

Creșterea bacteriei pe mediu nutritiv - Determinarea speciei de *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* la izolare se vor folosi mediile Snieszko și Bonde, D2, GYCA, King B și YPGA, care se vor incuba la 22-25°C cel puțin 5 zile. Coloniile sunt mucilaginoase, albe translucide. Celulele sunt pleomorfe predominând cele solitare aranjate palisadic.

Testul de patogenitate(Inoculările artificiale) - s-a efectuat inocularea artificială a probei(maceratului analizat),a martorului pozitiv și a martorului negativ (apa). Prin observație și comparație se determină capacitatea probei analizate de a ataca planta.

Teste biochimice reprezintă examinarea caracterelor biochimice de cultură ale unui microorganism s-au efectuat prin evidențierea echipamentului enzimatic și a particularităților sale metabolice. Testele biochimice sunt standardizate și se efectuează numai pe culturi pure. În cadrul testului biochimic s-a analizează următoarele reacții: producerea catalazei, testul producerii oxidazei, reducerea nitratului, testul indolului, hidroliza, ereea etc.

### Rezultatele cercetării

Înșuși experiența noastră a constat în depistarea *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*, iar conform planului de monitorizare inițial depistarea s-a efectuat printr-un test de imunofluorescență directă, iar ulterior s-a mai adăugat un test P.C.R.

Extractia bacteriilor *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* din tuberculi de cartof se efectuează în următorul mod cu ajutorul unui bisturiu sau al unui cuțit curat și dezinfectat corespunzător, se decojește fiecare tubercul la nivelul hilului până la apariția țesutului vascular. Se decupează ușor de la nivelul hilului un con de țesut vascular, evitându-se pe cât posibil prelevarea de țesut parenchimatic. Conurile se prelevează în flacoane de unică folosință, în care se adaugă un volum suficient de tampon de macerare (aproximativ 40 ml) astfel încât să acopere conurile. Fiecare flacon va conține aproximativ 200 conuri (o proba conține 200 de tuberculi). Conurile prelevate se macerează prin agitare (50 - 100 rpm), timp de 4 ore, la o temperatură mai mică de 24°C. După macerare, extractul de cartof se centrifughează. Se îndepărtează supernatantul fără a deranja depozitul. Se resuspendă peletul (sedimentul) în 1,5 mL tampon de sedimentare.

Etapele testului de imunofluorescență. Prepararea lamelor martor, pentru fiecare serie de analize se pregătesc două lame martor distincte (negativ și pozitiv) în scopul verificării procedurii analitice. Pentru a evita contaminarea, probele și lamele martor pozitiv sunt pregătite separate. Pe lamă se notează codul probei și se marchează cu ajutorul unui marker bacteria analizată. Se pipetează un volum standard de 20 μL extract pe o lamă cu godeuri de 6 mm diametru. Se realizează diluții ale probei (1/10, 1/100, 1/1000) pentru ambele bacterii patogene. Lamele se usucă la temperatura mediului ambiant sau prin încălzire la temperaturi cuprinse între 18-25°C, într-un incubator sau placa digitală (≤ 45°C). După uscare celulele bacteriene se fixează prin adăugarea unui volum de aproximativ 10 μL alcool etilic 96% în fiecare godeu, prin flambare sau prin încălzire la temperatura de 60°C, timp de 15 minute.

Tabelul 1

**Monitorizarea importului de cartofi (tuberculi)  
*Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus*, anul 2020**

| Nr. ord | Luna /2020 | Numărul probelor pozitive | Organismul Nociv                                    |
|---------|------------|---------------------------|---|
| 1.      | Ianuarie   | 208                       | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 2.      | Februarie  | 236                       | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 3.      | Mart       | 245                       | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 4.      | Aprilie    | 150                       | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 5.      | Mai        | 15                        | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 6.      | Iunie      | 2                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 7.      | Iulie      | 0                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 8.      | August     | 0                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 9.      | Septembrie | 1                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 10.     | Octombrie  | 0                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 11.     | Noiembrie  | 1                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| 12.     | Decembrie  | 1                         | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |

Astfel în urma cercetărilor efectuate în anul 2020, din loturile de cartof verificate 90% au fost diagnosticate pozitiv cu *Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus*. Deși boala nu este periculoasă în alimentație, odată ajunsă în sol poate afecta ani la rând toată cultura. Acest lucru a determinat Agenția pentru Siguranța Alimentelor de a impune o perioadă de supraveghere a importului, timp de 3 luni, perioadă în care au fost prelevate 621 de probe din care, doar în 58 de probe, nu a fost depistată bacteria ce provoacă putregaiul inelar al cartofului.

Tabelul 2

**Monitorizarea importului de cartofi (tuberculi)  
*Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus*, anii 2021-2022**

| Luna /2021 | Organismul Nociv                                 | Numărul probelor pozitive | Luna /2021 | Organismul Nociv                                 | Numărul probelor pozitive |
|------------|--|---------------------------|------------|--|---------------------------|
| Ianuarie   | <i>Clavibacter michiganensis sp. sepedonicus</i> | 0                         | Ianuarie   | <i>Clavibacter michiganensis sp. sepedonicus</i> | 0                         |
| Februarie  |  | 0                         | Februarie  |  | 2                         |
| Mart       |  | 1                         | Mart       |  | 0                         |
| Aprilie    |  | 0                         | Aprilie    |  | 0                         |
| Mai        |  | 1                         | Mai        |  | 0                         |
| Iunie      |  | 0                         | Iunie      |  | 0                         |
| Iulie      |  | 0                         | Iulie      |  | 2                         |
| August     |  | 0                         | August     |  | 2                         |
| Septembrie |  | 0                         | Septembrie |  | 0                         |
| Octombrie  |  | 0                         | Octombrie  |  | 0                         |
| Noiembrie  |  | 0                         | Noiembrie  |  | 0                         |
| Decembrie  |  | 2                         | Decembrie  |  | 0                         |

În urma urmăririlor efectuate pe parcursul anilor 2021-2022 și a datelor obținute putem observa că rata probelor pozitive a scăzut considerabil de la 90% la 1-2%. Fapt datorat stării de carantină COVID-19, care a avut ca efect stoparea importului inclusiv și a celui de cartof. De asemenea un factor suficient de important a fost războiul din Ucraina carea și-a spus cuvântul decisiv în importul cartofului din țările C.S.I., Ucraina, Belarus și Rusia. Țări din care se importa cea mai mare cantitate de material infestat.

Tabelul 3

**Monitorizarea importului de cartofi (tuberculi)  
*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* (Ianuarie, 2023)**

| Nr. ord. | Numărul Probei | Organismul nociv                                 | Numărul de tuberculi | Rezultatul |
|----------|----------------|--|----------------------|------------|
| 1.       | 0001/1         | <i>Clavibacter michiganensis sp. sepedonicus</i> | 126                  | Negativ    |
| 2.       | 0002/1         | <i>Ralstonia solonacearum</i>                    | 26                   | Negativ    |
| 3.       | 0003/1         | <i>Ralstonia solonacearum</i>                    | 34                   | Negativ    |
| 4.       | 0004/1         | <i>Clavibacter michiganensis sp. sepedonicus</i> | 148                  | Negativ    |
| 5.       | 0005/1         | <i>Ralstonia solonacearum</i>                    | 21                   | Negativ    |
| 6.       | 0006/1         | <i>Ralstonia solonacearum</i>                    | 20                   | Negativ    |

În anul 2023, în planul de monitorizare a tubercuilor de cartofi s-a introdus un nou agent patogen, *Ralstonia Solonacearum*. Aceast control s-a efectuat simultan, pentru a primi pe piața internă un material semincier, cât și un cartof de consum alimentar de o calitate mai superioară.

Tabelul 4

**Monitorizarea importului de cartofi (tuberculi)  
*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, februarie 2023**

| Nr. ord | Numărul Probei (Echivalent) | Organismul solicitat | Numărul de tuberculi | Rezultatul    |
|---------|-----------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| 1.      | 0007/1                      | <i>C.m.s./R.S</i>    | 188                  | Pozitiv/R.S.  |
| 2.      | 0008/1                      | <i>C.m.s</i>         | 215                  | Negativ       |
| 3.      | 0009/1                      | <i>C.m.s/ R.S.</i>   | 86                   | Negativ       |
| 4.      | 0010/1                      | <i>C.m.s /R.S.</i>   | 64                   | Negativ       |
| 5.      | 0011/1                      | <i>C.m.s /R.S.</i>   | 89                   | Pozitiv/C.m.s |
| 6.      | 0012/1                      | <i>C.m.s /R.S.</i>   | 178                  | Negativ       |
| 7.      | 0013/1                      | <i>C.m.s</i>         | 190                  | Negativ       |
| 8.      | 0014/1                      | <i>C.m.s</i>         | 69                   | Pozitiv/C.m.s |
| 9.      | 0015/1                      | <i>C.m.s /R.S.</i>   | 87                   | Negativ       |
| 10.     | 0016/1                      | <i>C.m.s /R.S.</i>   | 153                  | Negativ       |
| 11.     | 0017/1                      | <i>C.m.s</i>         | 192                  | Negativ       |
| 12.     | 0018/1                      | <i>C.m.s /R.S.</i>   | 197                  | Pozitiv/C.m.s |
| 13.     | 0019/1                      | <i>R.S</i>           | 178                  | Negativ       |
| 14.     | 0020/1                      | <i>R.S.</i>          | 96                   | Negativ       |
| 15.     | 0021/1                      | <i>R.S</i>           | 187                  | Negativ       |
| 16.     | 0022/1                      | <i>R.S.</i>          | 51                   | Negativ       |
| 17.     | 0023/1                      | <i>C.m.s</i>         | 183                  | Pozitiv/C.m.s |
| 18.     | 0024/1                      | <i>C.m.s</i>         | 199                  | Negativ       |
| 19.     | 0025/1                      | <i>R.S.</i>          | 32                   | Negativ       |
| 20.     | 0026/1                      | <i>R.S.</i>          | 54                   | Negativ       |
| 21.     | 0027/1                      | <i>C.m.s</i>         | 156                  | Negativ       |
| 22.     | 0028/1                      | <i>C.m.s</i>         | 158                  | Pozitiv/C.m.s |
| 23.     | 0029/1                      | <i>C.m.s</i>         | 24                   | Negativ       |
| 24.     | 0030/1                      | <i>R.S.</i>          | 45                   | Negativ       |
| 25.     | 0031/1                      | <i>R.S.</i>          | 65                   | Pozitiv/R.S.  |
| 26.     | 0032/1                      | <i>R.S.</i>          | 32                   | Negativ       |
| 27.     | 0033/1                      | <i>R.S.</i>          | 41                   | Negativ       |
| 28.     | 0034/1                      | <i>R.S.</i>          | 35                   | Negativ       |
| 29.     | 0035/1                      | <i>R.S.</i>          | 38                   | Pozitiv/R.S.  |
| 30.     | 0036/1                      | <i>R.S.</i>          | 71                   | Negativ       |

**Concluzii**

1. Pe parcursul anului 2020 în cadrul monitorizării locale, importului/exportului și reexportului sau depistat 859 de probe pozitive *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, prin imunofluorescență directă, iar probele infestate dominând importului din țările C.S.I., Belarus, Ucraina și Rusia.
2. Pe parcursul anului 2021 sau depistat doar 4 probe pozitive prin imunofluorescență directă și un test PCR.
3. În anul 2022 sau depistat doar 6 probe pozitive prin imunofluorescență directă și un test PCR
4. În primele luni al anului 2023 în sau depista 4 probe pozitive *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus* prin imunofluorescență directă și un test PCR și 4 probe pozitive *Ralstonia solonacearum* prin imunofluorescență directă.

### Referințe

1. BĂDĂRĂU S. *Fitopatologie (generală și agricolă)*, Chișinău 2012.
2. BOTOMAN Gh. *Bolile și daunatorii cartofului*, 2021.
3. LELLIOTT, R. A. and D. STEAD. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Wiley -Blackwell, 1987.
4. HG189/2010 din 17.03.2010 cu privire la aprobarea cerințelor minime de comercializare pentru cartofii de sămânță.  
[https://www.legis.md/cautare/getResults?doc\\_id=22469&lang=ro](https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=22469&lang=ro)
5. GUVERNUL HOTĂRÂRE Nr. 558 din 22-07-2011 privind măsurile de urgență din domeniul fitosanitar pentru a preveni introducerea și răspândirea în Republica Moldova a unor organisme dăunătoare plantelor, produselor vegetale și altor bunuri conexe supuse regimului de carantină fitosanitară.  
[https://www.legis.md/cautare/getResults?doc\\_id=103256&lang=ro](https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=103256&lang=ro)
6. PM 7/59 (2) *Clavibacter sepedonicus*  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/epp.12755>
7. Bacterial ring rot of potato caused by *Clavibacter sepedonicus*: A successful example of defeating the enemy under international regulations.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9190974/>
8. *Clavibacter sepedonicus* (potato ring rot).  
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.15343>