

REZUMAT

Cuvinte cheie: vița de vie, fenofaze, tratamente fitosanitare, izolare levuri, analiză morfologică, colonii, identificare taxonomică, secvențiere ADN

În practica oenologică veriga de bază o reprezintă calitatea procesului fermentativ ce asigură obținerea vinurilor de clasă superioară care reflectă personalitatea și tipicitatea arealului viticol. Studiarea levurilor indigene și implicit utilizarea acestora în tehnologie reprezintă o permanentă preocupare în domeniul cercetării. Însă pentru a putea discuta despre calitatea procesului fermentativ și a levurilor din flora spontană se consideră necesară studierea factorilor externi asupra diversității și distribuției microbiotei levurice în cadrul plantațiilor viticole.

Teza de doctorat cu tema „*Studii privind influența tratamentelor fitosanitare asupra diversității și distribuției levurilor în condițiile Centrului viticol Iași*” cuprinde rezultatele activității de cercetare realizată în perioada 2021-2022.

Experiența a fost realizată în cadrul Stațiunii Didactice – Ferma „Vasile Adamachi” Iași. Majoritatea analizelor au fost efectuate în laboratorul de Fitopatologie a Facultății de Agricultură, din cadrul Universității de Științele Vieții „Ion Ionescu de la Brad”, Iași, iar identificarea taxonomică a tulpinilor de levuri izolate s-a realizat în cadrul Laboratorului *BMR Genomics* din Padova, Italia, laborator specializat în secvențierea ADN.

Scopul prezentei teze de doctorat constă în stabilirea influenței tratamentelor fitosanitare asupra diversității și distribuției levurilor în condițiile centrului viticol Iași. Studiarea diversității și distribuției levurilor în domeniul vitivinicol se află în tendințele de cercetare științifică, atât la nivel național cât și internațional.

Pentru a răspunde scopului propus s-au stabilit următoarele obiective:

- aplicarea tratamentelor fitosanitare la cultura viței de vie conform calendarului corelat cu fenofazele de dezvoltare a plantelor;
- izolarea și selecționarea sușelor levuriene prelevate din sol și plantă în diferite faze de dezvoltare a plantelor;
- stabilirea influenței factorilor experimentali asupra diversității și distribuției levurilor în arealul viticol studiat;
- stabilirea particularităților morfologice și fiziologice a tulpinilor de levuri izolate;
- identificarea taxonomică a levurilor selecționate prin metode de extracție și secvențiere ADN (Metoda PCR).

Pentru atingerea obiectivelor propuse în cadrul prezentei teze, activitatea de cercetare a fost organizată pe trei direcții:

- aplicarea tratamentelor fitosanitare conform tratamentului în funcție de fenofaza de dezvoltare a plantei.
- prelevarea probelor de sol și plantă în fenofaze și adâncimi ale solului diferite.
- caracterizarea sușelor levuriene izolate din sol și de pe plante la nivel de laborator în vederea caracterizării morfologice și taxonomice a acestora.

Pentru realizarea activității de cercetare s-au ales soiurile Fetească Neagră, Fetească Albă, Busuioacă de Bohotin și Fetească Neagră din cadrul colecției ampelografice a Fermei „Vasile Adamachi” Iași. Alegerea soiurilor luate în studiu s-a realizat în vederea măririi diversității studiului și în baza răspândirii destul de largă a acestora în podgoriile României.

Factorii experimentali luați în studiu au fost:

○ Factorul A: soiul de struguri, cu 4 graduări:

a₁ – Fetească Albă;

a₂ – Busuioacă de Bohotin;

a₃ – Fetească Neagră;

a₄ – Fetească Neagră colecție;

○ Factorul B: sursa levurilor, cu 2 graduări:

b₁ – boabe/plantă; b₂ – sol

○ Factorul C: fenofaza de prelevare a levurilor, cu 3 graduări:

c₁ – lăstar 5-7 cm;

c₂ – finalul înfloritului;

c₃ – maturitate deplină

Probele din sol și plante au fost prelevate în trei fenofaze diferite de dezvoltare, după cum urmează: lăstar 5-7 cm, finalul înfloritului și maturitate deplină. Aceste fenofaze au fost alese prin prisma importanței lor în planul aplicării tratamentelor cât și în procesul dinamicii încărcăturii levuriene.

În vederea analizei pe verticală a microbiotei solului, prelevările au mers pe 3 adâncimi: 5-10 cm, 10-15 cm, 15-20 cm.

În vederea stabilirii influenței tratamentelor fitosanitare asupra diversității și distribuției levurilor s-au realizat în fenofaza de lăstar 5-7 cm două prelevări de sol la diferență de 10 zile astfel:

✚ o serie de probe prelevate cu 3 zile înainte de tratamentul cu produsul comercial Dithane® M-45 în doză de 0,2% (2021) și Acrobat® MZ 69 WG în doză de 0,22% (2022) ce prezintă acțiune asupra agenților patogeni *Plasmopara viticola* și *Botrytis cinerea* ce provoacă Mana și Putregaiul cenușiu al viței de vie.

Trebuie precizat faptul că atât Dithane® M-45 cât și Acrobat® MZ 69 WG conțin ca substanță activă 60-80% mancozeb.

✚ a doua prelevare de probe după 7 zile de la tratamentul împotriva Manei și Putregaiului cenușiu.

Ulterior s-au mai realizat alte două prelevări, de data aceasta și din sol și de pe plantă, la finalul înfloritului și la maturitatea deplină.

În vederea izolării levurilor caracteristice arealului viticol probele prelevate în cele trei fenofaze au fost prelucrate conform metodologiei standard și a protocolului experimental rezultând astfel ca surse de izolare:

- sol curățat de impurități și mojarat
- apa de spălare a inflorescențelor (la finalul înfloritului)
- apa de spălare a bachelor (la maturitatea deplină).

În cei doi ani de studiu din sol s-au izolat 18 sușe din sol, din apa de spălare a inflorescențelor au rezultat 5 sușe iar din apa de spălare a strugurilor au fost selecționate 11 sușe.

Atât în anul 2021 cât și în 2022 sușele izolate au fost analizate din punct de vedere macro- și microscopic stabilindu-se caracteristicile specifice ale coloniilor (forma, profilul, suprafața și culoarea) respectiv aspectul celulelor la microscop.

În etapa următoare sușele izolate și analizate morfologic au fost identificate taxonomic prin secvențiere ADN. În urma prelucrării genomice s-au identificat șase tulpini de levuri ce au prezentat diversitate atât din punct de vedere al soiurilor de struguri din care au fost prelevate cât și din punct de vedere al sursei, a fenofazei și al anului izolării.

Din punct de vedere structural, teza de doctorat cuprinde 177 pagini, 53 de figuri și 27 de tabele.

Prima parte, „Stadiul actual al cercetărilor” cuprinde 4 capitole, însumând 53 de pagini, ce relatează istoricul viței de vie, importanța, sistematica și ecologia plantațiilor viticole, situația culturii viței de vie pe plan mondial și național și nu în ultimul rând importanța și taxonomia levurilor în sectorul vitivinicol.

A doua parte, „Contribuții proprii” este structurată în 5 capitole însumând 124 pagini. În această parte se evidențiază informații privind cadrul natural în care s-a desfășurat activitatea de cercetare, scopul și obiectivele propuse în cadrul tezei, materialul și metodele de cercetare folosite, rezultate privind observațiile fenologice și măsurătorile biometrice realizate în câmp, rezultate privind analizele cantitative și calitative ale sușelor izolat, identificarea taxonomică tulpinilor selecționate precum și analiza filogenetică a acestora.

În **primul capitol** este prezentată pe scurt istoria viței de vie, atât la nivel național cât și internațional.

Capitolul al doilea prezintă sistematica viței de vie, importanța acesteia și ecologia plantei. În acest capitol sunt descrise pe scurt modalitățile de clasificare a soiurilor și cerințele viței de vie în vederea adaptabilității în diferite areale viticole.

Al treilea capitol prezintă situația viței de vie în ultimii 21 de ani atât la nivel mondial cât și european și național.

În **al patrulea capitol** sunt prezentate aspecte privind importanța levurilor în sectorul vitivinicol, taxonomia levurilor oenologice, prezentarea caracteristicilor genomice ale levurilor întâlnite în vinificație. De asemenea sunt descrise aspecte despre metabolismul levurian.

În **al cincilea capitol** se realizează descrierea cadrului natural în care s-au efectuat experimentele, făcând referire la:

- Așezarea geografică a câmpului experimental;
- Geomorfologia, hidrografia și hidrologia zonei;
- Condițiile climatice înregistrate în perioada cercetărilor, cu referire la regimul termic și regimul pluviometric înregistrat în anii experimentali

În **al șaselea capitol** sunt prezentate obiectivele și scopul tezei de cercetare, materialul biologic utilizat, organizarea experienței și metodele utilizate.

În acest capitol metodele de lucru au fost împărțite pe metode de analiză în câmp și metode de cercetare în laborator.

Metodele de cercetare în laborator au cuprins:

- izolarea sușelor de levuri din sol
- izolarea sușelor de levuri de pe plante
- analiza cantitativă a coloniilor levuriene
- determinarea caracteristicilor macro- și microscopice a tulpinilor de levuri selecționate
- identificarea taxonomică a sușelor levuriene prin metoda PCR.

Al șaptelea capitol cuprinde rezultate privind observațiile fenologice și măsurătorile biometrice în cazul celor patru soiuri luate în studiu.

Sunt prezentate detaliat rezultate precum:

- observații fenologice
- măsurători biometrice (fertilitate și productivitatea lăstarilor, creșterea lăstarilor)

Acești parametri, au fost urmăriți pe întreaga perioadă de vegetație în anii de experimentare, prezentându-se rezultatele obținute pe fiecare an experimental în parte, dar și media anilor.

În **capitolul opt** sunt prezentate rezultatele privind încărcătura levuriană a probelor prelevate, atât din sol cât și de pe inflorescențe și struguri aflați la maturitatea deplină.

Analizată din punct de vedere al fenofazei de prelevare și al sursei de izolare, microbiota probelor a prezentat diversitate.

Comparând cele patru soiuri luate în studiu, încărcătura levuriană a probelor prelevate din sol a fost superioară atât înainte de tratament cât și după tratament în cazul soiului Fetească Neagră Colecție, care a înregistrat un prag maxim de 26×10^6 UFC/g sol înainte de tratament, respectiv 24×10^6 UFC/g sol după tratament.

În împărțirea pe verticală a levurilor în sol numărul de microorganisme prezintă pantă descendentă invers proporțională cu adâncimea de prelevare, astfel se poate deduce că scăderea constantă a activității microbiotei din straturile inferioare este caracterizată prin lipsa oxigenului, scăderea cantității de substanțe nutritive și bineînțeles alcalinizarea treptată a solului.

Diferențele semnalate între factorii experimentali ai studiului (adâncimi de prelevare, soiuri, fenofaze de prelevare) evidențiază faptul că solul reprezintă o reală sursă microbială bogată și diversificată. Numărul levurilor într-un anumit loc este influențat direct de cantitatea de carbon și substanțe nutritive necesare dezvoltării.

În cazul probelor de pe inflorescențe respectiv bace la maturitate deplină s-a observat o evoluție ascendentă sfârșitul înfloritului până la maturitatea deplină, evoluție constantă în cazul celor patru soiuri luate în studiu.

Variațiile privind încărcătura microbială între cele patru soiuri în diferite fenofaze de dezvoltare a plantei ne indică faptul că microbiota plantațiilor viticole este dependentă de ritmul și dinamica dezvoltării fiecărui soi de viță de vie în parte, corelată bineînțeles cu dinamica transferării și dezvoltării levurilor din sol și condițiile climatice ale anului luat în studiu.

Aceste rezultate confirmă studiile din literatura de specialitate conform cărora cantitatea levurilor din plantațiile viticole cresc proporțional cu acumularea de zaharuri fermentescibile în bace influențând astfel pozitiv procesul dezvoltării microbiotei viticole.

Capitolul nouă cuprinde rezultate privind identificarea taxonomică a levurilor izolate și caracterizarea acestora din punct de vedere morfologic.

În urma prelucrării genomice s-au identificat șase tulpini de levuri ce au prezentat diversitate atât din punct de vedere al soiurilor de struguri din care au fost prelevate cât și din punct de vedere al sursei, a fenofazei și al anului izolării.

Tulpinile izolate aparțin genurilor *Solicoccozyma*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Filobasidium*, *Cystobasidium* și *Cryptococcus*.

Ponderea cea mai mare o deține specia *Solicoccozyma aerea* cu 47,22 % din total fiind regăsită în toate fenofazele de prelevare atât în sol cât și pe plante indiferent de anul de studiu. Specia *Hanseniaspora uvarum* s-a regăsit în sol doar în fenofaza de maturitate deplină iar pe plantă a fost prezentă atât la finalul înfloritului cât și la maturitatea deplină.

Specia *Rhodotorula glutinis* s-a regăsit atât în fenofaza de maturitate deplină cât și pe inflorescențe și bace în sol.

Specia *Filobasidium floriforme* a deținut un procent de 11,7 din totalul speciilor selecționate regăsindu-se atât în sol cât și pe struguri la maturitatea deplină a acestora.

Speciile *Cystobasidium pinicola* și *Cryptococcus aeris* s-au întâlnit în cel mai mic procent în arealul viticol luat în studiu. În timp ce specia genului *Cryptococcus* a fost prezentă în sol la adâncimea de 15-20 cm în fenofaza de lăstar 5-7 cm specia *Cystobasidium pinicola* s-a regăsit la finalul înfloritului pe inflorescențe.

Comparând cele șase specii selecționate observăm că *Solicoccozyma aerea* este prezentă atât în cazul tuturor adâncimilor de prelevare cât și pe organele vegetative ale plantelor în timp ce celelalte cinci specii se regăsesc preferențial pe surse și adâncimi de recoltare.

Din punct de vedere morfologic coloniile tulpinilor izolate au prezentat profil convex și plat, suprafață lucioasă, mată și în unele cazuri aspect mucoid, colorațiile variind de la alb până la crem și portocaliu.

Teza de doctorat se încheie cu un capitol destinat **concluziilor** ce au fost trasate pe baza rezultatelor și interpretării acestora.

Bibliografia însumează 172 de titluri din literatura de specialitate, atât naționale cât și internaționale.