

Dispozitiv portabil bazat pe biosenzori pentru evaluarea riscului de infectare a strugurilor cu *Botrytis cinerea* in vie (WINBIOTOOL)

Etapa 1/2020

Obiectiv etapă

Etapa 1, 2020 a proiectului Winbiotool a avut ca obiectiv validarea in laborator a biosenzorului pentru *Botrytis cinerea* si dezvoltarea preliminară a: (I) senzorului pentru lacaza, (II) dispozitivului portabil de detectie si (III) specificatiilor pentru aplicatia suport de gestionare a riscului de infectie fungica in vie.

Pentru atingerea obiectivului, in această etapă ICDVV Valea Călugărească a realizat 4 activități:

- (1) Monitorizarea si evaluarea calitativă si cantitativă a strugurilor infectati cu *Botrytis cinerea*. Analiza activitatii lacazei in strugurii infectati ;
- (2) Stabilirea specificatiilor preliminară si implementarea aplicatiei de gestionare a riscului de infectie fungică in vie;
- (3) Analiza factorilor ecologici si tehnologici care conditionează aparitia si evolutia putregaiului cenusiu (*Botrytis cinerea*) in plantatiile de vită de vie;
- (4) Vizite de lucru, manifestari stiintifice si diseminarea rezultatelor.

REZULTATE OBTINUTE

(1) Monitorizarea si evaluarea calitativă si cantitativă a strugurilor infectati cu *Botrytis cinerea*. Analiza activitatii lacazei in strugurii infectati

Monitorizarea riscului de infectie cu ciuperca *Botrytis cinerea* a fost realizată in plantatiile de vită de vie din Centrul viticol Valea Călugărească, pe 5 soiuri de vită de vie pentru struguri de vin si anume: trei soiuri cu sensibilitate mare la putregaiul cenusiu, respectiv, Chardonnay, Sauvignon, Fetească alba si 2 soiuri cu rezistență medie, Fetească neagra si Cabernet Sauvignon.

Evoluția factorilor climatici in cursul anului 2020 nu a creat condiții favorabile pentru dezvoltarea agentului patogen *Botrytis cinerea* pe parcursul fenofazelor de legarea, creșterea boabelor si compactarea ciorchinilor, fiind semnalate numai unele atacuri izolate de intensitate mică atât pe frunze cât și pe struguri, acestea fiind influențate în principal de sensibilitatea soiului si microclimatul plantațiilor.

Intre activitatea lacazică din mustul obtinut din struguri infectati cu *Botrytis cinerea* si nivelul gradului de atac observat in plantatiile de vita de vie a fost evidentiată o corelatie moderată spre bună ($R = 0.64$) in cazul determinărilor efectuate in fenofaza pârga ((BBCH 81 – 88) si o corelatie foarte bună ($R = 0.88$) pentru determinările efectuate in fenofaza de coacere deplină (BBCH 89) a strugurilor.

(2) Stabilirea specificatiilor preliminară si implementarea aplicatiei de gestionare a riscului de infectie fungică in vie

Pentru a stabili factorii de agromediu (climă, sol) si indicatorii ecologici (climatici si edafici) implicati in aparitia si manifestarea infectiei cu putregaiul cenusiu (*Botrytis cinerea*)

a fost realizată o Bază de date, pe o perioadă de 10 ani (2010 – 2019). Baza de date **VITISMED** prezintă două componente: climat zilnic viticol (CZV) și climat lunar viticol (CLV). Pe baza acestora, pentru fiecare an viticol, au fost calculați 7 indicatori climatici și anume: Bacchus, Broome, helioteamic, edafoclimatic viticol, hidrotermic, de secetă și standardizat de precipitații. Datele au fost prelucrate statistic utilizând programul Sigma Plot 14.

Indicii climatici lunari care au avut cea mai mare influență asupra apariției și manifestării bolii au fost temperatura medie, umiditatea relativă, suma precipitațiilor, temperatura medie din perioada umectării frunzelor și durata umectării frunzelor. Ca urmare a stabilirii diferitelor corelații între indicatori au fost elaborate două ecuații de calcul cu rol în prognoza atacului de mușgai:

Indice de risc 1 = $0,765 + (0,00582 * \text{Durata de strălucire a soarelui}) - (0,178 * \text{Indicele hidrotermic})$, (R=0.939),

Indice de risc 2 = $-2,552 + (0,00575 * \text{Durata de strălucire a soarelui}) + (0,0517 * \text{Umiditatea relativă}) - (0,146 * \text{Indicele hidrotermic})$, (R=0.964).

(3) Analiza factorilor ecologici și tehnologici care condiționează apariția și evoluția putregaiului cenușiu (*Botrytis cinerea*) în plantațiile de vită de vie

Pentru a stabili influența factorilor ecologici și tehnologici care condiționează apariția și evoluția putregaiului cenușiu (*Botrytis cinerea*) în plantațiile de vită de vie au fost luate în studiu două soiuri de vită de vie, Cabernet Sauvignon cu rezistență medie la atacul putregaiului cenușiu și Chardonnay cu sensibilitate mare.

Analiza principalelor elemente climatice a relevat faptul că, anul 2020 a beneficiat de o resursă termică foarte ridicată cu multiple influențe în evoluția fenofazelor vegetative.

Condițiile favorabile dezvoltării ciupercii s-au înregistrat în prima jumătate a lunii iunie când precipitațiile căzute au facilitat infecția primară, dar temperaturile ridicate înregistrate în cursul lunilor iulie-august și nivelul mai scăzut al precipitațiilor au condus la limitarea atacului, gradul de rezistență a soiurilor la atacul ciupercii fiind bun și foarte bun.

În plus față de condițiile climatice care nu au favorizat dezvoltarea infecției cu *Botrytis*, stresul hidric sever a influențat negativ evoluția principalelor procese fiziologice în plante și în primul rând fotosinteza, deoarece, pentru a limita pierderile de apă, stomatele se închid și nu mai permit intrarea dioxidului de carbon.

Creșterile vegetative au fost foarte reduse la ambele soiuri, astfel încât la nivelul butucilor de vită de vie nu a mai fost realizat microclimatul favorabil dezvoltării ciupercii

ICDVV Valea Călugărească a colaborat cu Partenerul Centrul Internațional de Biodinamică la realizarea următoarelor activități:

Act. 1.1. Dezvoltarea, caracterizarea și validarea la nivel de laborator a imunosenzorului electrochimic pentru *Botrytis cinerea*.

Pentru a pune la dispoziția colaboratorilor sporii produși de diferite tulpini, în scopul realizării biosenzorului electrochimic de selecție, s-a procedat la izolarea și purificarea unor tulpini de *Botrytis cinerea*, utilizând ca sursă struguri infectați.

Materialul inițial a fost reprezentat de boabe de struguri din soiurile Sauvignon și Chardonnay recoltate de la struguri cu semne vizibile de infecție cu *Botrytis*.

Izolarea culturilor pure de *Botrytis cinerea* s-a realizat prin utilizarea mediului de cultură Kritzman și Netzer (1978) care este un mediu selectiv pentru *Botrytis*. Coloniile dezvoltate pe acest mediu prezintă un halou brun în jurul lor ca urmare a oxidării acidului tanic din compoziția mediului. După 3 – 4 zile pe suprafața mediului s-au dezvoltat colonii de fungi, neconfluente, din care unele erau înconjurate de un halou brun. Din marginea

coloniilor cu halou brun s-au prelevat porțiuni de miceliu care au fost cultivate în plăci Petri cu mediu PDA. Incubarea plăcilor Petri s-a făcut la 24°C. Subcultivarea miceliului a fost repetată până la obținerea culturilor pure de *Botrytis cinerea*.

Act. 1.2 Dezvoltarea unui senzor electrochimic pentru măsurarea activității lacazei "on field" și caracterizare la nivel de laborator.

Sub coordonarea Partenerului ICB București, a fost dezvoltată o metodă electrochimică care permite determinarea precisă, rapidă, cantitativă și sensibilă a lacazei din must și care poate fi adaptată pentru măsuratori «on field». Metoda descrisă în Gaspar și colab, 2020 (<https://doi.org/10.3390/chemosensors8040126>) oferă posibilitatea măsurării la două valori de potențial corespunzătoare procesului de oxidare și celui de reducere al ABTS, oferind astfel un plus de siguranță și robustețe comparativ cu măsurătorile amperometrice la un singur potențial.

(4) Vizite de lucru, manifestări științifice și diseminarea rezultatelor

INTĂLNIRI DE PROIECT

În etapa I/2020 ICDVV Valea Călugărească a participat la 2 întâlniri de proiect cu toți partenerii via Microsoft Teams, organizate de coordonatorii spanioli pe 23 iulie și pe 29 octombrie 2020. În plus, Partenerii ICB București și EPI-SISTEM au avut loc vizite de lucru la ICDVV Valea Calugareasca și discuții legate de dezvoltarea sistemului portabil de analiză a lacazei și determinarea riscului de infecție cu *Botrytis cinerea*.

DISEMINAREA REZULTATELOR

Au fost publicate două articole științifice:

Liliana Pircălabu, Elena Brinduse Marian Ion, 2020, "Prediction of botrytis risk in vineyards based on weather indicators", Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Horticulture, Vol. 77, nr.2, pg. 58 - 63. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:2020.0038>

Gáspár S, Brinduse E, Vasilescu A, „Electrochemical evaluation of laccase activity in must”, Chemosensors 2020, 8(4), 126. <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040126>