

BIOECOLOGIA CIUPERCII *Phomopsis occulta*, AGENTUL ETIOLOGIC AL PIEIRII CONIFERELOR, NOU SEMNALAT ÎN ROMÂNIA. I.

Identificare. Patogenitate. Parametrii de dezvoltare (medii de cultură).

TATIANA EUGENIA ȘESAN*, MARIA OPREA*, IOAN TĂUT**

Abstract: When analysing mycoflora in/on conifer seeds obtained from Forest Experimental Research Station Cluj-Napoca we have recorded for the first time on *Larix decidua* seeds the fungus *Phomopsis occulta*, involved in conifers dieback.

Our investigations approached a series of bio-ecological aspects of this pathogen: 1. Isolation, purification and obtaining of the pathogen; 2. Determination and identification of pathogen; 3. Pathogenicity tests on *Larix decidua* plantlets under greenhouse conditions; 4. Establishing *in vitro* parameters of fungal development (culture media).

Key words: *Phomopsis occulta*, fungi, conifers

Introducere

Cercetările referitoare la micoflora conurilor, semințelor și plantulelor de conifere sunt destul de numeroase și provin mai ales din diferite zone de pe glob (Richardson 1979; Cizková 1983-84, 1988; Whittle 1972, 1977 etc.).

În România, însă, în afara lucrării lui Zaharia și colab. (1953) și a lucrării monumentale de sinteză elaborate de Georgescu și colab. (1957), nu s-au publicat alte date privind micoflora semințelor și plantulelor de specii forestiere, în general, și de conifere, în special. Tăut (1995) a publicat unele date referitoare la tratamentele chimice pentru prevenirea căderii plantulelor de conifere, fără analiza anterioară a micoflorei acestor specii. Șesan și Tăut (1998), Tăut (1998), Grundnicki (1998) au completat datele ce lipsesc până în prezent referitor la micoflora asociată cu semințele și plantulele de conifere (molid, larice, pin silvestru, pin negru) din România.

Semnalarea noastră pentru *Ph. occulta* din semințele de *L. decidua*, provenite dintr-o probă de la Ocolul Silvic Cluj-Napoca, este prima pentru țara noastră (Șesan & Tăut, 1998; Tăut, 1998). Fiind implicată în fenomenul de pieire (*dieback*) la conifere, s-a impus studierea ciupercii mai aprofundat pentru a se putea stabili parametrii ei de dezvoltare, în condiții de laborator, pe baza cărora ulterior să fie recomandate principalele măsuri de limitare a efectelor sale negative în pădurile de conifere.

Cercetările noastre au abordat numeroase aspecte de bioecologie a ciupercii patogene *Phomopsis occulta*, dintre care prezentăm în această primă contribuție următoarele:

1. Izolarea, purificare, determinarea și identificarea agentului patogen din semințele de *Larix decidua*;
2. Teste de patogenitate pe plantule de *Larix decidua*, în condiții de seră;
3. Stabilirea parametrilor biologici *in vitro* de dezvoltare a ciupercii (medii de cultură).

* Institutul de Cercetări pentru Protecția Plantelor București

** Institutul de Cercetări și Amenajări Silvice – Stațiunea de Cercetare și Producție Silvică - Cluj-Napoca

Material și metode

Ca material biologic s-a folosit izolatul nostru de *Ph. occulta* obținut din semințele de *Larix decidua*, purificat și cultivat pe mediul CGA (Ș e s a n & T ă u t, 1998).

Toate lucrările experimentale s-au executat în laboratorul de micologie și în sera Institutului de Cercetări pentru Protecția Plantelor București (România).

1. Izolarea, purificare și obținerea agentului patogen din semințele de larice s-a realizat prin metodele fitopatologice și micologice clasice, în special prin metoda Ulster, care au fost prezentate pe larg în contribuția noastră referitoare la micoflora semințelor de conifere (Ș e s a n & T ă u t, 1998). Determinarea și identificarea agentului patogen s-a făcut pe baza caracterelor culturale observate macroscopic, a analizei microscopice și a măsurătorilor biometrice a sporilor, având la bază literatura taxonomică corespunzătoare.

2. Testele de patogenitate s-au realizat în sera I.C.P.P. București, în câte 3 repetiții, în ghivece, în care s-au semănat câte 10 semințe, în două variante de infecție artificială: suspensie de ciupercă aplicată în sol (V 1) și prin submersia semințelor în suspensia de ciupercă (V 3), comparativ cu semințele netratate, respectiv martorul (V 2). Plantulele cu simptome de atac au fost recoltate și prelucrate în laborator prin dezinfectare prealabilă și amplasare pe mediu de cultură CGA pentru reizolarea ciupercii.

3. Stabilirea parametrilor biologici *in vitro* de dezvoltare a ciupercii (medii de cultură) s-a realizat prin cultivarea ciupercii pe diferite medii. Toate variantele au avut minimum trei repetiții. Observațiile au constat din măsurători ale diametrului coloniilor după 3, 5, 8 zile, până în momentul când martorul a atins valoarea maximă (7,0 cm în diametru). Datele au fost prelucrate statistic prin analiza varianței.

Rezultate și discuții

1. Izolarea, purificarea, determinarea și identificarea agentului patogen. Din semințele de larice, s-au semnalat specii de *Fusarium* (1%), *Alternaria* (14%), *Penicillium* (3%) și unele ciuperci neidentificate (9%) .

Determinarea și identificarea agentului patogen s-a realizat în laboratorul de micologie de la I.C.P.P. București. Dintre ciupercile inițial neidentificate s-au determinat ulterior micromicetele: *Phomopsis occulta* Trav., *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bainier, *Scytalidium* sp. ș.a. (Ș e s a n & T ă u t, 1998; T ă u t, 1998).

În România, *Ph. occulta* a fost citată de pe conurile de rășinoase în general (Georgescu și colab. 1957). Ulterior, L u n g e s c u (1972) a semnalat această micromicetă pentru prima dată din conurile de *Larix decidua* Mill. din Munții Perșani, incluzând în lucrare și descrierea taxonului (Ș e s a n & T ă u t, 1998).

Semnalarea noastră pentru *Ph. occulta* din semințele de *L. decidua* (planșa 1), provenite dintr-o probă de la Ocolul Silvic Cluj-Napoca, este prima pentru țara noastră.

2. Testele de patogenitate efectuate în sera I.C.P.P. București au reprodus simptomele cunoscute din literatură pentru acest patogen (I g o e & P e t e r s o n, 1995). Astfel, așa cum se observă din imaginile prezentate în planșa 2, prin infecții artificiale cu suspensie de ciupercă, aplicată în sol (V 1) sau prin submersia semințelor înainte de semănat (V 3), s-a constatat apariția simptomelor caracteristice, în special putrezirea germenilor, uscarea și distrugerea rădăcinilor, leziuni circulare brune la tulpinilor, uscarea tulpinilor și ramurilor tinere. Aceste simptome au fost descrise recent și de I g o e & P e t e r s o n (1995) în Africa de Sud. Reizolarea patogenului s-a făcut prin recoltarea plantulelor cu simptome de atac, dezinfectarea lor prealabilă și amplasarea pe mediul CGA, în plăci Petri (planșa 3), constatându-se dezvoltarea agentului patogen. Deoarece s-a utilizat

în experiențe sol nesterilizat, s-au mai izolat din plantulele cu simptome de atac și alte ciuperci patogene, cum sunt: *Rhizoctonia solani* Kühn, *Botrytis cinerea* Pers., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (*A. tenuis* Nees), *Fusarium* spp., implicate, de asemenea, frecvent în fenomenul parazitar de cădere și putrezire a plantulelor de conifere (planșa 3,c-d).

3. Parametrii biologici *in vitro* de dezvoltare a ciupercii *Ph. occulta*

3. 1. Medii de cultură. Dintre cele 7 medii de cultură experimentate (tabelul 1, planșa 4), cea mai bună creștere și sporulare s-au observat pe mediul CGA, în ambele variante, cu 200 și, respectiv, 100 g cartofi la litru și pe mediul preparat din ramuri de pin, în ambele compoziții, Pi 200 și Pi 100, valoarea maximă a diametrului coloniei (7,0 cm) fiind atinsă după 7-8 zile de la însămânțare.

Tabelul 1

Influența mediilor de cultură asupra dezvoltării *in vitro* a ciupercii *Phomopsis occulta*

Mediul de cultură	Diametrul coloniei (cm) după:			Sporulare
	3 zile	5 zile	8 zile	
Malț extract	0,800	2,075	3,450 ⁰⁰⁰	+++
Czapek-Dox	0,775	1,050 ⁰⁰⁰	2,425 ⁰⁰⁰	++
Pi 100	0,775	1,525 ⁰⁰⁰	5,550	+++
Pi 200	1,025***	1,425 ⁰⁰⁰	6,450*	+++
CGA 100	1,700***	3,050***	7,000***	+++
CGA 200	1,775***	3,150***	7,000***	++++
Apă agarizată (Aag) - Martor	0,700	2,100	5,975	-
DL 5%	0,157	0,242	0,429	
DL 1%	0,216	0,332	0,589	
DL 0,1%	0,294	0,452	0,801	

Legenda: +++ = sporulare abundentă;
 +++ = sporulare puternică;
 ++ = sporulare medie;
 + = sporulare redusă;
 - = sporulare absentă

Malț extract: 20 g extract de malț + 20 g agar + 1000 ml apă distilată;
 Czapek-Dox: 2 g azotat de sodiu + 0,5 g clorură de potasiu + 0,5 g sulfat de magneziu + 0,01 g sulfat feros + 1,0 g fosfat bipotasic + 30 g glucoză + 20 g agar + 1000 ml apă distilată;
 Pi 100: 100 g ramuri de pin (extract) + 20 g agar + 1000 ml apă distilată;
 Pi 200: 200 g ramuri de pin (extract) + 20 g agar + 1000 ml apă distilată;
 CGA 100: 100 g cartofi + 20 g dextroză + 20 g agar + 1000 ml apă distilată;
 CGA 200: 200 g cartofi + 20 g dextroză + 20 g agar + 1000 ml apă distilată;
 Apă agarizată: 20 g agar + 1000 ml apă distilată

De asemenea, creștere și sporulare bune s-au observat pe mediul de extract de malț. Pe mediul Czapek-Dox, creșterea și sporularea au fost mai reduse. Pe mediul din apă agarizată (martor), deși creșterea a fost destul de bună, sporularea a fost redusă.

Concluzii

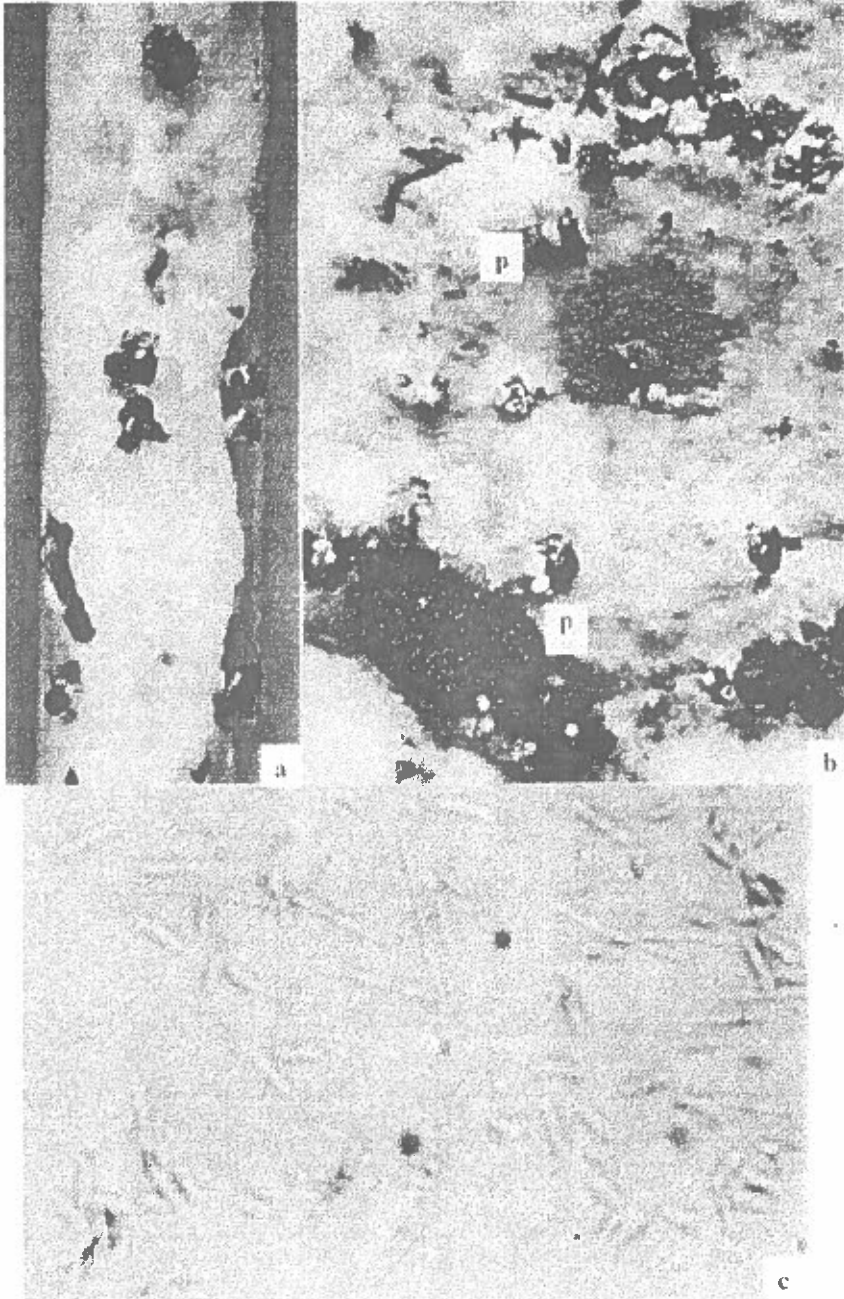
Pe baza celor prezentate, se pot trage următoarele concluzii:

- 1) S-a semnalat pentru prima dată în România de pe semințele de *Larix decidua* ciuperca patogenă *Phomopsis occulta* (Ș e s a n & T ă u t, 1998).
- 2) *Phomopsis occulta* produce pieirea (*dieback*) coniferelor (larice, molid, molid albastru, Cupressaceae). Testele de patogenitate, în condiții de seră, au confirmat simptomele caracteristice: putrezirea germeilor, uscarea și distrugerea rădăcinilor, leziuni

- circulare brune pe tulpini, uscarea tulpinilor și ramurilor tinere, descrise recent și de Igoe & Petersen (1995).
- 3) Dintre parametrii biologici de dezvoltare a ciupercii *Phomopsis occulta*, mediile de cultură cele mai favorabile au fost: CGA 200, CGA 100, Pi 200, Pi 100 și extract de malț.

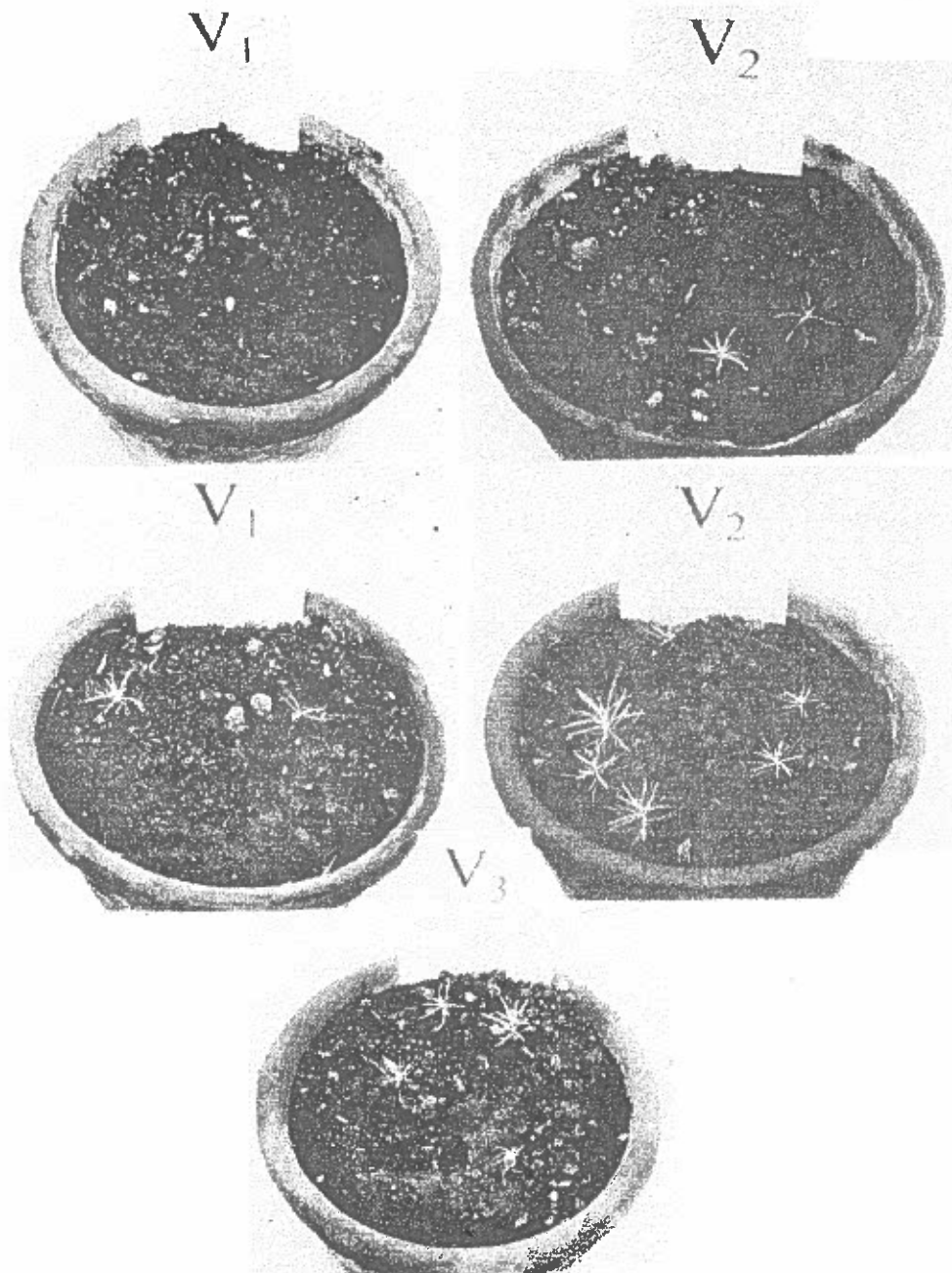
Bibliografie

- Cizková Dana, 1983-1984: Mycoflora semen a šišek smrku ztepilého (*Picea excelsa* Link) a borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.), Sborník Ústavu Aplikované Ekologie a Ekotechniky Vysoké Školy Zemedelské v Praze, 1: 49-65
- Cizková Dana, 1988: Hlavní zdroje houbových nákaz smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) a borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.), Sborník Ústavu Aplikované Ekologie a Ekotechniky Vysoké Školy Zemedelské v Praze, 7: 87-100
- Georgescu C. C., Petrescu M., Ene M., Ștefănescu M., Miron V., 1957: Bolile și dăunătorii pădurilor. Biologie și combatere, Ed. Agro-Silvică de Stat, Buc., 638 p.
- Grundnicki Margareta, 1998: Putrezirea plantulelor de rășinoase, Sănătatea plantelor, 2: 27
- Igoe Melissa J., Peterson N. C., 1995: A *Phomopsis* canker associated with branch dieback of Colorado Blue Spruce in Michigan, Plant Dis., 79: 202-205
- Luțgescu Elena, 1972: Cercetări privind ciupercile Deuteromicete din Munții Perșani, Bul. Univ. Brașov, seria C, XIV: 197-209
- Richardson M. J., 1979: An annotated list of seed-borne diseases, Third Edition, Phytopathological Papers no. 23: 61 (123): 184-185
- Șesan Tatiana Eugenia, Tăuț I., 1998: Micoflora asociată cu semințele și plantulele de conifere, Revista Pădurilor, 113 (1): 7-16 + coperta 2-3
- Tăuț I., 1995: Contribuții privind prevenirea și combaterea agenților criptogamici din solarii, Revista Pădurilor, 110 (4): 30-36
- Tăuț I., 1998: Cercetări privind cauzele ce condus la pieirea plantulelor de rășinoase din culturile silvice. Metode și tehnologii de prevenire și combatere, teză de doctorat, Univ. Șt. Agr. și Med. Veter., Cluj-Napoca
- Whittle A. M., 1972: Mycoflora of Pine seed, University of Surrey, p.50
- Whittle A. M., 1977: Mycoflora of cones and seeds of *Pinus sylvestris*, Trans. Br. Mycol. Soc., 69 (1): 47-57
- Zaharia Elena, Georgescu C. C., Petrescu M., 1953: Boala "culcarea puieților" (fuzarioza) la rășinoase, Studii și Cercetări, Institutul de Cercetări Silvice, vol. 14: 277-289



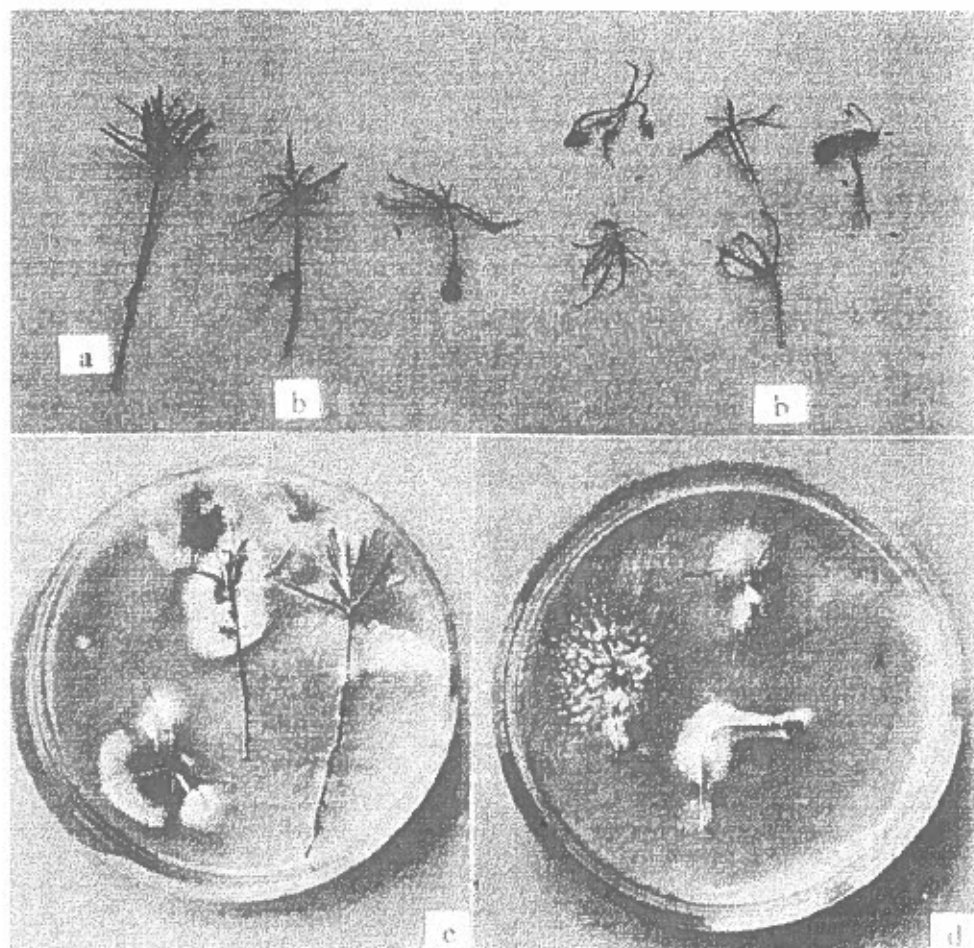
Ciuperca *Phomopsis occulta* izolată din semințele de *Larix decidua*: a – cultură cu pycnidii (p) dezvoltată pe mediul CGA în eprubete; b– idem, în vase Petri; c - pycnospori A, B, C (40 x) (Şesan, 1998; foto: D. Kiss,1998)

Phomopsis occulta fungus isolated from *Larix decidua* seeds: a – culture with pycnidia (p) on PDA medium in vials; b – the same in Petri dishes; c – pycnospores A, B, C (40 x) (Şesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)



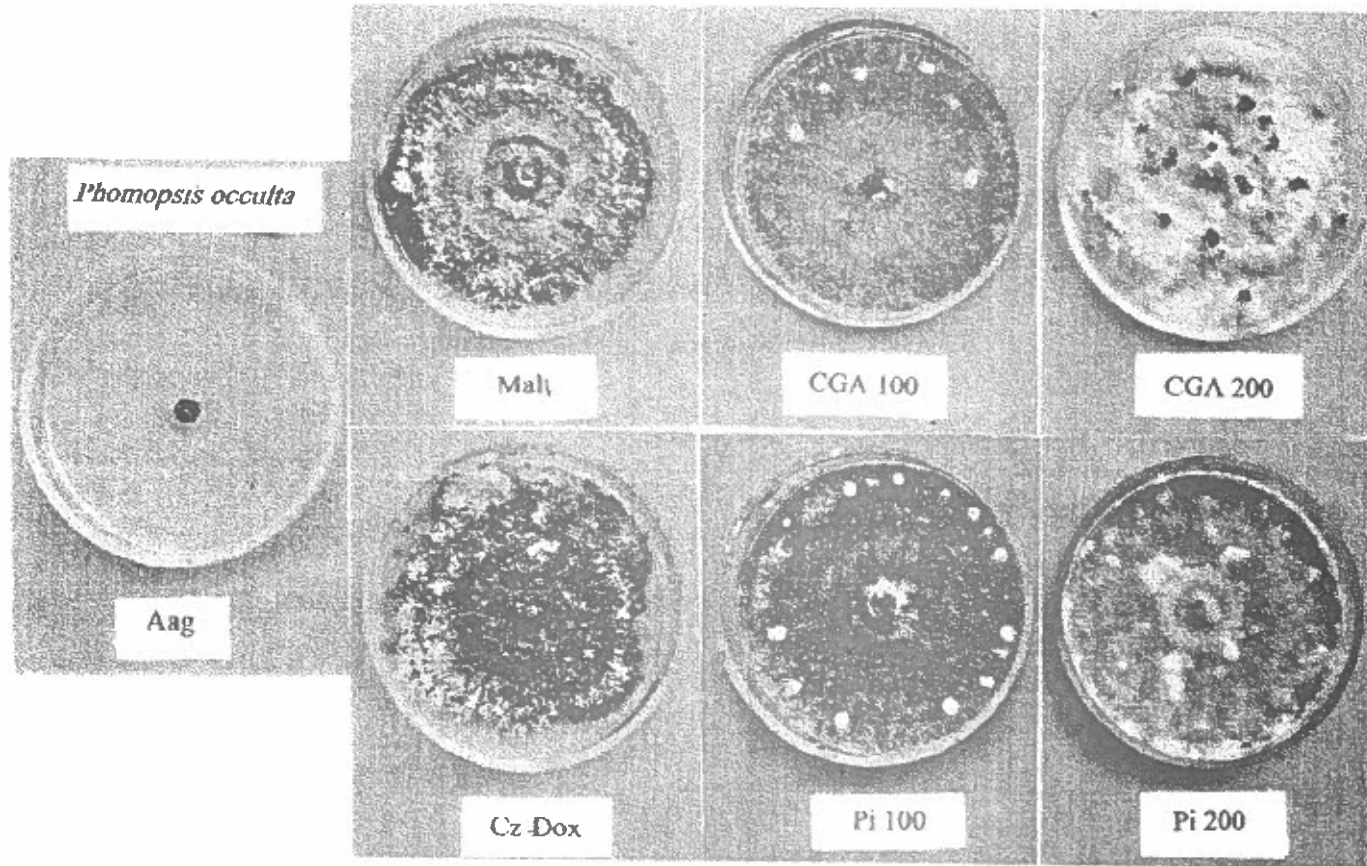
Phomopsis occulta – teste de patogenitate: V 1 – suspensie de ciupercă aplicată în sol; V 2 – martor (fără inoculare artificială); V 3 – semințe de *Larix decidua* imersate în suspensie de ciupercă (Șesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)

Phomopsis occulta – pathogenicity tests: V 1 - fungal suspension applied to soil; V 2 – check (without artificial infection); V 3 - *Larix decidua* seeds submerged in fungal suspension (Șesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)



Phomopsis occulta – teste de patogenitate: a - martor (plantulă sănătoasă); b - 8 plantule atacate, cu simptome de boală, reproduse în condiții de seră; c-d - reizolarea ciupercilor patogene ce produc distrugerea plantulelor de *Larix decidua* (Șesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)

Phomopsis occulta – pathogenicity tests: a - check (healthy seedling); b - 8 attacked seedlings with disease symptoms reproduced in greenhouse; c-d - re-isolation of pathogenic fungi causing dieback of *Larix decidua* seedlings (Șesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)



Dezvoltarea ciupercii *Phomopsis occulta* pe diferite medii de cultură: a pă agarizată (Aag); malț-agar (malț); cartof-glucoză-agar (CGA 100 CGA 2 00); Czapek-Dox (Cz-Dox); extract din ramuri de pin a garizat (Pi 100, Pi 200) (Șesan, 1998; foto: D. Kiss 1998)

Development of *Phomopsis occulta* on different culture media: water-a gar (Aag); malt-agar (malț); PDA (CGA 100, CGA 2 00), Czapek-Dox (Cz-Dox); extract from pine branches-agar (Pi 1 00, Pi 200) (Șesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)