

BIOECOLOGIA CIUPERCII *PHOMOPSIS OCCULTA*, AGENTUL ETIOLOGIC AL PIEIRII CONIFERELOR, NOU SEMNALAT ÎN ROMÂNIA

II. PARAMETRII DE DEZVOLTARE (SURSE DE CARBON ȘI AZOT, REACȚIA MEDIULUI DE CULTURĂ)

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

Abstract: Establishing *in vitro* parameters of fungal development (carbon sources, nitrogen sources, reaction of culture medium) in the Laboratory of Mycology at Research Institute of Plant Protection Bucharest it was concluded that:

- the most favourable carbon sources for the development of *Ph. occulta* proved to be monosaccharides: manite, glucose (dextrose), arabinose and dulcite, the disaccharide saccharose (fructose) and the polysaccharide starch;
- the most favourable nitrogen sources were the aminoacids: L-norvaline and L-leucine, the amide L-asparagine and among salts ammonium sulphate;
- the most favourable pH values of culture media between 4.0 and 6.5.

Key words: *Phomopsis occulta*, conifers dieback, developmental parameters *in vitro*, carbon and nitrogen sources, pH of culture media

Introducere

Identificarea ciupercii *Phomopsis occulta* (Șesan & Tăut, 1998; Tăut, 1998), agentul etiologic al pieirii plantulelor de conifere a impus studierea acestuia în continuare mai aprofundat pentru a se putea stabili, în afara mediilor de cultură favorabile (Șesan și colab., 1999), și alți parametri de dezvoltare, în condiții de laborator și anume: sursele de carbon și de azot din mediile de cultură și valorile inițiale ale reacției mediului de cultură; pe baza acestor noi elemente ulterior pot fi recomandate principalele măsuri de limitare a efectelor sale negative în pădurile de conifere.

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 (Șesan & Tăut, 1998). Toate lucrările experimentale s-au executat în laboratorul de micologie și în sera Institutului de Cercetări pentru Protecția Plantelor București (România).

Stabilirea parametrilor biologici *in vitro* de dezvoltare a ciupercii (medii de cultură cu diferite surse de carbon și de azot, valori diferite ale reacției mediului de cultură) s-a realizat prin cultivarea ciupercii pe mediul CGA în care au fost modificate pe rând factorii ecologici enumerați mai sus. Toate variantele au avut minimum trei repetiții. Observațiile au constat din măsurători ale diametrului coloniilor după 3, 5, 7, 8, 10, 14 zile, până în

* Institutul de Cercetări pentru Protecția Plantelor, București

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

momentul când matorul a atins valoarea maximă (7.0 cm în diametru). Datele au fost prelucrate statistic prin analiza variantei.

Rezultate și discuții

Alți parametri biologici *in vitro* de dezvoltare a ciupercii *Ph. occulta* (surse de carbon, surse de azot, reacția mediului de cultură).

1. **Sursele de carbon.** Așa cum reiese din datele prezentate în tabelul 1 și din imaginile planșei 1, pe mediul CGA cu 9 monozaharide testate ce sursă de carbon pentru ciuperca *Ph. occulta*, după primele 3 zile nu s-a observat nici o creștere a ciupercii (0.700 cm în diametru). După 7 zile de la însămânțare, cele mai favorabile monozaharide pentru creșterea ciupercii s-au dovedit manita (2.00 cm în diametru) și arabinoza (1.467 cm, urmate de glucoză (0.967 cm) și dulcită (0.833 cm). Cele mai puțin favorabile pentru creșterea ciupercii au fost, după același interval, monozaharidele: sorboză, fructoză, rhamnoză, rafinoză, riboză (0.700 cm). Ulterior, după 10 zile s-a constatat, în ordine crescândă, următoarea activitate a monozaharidelor: manita (3.933 cm) > dulcita (3.000 cm) > rafinoza (2.467 cm) > glucoza și riboza (2.333 cm) > arabinoza și fructoza (2.267 cm) > rhamnoza (1.800 cm). Cea mai nefavorabilă sursă de carbon s-a dovedit sorboza, pe care ciuperca nu a crescut, diametrul coloniei rămânând tot 0.700 cm, adică dimensiunea discului inoculat inițial. După 14 zile s-a observat o uniformizare a creșterii în majoritatea variantelor experimentale, toate monozaharidele asigurând creșterea ciupercii între valorile de 5.433 cm în diametru în varianta cu roboză și 3.200 cm în varianta cu arabinoză, iar în varianta cu sorboză neînregistrându-se nici o creștere. Referindu-ne la sporularea ciupercii pe mediile cu diferite monozaharide, s-a constatat cea mai bună sporulare în variantele cu: fructoză, glucoză și riboză; sporulare moderată pe cele cu: manită, arabinoză, rhamnoză și dulcită; sporulare redusă în varianta cu rafinoză. În varianta cu sorboză, în care nu s-a produs creșterea ciupercii, nu s-a constatat, firese, nici sporularea acesteia.

Dintre dizaharide (tabelul 1, planșa 2), după 7 zile, cea mai favorabilă pentru dezvoltarea ciupercii s-a dovedit zaharoza (1.967 cm în diametru); o dezvoltare mai redusă (0.800-0.900 cm) s-a constatat în variantele cu maltoză și melibioză, în timp ce în cele cu trehaloză și lactoză, creșterea a fost absentă (0.700 cm). După 10-14 zile, ordinea dizaharidelor în ceea ce privește asigurarea creșterii ciupercii *Ph. occulta* se prezintă astfel: zaharoză (3.733-4.400 cm) > melibioză (4.933-3.200 cm) > trehaloză (4.067-2.633 cm) > maltoză (3.567-2.467 cm) > lactoză (2.533-2.267 cm). Dintre dizaharide, cea mai puțin favorabilă dezvoltării ciupercii-test a fost lactoza, pe care și sporularea a fost redusă. În general, sporularea ciupercii pe mediile cu diferite dizaharide a fost bună (+++) pentru zaharoză și trehaloză până la moderată (++) pentru maltoză și melibioză.

Dintre cele trei polizaharide testate (tabelul 1, planșa 2), cele mai favorabile pentru creșterea și sporularea ciupercii s-au dovedit amidonul, urmat de inulină, iar cel mai puțin favorabil celuloza, pe care nu s-a înregistrat nici o creștere și nici sporulare.

2. **Sursele de azot.** Analizând datele din tabelul 2 și planșa 3, s-a constatat că dintre aminoacizii testați, cel mai favorabil pentru dezvoltarea ciupercii *Ph. occulta* a fost L-norvalina, care a determinat atingerea diametrului amxim (7.000 cm) al coloniei după 10 zile de la însămânțare; au urmat, în ordine descrescândă, DL-norleucină (5.467 cm) > L-leucină (4.367) > L-alanină (2.733 cm) > L-arginină (2.420 cm) > cisteină (2.133 cm). În toate variantele cu aminoacizi, sporularea ciupercii a fost de la bună până la moderată.

Tabelul 1
Influența surselor de carbon asupra dezvoltării ciupercii *Phomopsis occulta*

Sursa de carbon	Diametrul coloniei (cm) după:				Sporulare
	3 zile	7 zile	10 zile	14 zile	
MONOZAHARIDE					
Manită	0.700	2.000***	3.933***	4.433*	++
Sorboză	0.700	0.700	0.700	0.700°°°	-
Levuloză (fructoză)	0.700	0.700	2.267	3.233°	+++
Glucoză (dextroză)	0.700	0.967***	2.333	3.433	+++
Arabinoză	0.700	1.467***	2.267	3.200°	++
Rhamnoză	0.700	0.700	1.800°°	3.900	++
Riboză	0.700	0.700	2.333	5.433***	+++
Dulcită	0.700	0.833*	3.000	4.533***	++
Rafinoză	0.700	0.700	2.467	4.000	+
DIZAHARIDE					
Sucroză	0.700	1.967***	3.733**	4.400***	+++
Maltoză	0.700	0.800	2.467	3.567	++
Trehaloză	0.700	0.700	2.633	4.067	+++
Lactoză	0.700	0.700	2.267	2.533	+
Melibioză	0.700	0.900***	3.200	4.933***	++
POLIZAHARIDE					
Celuloză	0.700	0.700	0.700	0.700	+
Inulină	0.700	2.400***	2.867	4.300*	+
Amidon	0.700	2.800***	2.967	4.100	++
Mator (fără sursă de carbon)	0.700	0.700	2.760	3.800	-
DL 5%		0.125	0.634	0.495	
DL 1%		0.169	0.854	0.668	
DL 0.1%		0.224	1.134	0.886	

+++ = sporulare puternică; ++ = sporulare medie; + = sporulare redusă; - = sporulare absentă

Tabelul 2
Influența surselor de azot asupra dezvoltării in vitro a ciupercii *Phomopsis occulta*

Sursa de azot	Diametrul coloniei (cm) după:				Sporulare	
	3 zile	5 zile	7 zile	10 zile		14 zile
AMINOACIZI						
DL – norleucină	0.700	1.367***	2.500 ^{***}	5.467***	6.233 ^{***}	++
L – leucină	0.700	2.800***	2.800 ^{***}	4.367 ^{***}	5.133 ^{***}	++
L – nor-alină	0.700	1.500***	3.533	7.000***	7.000	+++
Alanină	0.700	1.133***	1.133 ^{***}	2.733 ^{***}	3.067 ^{***}	++
Cisteină	0.700	1.733***	1.733 ^{***}	2.133 ^{***}	2.700 ^{***}	++
L – arginină	0.700	1.833***	1.920 ^{***}	2.420 ^{***}	5.200 ^{***}	+++
AMIDE						
L – aspargină	0.700	1.500***	2.800 ^{***}	5.467***	7.000	++
Uree	0.700	1.800***	1.800 ^{***}	4.667 ^{***}	6.200 ^{***}	++
SARURI						
Azotat de amoniu	0.700	0.800	0.800 ^{***}	5.500***	6.233 ^{***}	++
Sulfat de amoniu	0.700	1.670***	1.700 ^{***}	3.467 ^{***}	3.667 ^{***}	+
PROTEINE						
Gelatină	0.700	1.800***	1.900 ^{***}	3.200 ^{***}	4.033 ^{***}	++
Maizor (fără azot)	0.700	0.700	3.567	4.933	7.00	-
DL 5%		0.141	0.156	0.262	0.368	
DL 1%		0.192	0.212	0.357	0.500	
DL 0.1%		0.260	0.288	0.484	0.678	

+++ = sporulare puternică; ++ = sporulare medie; + = sporulare redusă; - = sporulare absentă;

Dintre cele două amide experimentate, L-asparagina s-a dovedit mai favorabilă decât ureea pentru creșterea ciupercii, dar cu acțiune similară asupra sporulării, care a fost moderată.

Dintre cele două săruri testate, ciuperca a crescut mai bine în varianta cu sulfat de amoniu, comparativ cu azotatul de amoniu; sporularea a fost însă mai intensă pe azotatul de amoniu comparativ cu cea din varianta cu sulfat de amoniu.

În varianta cu substanța proteică – gelatină, atât creșterea cât și sporularea ciupercii au fost moderate.

3. Valorile inițiale de pH a mediului. În condiții de mediu CGA cu valori diferite de pH inițial (tabelul 3, planșa 4), după 3 zile de la însămânțare, s-a constatat cea mai bună dezvoltare a ciupercii în variantele cu pH între 4.0 și 6.5 (puternic acid până la slab acid); în aceste variante diametrul coloniilor a atins valori între 2.467 cm până la 2.567 cm, în comparație cu martorul (2.067 cm). După 5 și, respectiv, 8 zile, valori maxime ale diametrului coloniilor (3.500 – 4.833 cm, comparativ cu martorul 3.633 cm, după 5 zile; 5.000 – 5.433 cm, comparativ cu 5.120 cm la martor, după 8 zile) s-au înregistrat la o gamă mai largă a valorilor de pH, și anume, între 4.0 și 8.0 (acid până la neutru și chiar alcalin). Aceste date confirmă, de fapt, că valorile inițiale ale pH-ului mediului de cultură se modifică pe măsură ce timpul trece.

Tabelul 3
Influența valorilor pH-ului mediului asupra dezvoltării *in vitro*
a ciupercii *Phomopsis occulta*

pH	Diametrul coloniei (cm) după:			Sporulare
	3 zile	5 zile	8 zile	
3.0	1.667°	3.067	4.000°°°	-
4.0	2.467*	4.200	5.433	+
4.5	2.500**	4.233***	5.000	++
5.0	2.567**	4.667***	5.200	+++
5.5	2.567**	4.833***	5.180	+++
6.5	2.467*	3.833	5.200	+++
7.0 (martor)	2.067	3.633	5.120	++
8.0	2.067	3.500	5.000	+
9.0	1.533°°	3.000°	4.800	+
9.5	1.433°°	2.767°°	3.933°°°	-

DL 5% 0.294 0.571 0.539

DL 1% 0.403 0.784 0.739

DL 0.1% 0.548 1.067 1.007

Cea mai bună sporulare (+++) a ciupercii s-a înregistrat la valori de pH între 5.0 și 6.5, bună la pH 4.5 și 7.0; sporularea a fost redusă în mediul foarte acid, la pH 4.0 și în cel alcalin, la pH 8.0 și 9.0. Ciuperca nu a sporulat la pH foarte acid (3.0) și foarte alcalin (pH 9.5).

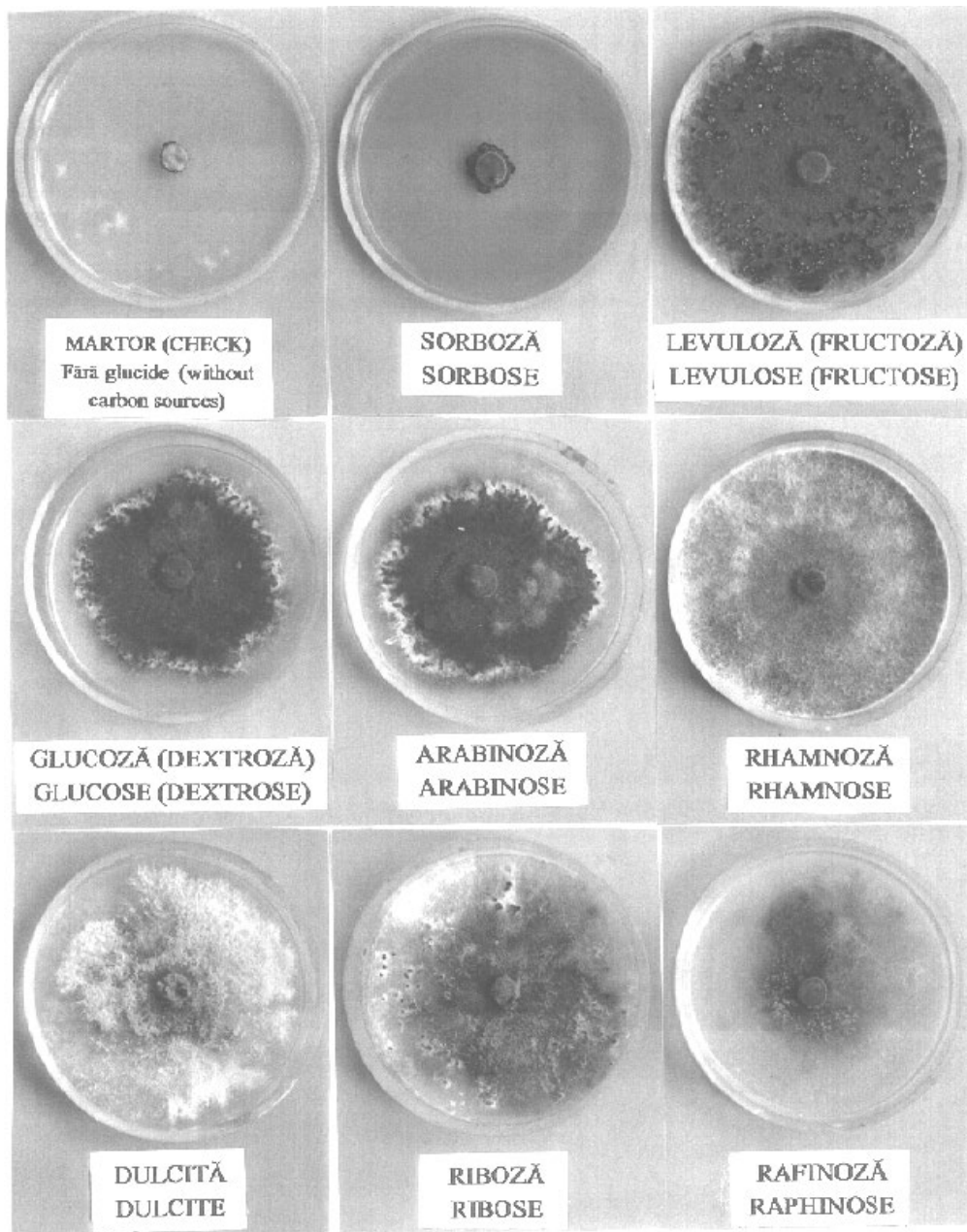
Concluzii

Pe baza celor prezentate, se poate trage concluzia că parametrii biologici optimi pentru dezvoltarea *in vitro* a ciupercii *Ph. occulta* sunt:

- sursele de carbon: monozaharidele manită, glucoză (dextroză), arabinoză, dulcită, dizaharidul zaharoză (sucroză) și polizaharidul amidon;
- sursele de azot: aminoacizii L-norvalină, DL-norleucină, L-leucină; amida L-aspargină; sulfatul de amoniu;
- valorile de pH între 4.0 și 6.5.

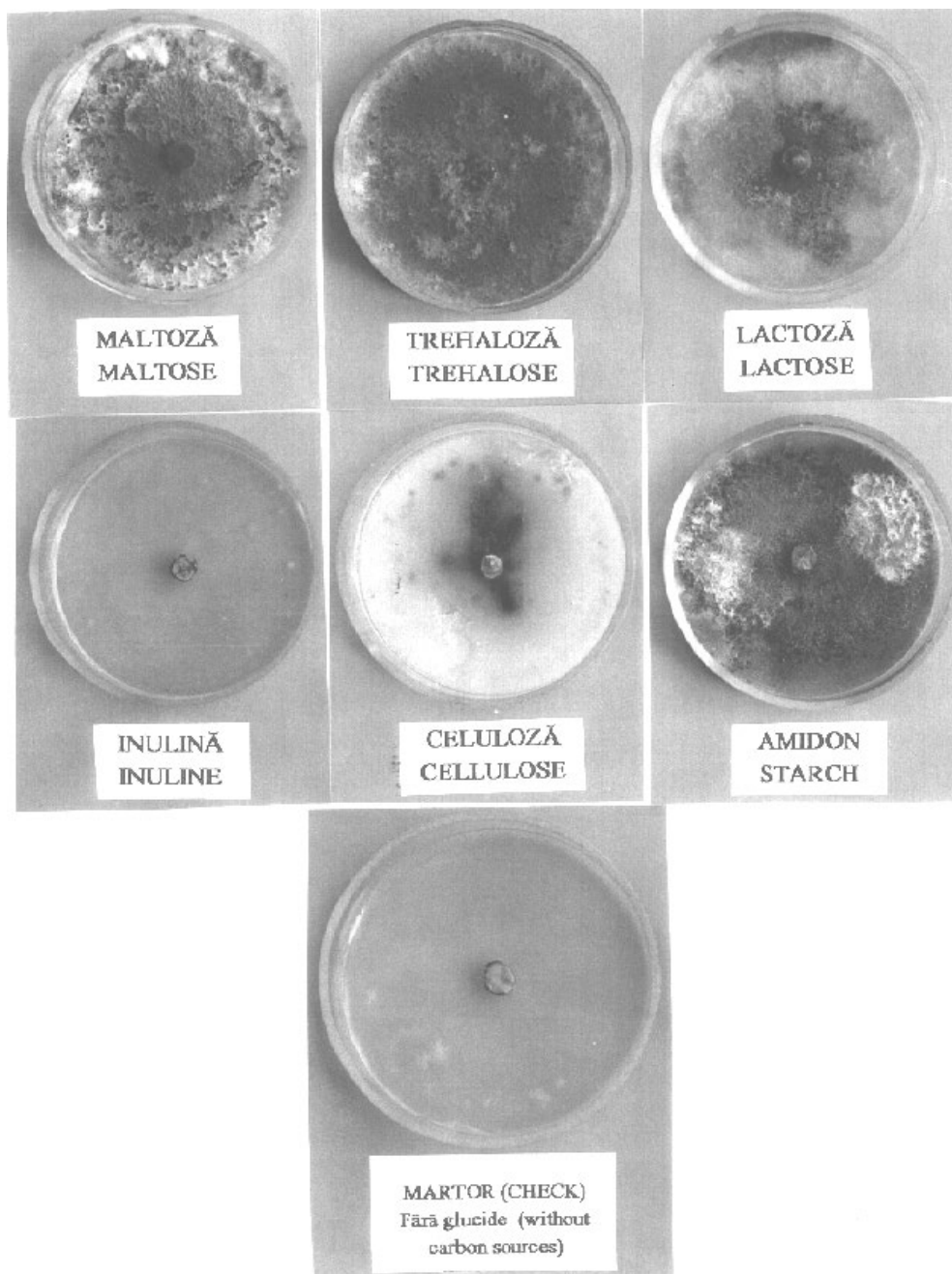
Bibliografie

1. **Șesan Tatiana Eugenia, Tăut I.**, 1998, Micoflora asociată cu semințele și plantulele de conifere, Revista Pădurilor, 113 (1): 7-16 + coperta 2-3
2. **Șesan Tatiana Eugenia, Oprea Maria, Tăut I.**, 1999, Bioecologia ciupercii *Phomopsis occulta*, agentul etiologic al pieirii coniferelor, nou semnalat în România. I. Identificare. Patogenitate. Parametrii de dezvoltare (medii de cultură), Revista Pădurilor, anul 114
3. **Tăut I.**, 1998, Cercetări privind cauzele ce au 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



Influența surselor de carbon (monozaharide) asupra dezvoltării ciupercii *Phomopsis occulta* (Șesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)

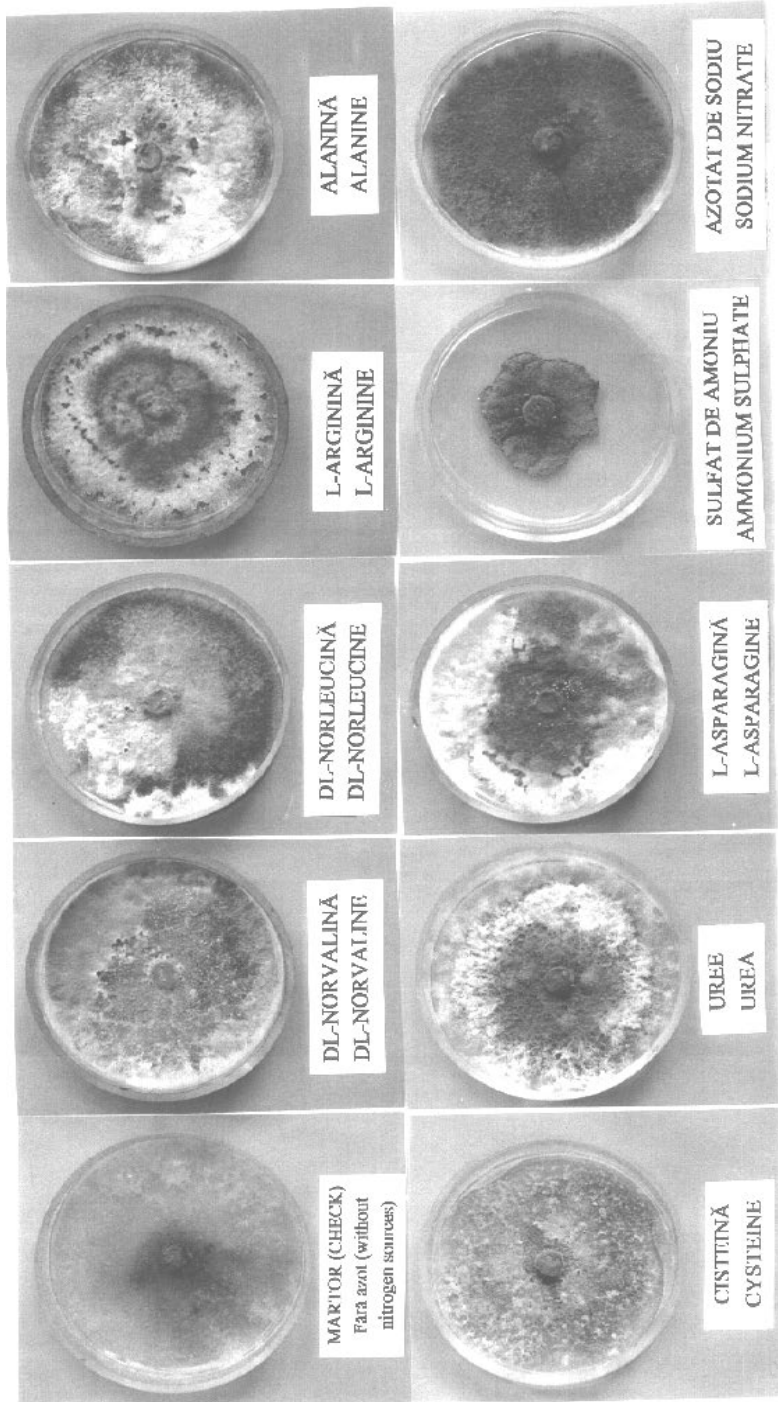
Influence of carbon sources (monosaccharides) on *Phomopsis occulta* development (Șesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)

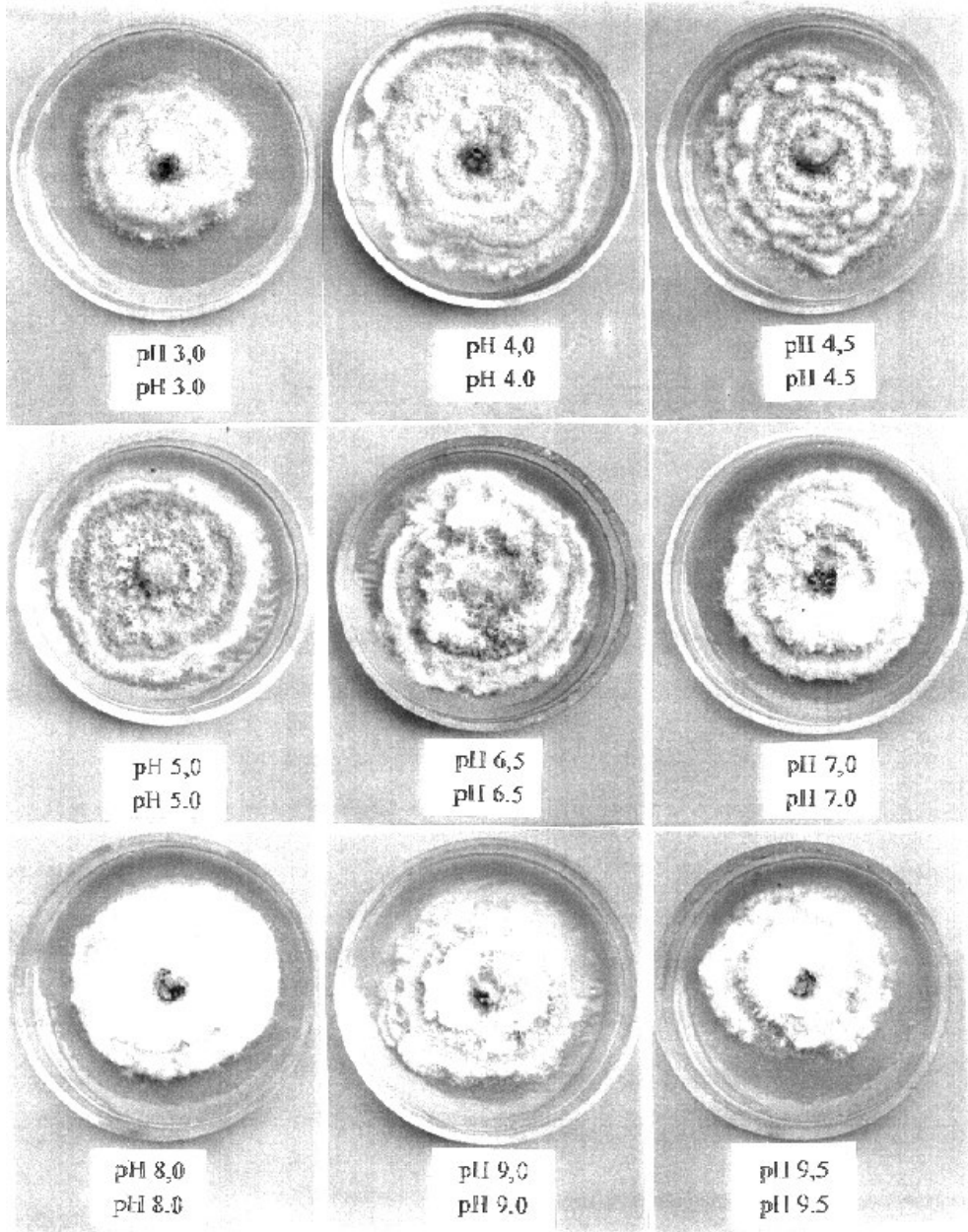


Influența surselor de carbon (dizaharide, polizaharide) asupra dezvoltării ciupercii *Phomopsis occulta* (Șesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)

Influence of carbon sources (disaccharides, polysaccharides) on *Phomopsis occulta* development (Șesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)

Influența surselor de azot asupra dezvoltării ciupercii *Phomopsis occulta* (Şesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)
Influence of nitrogen sources on *Phomopsis occulta* development (Şesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)





Dezvoltarea ciupercii *Phomopsis occulta* pe mediul C G A cu diferite valori de pH (Șesan, 1998; foto: D. Kiss, 1998)

Phomopsis occulta development on P D A medium with different pH values (Șesan, 1998; photo: D. Kiss, 1998)