

Determination of the particularities of growth and development in different temperature conditions of micromycetes *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. and *Botrytis* spp. in dual culture with *Penicillium* spp.

SOFIA GRIGORCEA , BORIS NEDBALIUC , EUGENIA CHIRIAC , NICOLAI ALUCHI ,
AND DMITRII GRIGORCEA 

Abstract. The article reflects information on the particularities of growth and development of micromycetes *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *Botrytis cinerea*, in dual culture with *Penicillium chrysogenum* under different temperature conditions. Has been found that temperature plays an important role in the growth, development and formation of the interaction features of the studied micromycetes.

Keywords: micromycetes, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., dual culture, thermal conditions.

Determinarea particularităților de creștere și dezvoltare a micromicetelor *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. și *Botrytis* spp. în cultură duală cu *Penicillium* spp., în diferite condiții de temperatură

Rezumat. În articol sunt reflectate date cu privire la particularitățile de creștere și dezvoltare a micromicetelor *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *Botrytis cinerea*, în cultură duală cu *Penicillium chrysogenum* în diferite condiții de temperatură. S-a constatat că temperatura manifestă un rol important în creșterea, dezvoltarea și formarea particularităților de interacțiune al micromicetelor studiate.

Cuvinte cheie: micromicete, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., cultură duală, condiții termice.

1. INTRODUCERE

Micromicetele reprezintă organisme eucariote, heterotrofe, ubicuitare, extrem de bogate în specii caracterizate prin structuri și însușiri biologice foarte diverse, fiind lipsite de pigmenti asimilatori [18]. Acestea au un rol important în natură participând în descompunerea substanțelor organice; formează asociații sub formă de micoriză cu rădăcinile

plantelor; au o largă aplicabilitate în industria agro-alimentară, farmaceutică și al altor produse biotehnologice [2]. Efectele dăunătoare ale acestora sunt legate de implicarea unor micromicete ca agenți patogeni cauzali ai maladiilor la plante, animale și om.

Interacțiunile dintre diferite specii de micromicete joacă un rol important în crearea și aplicarea tehnologiilor ecologice în sistemele integrate de protecție a plantelor [1; 8; 11; 14; 16; 17]. Acestea pot varia de la sinergism și mutualism la antagonism și parazitism. Cele din urmă fiind cu succes aplicate în controlul biologic al microorganismelor patogene [3], în baza relațiilor de antibioză, concurență și exploatare [9].

Antibioza este recunoscută ca fiind mecanismul principal al competiției între diferite grupe de microorganisme [6]. Această interacțiune include, adesea producerea de metaboliți biologic activi de către o specie care exercită efecte dăunătoare asupra potențialului de concurență. Studiile arată că astfel de fenomene ecologice conduc la descoperirea noilor metaboliți fungici bioactivi și potențial benefici [5; 7; 9; 10].

Folosirea micromicetelor antagoniste în lupta cu agenții fitopatogeni devine tot mai răspândită în lume. Mecanismele prin care antagoniștii inhibă agenții patogeni nu sunt încă complet elucidate. Se presupune că are loc competiția pentru substanțe nutritive și spațiu. Alte cauze ar putea fi producerea de antibiotice, parazitismul direct și inducerea rezistenței la speciile colonizate [15].

Interacțiunile dintre diferite specii de micromicete pot fi determinate în baza capacităților de creștere și dezvoltare a coloniilor în cultură duală. În baza studiului efectuat de [12], au fost identificate următoarele tipuri de creșteri dintre microfungi: (a) creșterea mai rapidă a unei specii care determină inhibarea progresivă a speciilor cu creștere mai lentă; (b) o creștere inițială mai rapidă a unei specii care este apoi inhibată de specia cu creștere mai lentă; (c) o specie cu creștere mai rapidă decât cealaltă, dar fără efecte adverse; (d) o specie cu creștere inițială mai rapidă decât cealaltă, dar ratele de creștere ale ambelor au scăzut ulterior în timpul interacțiunii; (e) ambele specii inițial au creștere similară, dar rata de creștere a unuia a scăzut în timpul concurenței; și (f) ambele specii au crescut inițial la ritmuri similare, dar ulterior și-au redus creșterea reciprocă.

În formarea particularităților de interacțiune al micromicetelor un rol important îl manifestă disponibilitatea de nutrienți în substrat precum și condițiile de mediu [4; 13].

În contextul vizat, *scopul cercetărilor* a constat în determinarea particularităților de creștere și dezvoltare a micromicetelor *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. și *Botrytis* spp. în cultură duală cu *Penicillium* spp., în diferite condiții de temperatură.

2. METODELE ȘI MATERIALELE APLICATE

Cercetările s-au efectuat în cadrul laboratorului Biotehnologiei ecologice al facultății de Biologie și Chimie, Universitatea de Stat din Tiraspol (Chișinău).

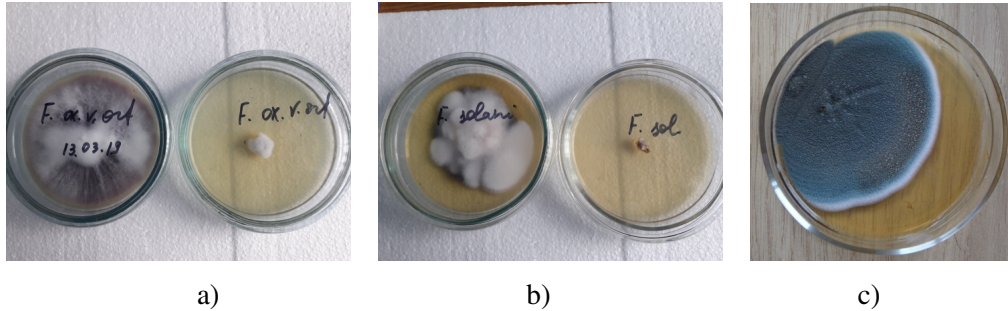


Figura 1. Creșterea și dezvoltarea microfungilor a) *F. oxysporum* var. *orthoceras*, b) *Fusarium solani* și c) *Penicillium chrysogenum*, în condiții temperatură optimă

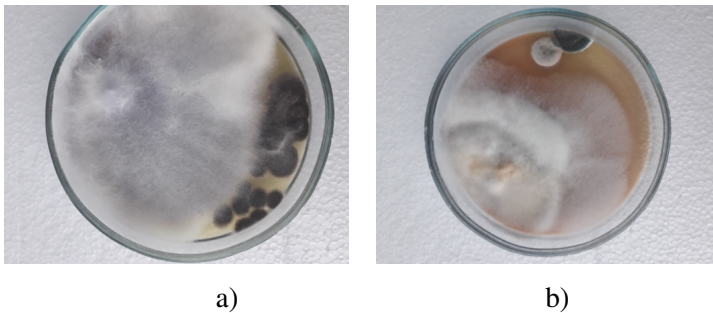


Figura 2. Creșterea și dezvoltarea microfungilor a) *F. oxysporum* var. *orthoceras* și b) *Fusarium solani* în cultură duală cu *Penicillium chrysogenum*, pe fundal de temperatură optimă

În calitate de material pentru cercetare au servit speciile de funghi fitopatogeni: *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *Botrytis cinerea*, izolați din organe ale plantelor cu simptome de boală, și specia cu o largă aplicabilitate biotehnologică - *Penicillium chrysogenum*. Creșterea microfungilor s-a realizat atât în cultură pură (variantele martor) (fig. 1) cât și duală (fig. 2) pe mediul nutritiv Potato Dextrose Agar (PDA), care a fost preparat astfel: cântărirea 39 g mediu pulbere; suspendarea cantității într-un litru de apă distilată și fierbere până la dizolvare completă; turnarea mediului în colbe sterile; sterilizare la 121°C timp de 30 minute. Mediul sterilizat a fost ulterior

turnat în Cești Petri. După solidificare s-a realizat trecerea tulpinilor speciilor de fungi pe mediu cu ajutorul anselor de metal sterile. Experiența s-a realizat la temperatura de 10°C și 25°C (optimă) timp de 14 zile. Eficiența inhibării (E.I) a fost calculată în baza formulei:

$$E.I(\%) = (C - T)/C * 100$$

în care C – dimensiunea coloniilor de micromicete în variant martor; T- dimensiunea coloniilor de micromicete în cultură duală [19].

Procesarea statistică a datelor obținute s-a efectuat în baza analizei *Descriptive Statistics* în pachetul de soft STATISTICA 10.

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele cercetărilor au demonstrat că în varianta martor pe fundal de temperatură optimă creșterea fungilor a fost diferențiată, cele mai mici valori de creștere în diametru înregistrându-se la specia *A. alternata* – 52,5 cm, iar cele mai mari la *F. oxysporum* var. *orthoceras* – 90,9 cm. Fungii *F. solani* și *P. chrysogenum*. au înregistrat valori de 72,0 cm și 67,5 cm, respectiv (fig. 3).

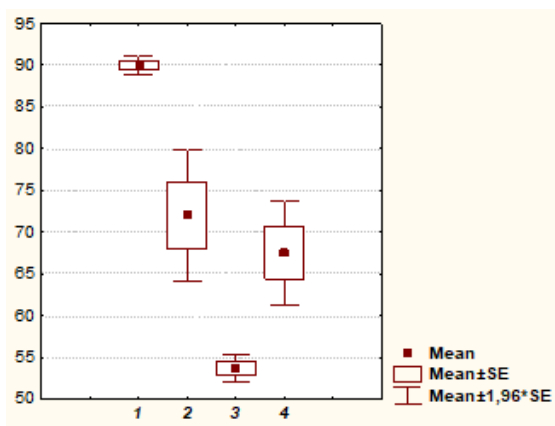


Figura 3. Dezvoltarea microfungilor pe fundal de temperatură optimă 1. *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*, 2. *F. solani*, 3. *Alternaria alternata*, 4. *Penicillium chrysogenum*

În cultură duală, fungii *F. oxysporum* var. *orthoceras* și *P. chrysogenum* au înregistrat valori de 83,0 cm și 44,0 cm, respectiv. În cazul culturii *F. solani* și *P. chrysogenum*, valorile obținute au fost de 63,0 cm și 37,0 cm, respectiv. Fungul *A. alternata* a înregistrat valori de 1,0 cm în cultură duală cu *P. chrysogenum*, acesta din urmă înregistrând valori de

GROWTH AND DEVELOPMENT OF *ALTERNARIA* SPP., *FUSARIUM* SPP. AND *BOTRYTIS* SPP. IN DUAL CULTURE WITH *PENICILLIUM* SPP.

47,0 cm. În varianta culturii duale a fungilor *B. cinerea* și *P. chrysogenum*, sau înregistrat valori de 35,5 cm și 48,0 cm, respectiv (fig. 4).

Astfel eficiența inhibării dezvoltării micromicetelor în cultură duală, comparativ cu varianta martor a variat în limitele 8,69 ... 98,09%, respectiv pentru *F. oxysporum* var. *orthoceras* și *A. alternata*.

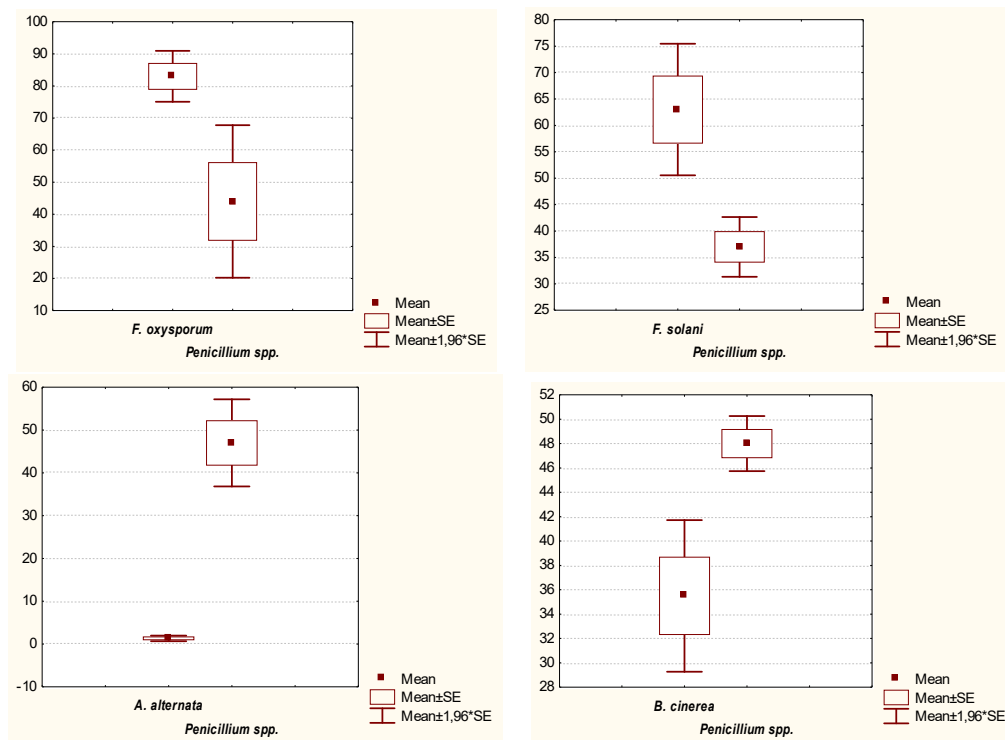


Figura 4. Dezvoltarea microfungilor *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata* și *B. cinerea* în cultură duală cu *Penicillium chrysogenum*, pe fundal de temperatură diminuată (10°C)

Pe fundal de temperatură scăzută (10°C), în varianta martor s-a constatat inhibare a dezvoltării micromicetelor studiate cu 83,9%, 88,2%, 50,5% și 49,6% respectiv la *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *F. solani*, *A. alternata* și *P. chrysogenum*. Astfel fungii au înregistrat valori ale diametrului de 14,5 cm – *F. oxysporum* var. *orthoceras*, 8,5 cm – *F. solani*, 26,0 cm – *A. alternata* și 34,0 cm – *P. chrysogenum* (fig. 5).

În cultură duală, fungii *F. oxysporum* var. *orthoceras* și *P. chrysogenum* au înregistrat valori de 81,0 cm și 27,0 cm, respectiv. În cazul culturii *F. solani* și *P. chrysogenum*, valorile obținute au fost de 59,5 cm și 13,0 cm, respectiv. Fungul *A. alternata* a înregistrat valori de 3,0 cm în cultură duală cu *P. chrysogenum*, acesta din urmă înregistrând valori de

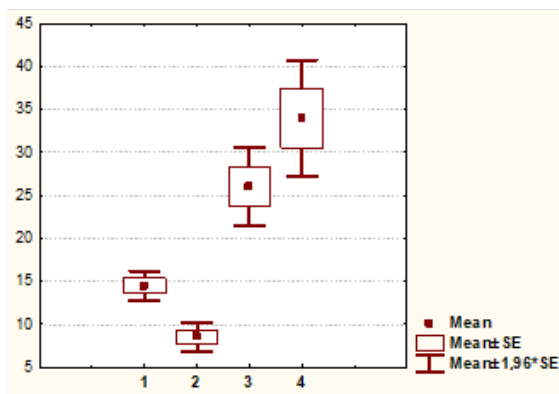


Figura 5. Dezvoltarea microfungilor pe fundal de temperatură optimă 1. *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras*, 2. *Fusarium solani*, 3. *Alternaria alternata*, 4. *Penicillium chrysogenum*

49,0 cm. În varianta culturii duale a fungilor *B. cinerea* și *P. chrysogenum*, sau înregistrat valori de 34,5 cm și 33,0 cm, respectiv (fig. 6).

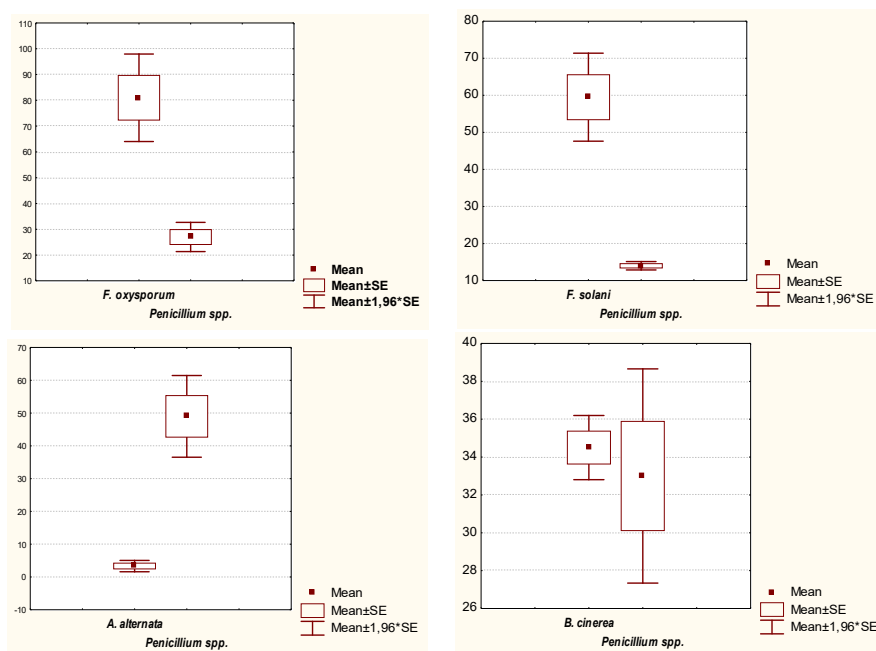


Figura 6. Dezvoltarea microfungilor *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. alternata* și *B. cinerea* în cultură duală cu *Penicillium chrysogenum*, pe fundal de temperatură diminuată (10°C)

În condiții de temperatură diminuată (10°C), cultivarea fungilor în cultură duală a determinat o diminuare a creșterii și dezvoltării coloniilor, cu excepția variantei *A. alternata* și *P. chrysogenum.*, unde s-a atestat o majorare cu +200% și 4,3%, respectiv.

4. CONCLUZII

În rezultatul cercetărilor s-a constatat că pe fundal de temperatură optimă în varianta martor creșterea fungilor a fost diferențiată în dependență de specie, astfel cele mai mici valori de creștere în diametru înregistrându-se la specia *A. alternata*, iar cele mai mari la *F. oxysporum* var. *orthoceras*. Cultivarea fungilor în cultură duală a demonstrat că speciile *F. oxysporum* var. *orthoceras* și *F. solani* au înregistrat o capacitate activă de creștere, inhibând dezvoltarea fungului *Penicillium chrysogenum*.

Pe fundalul temperaturii diminuate (10°C) în varianta martor s-a constatat inhibare a dezvoltării micromicetelor studiate cu 83,9%, 88,2%, 50,5% și 49,6%, respectiv pentru *F. oxysporum* var. *orthoceras*, *F. solani*, *Alternaria alternata* și *P. chrysogenum*. Cultivarea fungilor în cultură duală a determinat o diminuare a creșterii și dezvoltării coloniilor, cu excepția variantei *A. alternata* și *P. chrysogenum*, unde s-a atestat o majorare cu +200% și 4,3%, respectiv.

Studiul a fost realizat în cadrul proiectului de cercetări științifice „Elaborarea noilor materiale multifuncționale și tehnologii eficiente pentru agricultură, medicină, tehnică și sistemul educațional în baza complecșilor metalelor „s” și „d” cu liganzi polidentati”, inclus în „Program de stat” (2020-2023), Prioritatea V: Competitivitate economică și tehnologii inovative, cifrul 20.80009.5007.28, cu suportul financiar oferit de ANCD.

BIBLIOGRAFIE

- [1] CEKALOVA, C. Razrabotka novojpreparativnojformybiologičeskih fungicydovna osnove kletok mikroorganizmov Trichoderma viride i Pseudomonas fluorescens: Avtoref. dis. ... kand. biologiceskih nauk. Moskva, 2007, 162 p.
- [2] DIX, N., WEBSTER, J. Fungal ecology. London. Chapman and Hall. Volume 45 Issue 3, 1995, p. 332-333.
- [3] DUFFY, B., SCHOUTEN, A., RAAIJMAKERS, J. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41, 2003, p. 501–538, Doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606
- [4] FERREIRA, V., GONCALVES, A., PRATAS, J., CANHOTO, C. Contamination by uranium mine drainages affects fungal growth and interactions between fungal species and strains. *Mycologia*, 2010, 102:1004–11. pmid:20943501
- [5] GLOER J. The chemistry of fungal antagonism and defense. *Canadian Journal of Botany* 73, 1995, p. 1265–1274. Doi:10.1139/b95-387

- [6] GOMATHI, S., AMBIKAPATHY, V. Antagonistic activity of fungi against *Pythium debaryanum* (Hesse) isolated from chilli field soil. *Advances in Applied Science Research* 2(4), 2011, p. 291–297.
- [7] HAGGAG, W., MOHAMED, A. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 1, 2007, p. 7–12.
- [8] IURCENCO, E., GRACEOVA, N., NICIPORENCO, V. Vozmoznosti biologizirovannogo kontrola novogo patogena vinogradnikov Zapadnogo Predkavkaza *Alternaria tenuissima*. 2013. Disponibil: <http://journal.kubansad.ru/pdf/11/06/14.pdf>
- [9] KHARA, H., HADWAN, H. Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Plant Disease Research* 2, 2008, p. 144–147.
- [10] KIERS, E., DENISON, R. Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39. 2008, p. 215–236.
- [11] MELIHOV, V., ASTAHOV, A., NAVITNEAEV, A., CARENGHINA, T. Sposob vyrasivania kartofela sispoli'zovaniemiotehnologij: *PatentRossii Nr.2291608*, 2007.
- [12] RAMAKRISHNA, N., LACEY, J., SMITH, J. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. *Mycological Research* 97(11), 1993, p. 1393–1402, Doi:10.1016/S0953-7562(09)80175-5.
- [13] SCHONEBERG, A., MUSA, T., VOEGELE, R., VOGELGSANG, S. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. *J Appl Microbiol*, 2015, 118:1165–79. pmid:25692943
- [14] SERBAKOVA, T., POPUȘOI, I., ODOBESCU, V. Antagonisticeskaia aktivnosti griba *Trichoderma virens* po otnoseniu c patogenami *Sclerotinia sclerotiorum* i *Fusarium* spp. In: *Buletinul AȘM. Științele vieții*, nr. 1(310), 2010, p. 106-112.
- [15] SHARMA, R., SINGH, D., SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists. *Biological control*. vol. 50, issue 3, 2009, p. 205-221.
- [16] SÎRBU, T., MASLOBROD, S., BURȚEVA, S. Acțiunea exometabolitilor de micromicete asupra productivității plantelor agricole. *Știința agricolă*, nr. 2 (2013). p. 8-12.
- [17] TAVKELOVA, E., KLIMOVA, S., CERDYNCEVA, T., NETRUSOV, L. Mikroorganizmy – producenty stimulatorovrosta rastenij i ihpraktičeskoeprimenenie. V: *Prikladnaâ Biohimiâ i Mikrobiologiâ*, t. 42, nr. 2, 2006, p. 133-143.
- [18] ULEA E. Microbiologie (suport de studiu i.d), Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu de la Brad” Iași, 2015, 172 p.
- [19] https://www.researchgate.net/post/Problems_during_trichoderma_dual_culture_please_give_some_advises

(Grigorcea Sofia, Nedbaliuc Boris, Chiriac Eugenia, Nicolai Aluchi, Grigorcea Dmitrii) CATEDRA
BIOLOGIA VEGETALĂ, UNIVERSITATEA DE STAT DIN TIRASPOL
E-mail address: sofia.grigorcea@gmail.com, boris.nedbaliuc@gmail.com