

# I.METODE ȘI TEHNICI DE LABORATOR ÎN FITOPATOLOGIE

## 1. Aparatură, sticlărie și instrumentar de laborator

### Aparatură de laborator

În laboratorul de fitopatologie, precum în orice laborator de microbiologie, trebuie să existe aparatură de strictă necesitate, precum: microscop, stereomicroscop, lupă, termostat, etuvă, frigider, autoclav etc.

**Microscopul.** Aparatul de bază într-un laborator de fitopatologie este microscopul. Bacteriile și marea majoritate a ciupercilor, exceptând macromicetele, sunt de dimensiuni mici și pot fi examinate numai cu microscopul.

Examinarea preparatelor la microscopul optic se realizează prin diferite metode (examinare directă, examinare în câmp întunecat, examinare în lumină fluorescentă etc.).

În cercetarea științifică, microscopul electronic a câștigat tot mai mult teren. Astfel, în numeroase laboratoare de micologie, bacteriologie și virologie, studiul structurii agenților fitopatogeni se realizează și cu ajutorul microscopului electronic.

**Stereomicroscopul.** Acest aparat servește la cercetarea obiectelor netransparente, folosind lumina reflectată, naturală sau electrică. Stereomicroscopul este folosit în fitopatologie pentru studierea simptomelor de boală, cauzate de agenții patogeni, ale caracterelor morfologice ale sporulației, în special în cazul ciupercilor, pentru identificarea speciei parazite pe plante.

**Termostatul.** Este un aparat de strictă necesitate, în laboratoarele care lucrează cu microorganismele. Este cunoscut faptul că agenții patogeni se dezvoltă și se înmulțesc între anumite limite de temperatură, specifice fiecărui gen sau chiar specie (Hulea, 1969).

**Etuva de sterilizare.** Este folosită pentru sterilizarea sticlăriei de laborator și a tuturor obiectelor (din porțelan, de metal, fără suduri cu cositor etc.), care suportă temperatura uscată și ridicată. La etuvă nu se pot steriliza obiectele de cauciuc, vată, seringile de plastic și altele. Sterilizarea prin căldură uscată se efectuează, de obicei, la 160°C timp de două ore, de la atingerea acestei valori sau la 180°C, timp de o oră.

**Lupele.** Pentru cercetări mai rapide și grosiere ale plantelor, care prezintă simptome de îmbolnăvire, se pot folosi lupe (de buzunar, de mână), atât în laborator, cât și în seră și câmpul de cultură.

**Frigiderul.** Este indispensabil pentru păstrarea mediilor necesare cultivării agenților fitopatogeni, a serurilor, a unor culturi de microorganismе și a oricărui material vegetal infectat care nu poate fi analizat imediat.

**Autoclavul.** Este folosit pentru sterilizarea, prin vapori sub presiune, a mediilor de cultură, a pământului, a soluțiilor nutritive și a oricărui alt material care nu suportă temperatură ridicată și uscată. De asemenea, autoclavul se folosește la sterilizarea vaselor cu culturi de microorganismе, înainte de a fi golite și spălate. Această sterilizare este obligatorie, pentru a evita vicierea atmosferei din laborator, dar și pentru a proteja sănătatea lucrătorilor care spală sticlăria. La introducerea obiectelor în autoclav, se va asigura spațiul necesar, pentru o bună circulație a vaporilor și realizarea unei bune sterilizări.

Între presiunea vaporilor și temperatura din autoclav există o corelație pozitivă (Tab. 1). Sterilizarea materialelor contaminate se face cel puțin 20 minute la 121°C (Constantinescu, 1974).

*Tabelul 1*

**Corelația dintre temperatură (°C) și presiune (atm.)**

(după Constantinescu, 1974)

°C	108	116	120	121	122	127
atm.	0,34	0,67	0,96	1,01	1,28	1,35

Controlul sterilizării în autoclav se face cu un indicator bacterian sau cu un indicator chimic.

**Lampa cu radiații ultraviolete.** Dezinfecția prin radiații ultraviolete (UV) este indicată pentru boxe de înșămânțare (la microbiologie), săli de aplicare a unor tratamente etc. (Măgureanu și colab., 1988). Din cauza puterii reduse de pătrundere, radiațiile UV sunt folosite pentru dezinfecția aerului în spații relativ mici și a unor suprafețe netede. Pentru sterilizarea încăperii, se aprinde lampa și se lasă să funcționeze 2 ore, înainte de începerea lucrului în boxa de înșămânțare.

**Sticlărie de laborator**

Pentru realizarea experiențelor, în laboratorul de fitopatologie se folosesc diferite vase de sticlă: eprubete, tuburi Roux, flacoane Erlenmeyer, vase (plăci, cutii) Petri. De asemenea, în laborator se mai folosesc pipete gradate, lame de sticlă, lamele etc.

Pentru desfășurarea activității în condiții optime, trebuie să existe și să fie folosită sticlărie de laborator adecvată și sterilă. Orice resturi de

substanțe sau impurități pe pereții sticlăriei pot denatura rezultatele experimentale.

Spălarea vaselor de laborator, atunci când nu apar situații speciale, se realizează cu parcurgerea etapelor: spălare cu amestec cromatic; spălare cu apă și detergent; clătire cu apă; clătire cu apă distilată sau alcool etilic; uscare în etuvă sau cu curent de aer.

Pentru spălare, se folosesc apă caldă, cu adaos de carbonat de sodiu 1-2% sau detergent și perii adecvate pentru instrumente și sticlărie. Tubulatura de cauciuc se spală prin brasaj (Măgureanu și colab., 1988).

Vasele de laborator (eprubete, cutii Petri etc.) care conțin microorganisme se sterilizează la autoclav, înainte de spălare.

### **Instrumentar de laborator**

Pentru desfășurarea activității într-un laborator de fitopatologie, trebuie să existe un instrumentar de strictă necesitate. Astfel, acesta include: ace și anse de însămânțat, bisturiu, spatule, pensete etc.

Cercetarea microorganismelor fitopatogene necesită aproape întotdeauna cultivarea lor în condiții de laborator, pe medii de cultură sau pe alte materiale. Pentru realizarea unei activități eficiente în laboratorul de fitopatologie, este necesară o dotare corespunzătoare a acestora, dar și personal de specialitate bine instruit.

## **2. Metode de apreciere a atacului și a pagubelor produse de agenții fitopatogeni**

În procesele de infecție și de manifestare a simptomelor bolii la plante, se disting două momente principale: atacul și dauna (paguba).

Atacul este reprezentat valoric prin **frecvență**, **intensitate** și **grad de atac** (Oroian, 2004).

**Frecvența** (F) atacului este valoarea relativă a numărului (n) de plante sau organe ale plantei atacate de un agent fitopatogen (virus, bacterie, ciupercă) raportate la numărul (N) de plante sau organe observate. Valoarea frecvenței se obține prin observații directe asupra unui număr de plante sau organe. Datele obținute se calculează după relația:

$$F = \frac{n \times 100}{N}$$

**Intensitatea** (I) atacului reprezintă valoarea prin care este dat gradul de acoperire sau de extindere a atacului, raportând suprafața atacată față de suprafața totală observată. Pentru redarea intensității atacului se

folosesc scări ce pot avea un număr diferit de clase de notare. În majoritatea cazurilor, în țara noastră se folosește scara cu 4, 5 sau 6 clase de intensități ale atacului. Aceste clase corespund unor anumite intervale de procente ale intensității atacului (Tab. 2). Expresia relativă a intensității atacului este dată de relația:

$I = \Sigma (ixf)/n$ , în care:

i = nota sau suprafața atacată (%);

f = numărul de cazuri cu atac la fiecare notă;

n = numărul total de cazuri cu atac.

*Tabelul 2*

**Scara de notare a intensității atacului la bolile plantelor**

Suprafața atacată (%)	Nota intensității atacului
1-3	1
4-10	2
11-25	3
26-50	4
51-75	5
76-100	6

Spre exemplu, dacă într-o observație avem următoarele cazuri:

74 cazuri cu 3% = nota 1

23 cazuri cu 10% = nota 2

18 cazuri cu 25% = nota 3

14 cazuri cu 50% = nota 4

13 cazuri cu 75% = nota 5

11 cazuri cu 100% = nota 6

$$I = \Sigma(ixf)/n = (3 \times 74) + (10 \times 23) + (25 \times 18) + (50 \times 14) + (75 \times 13) + (100 \times 11) / 153 = 3675 / 153 = 24,04\%$$

**Gradul de atac (GA)** este expresia extinderii gravității atacului culturii sau numărul total de plante la care efectuăm observațiile.

Expresia valorică a acestuia este dată de relația:

$$GA = F \times I / 100$$

**Dauna** sau paguba este exprimată prin noțiunea “grad de dăunare” (GD). Aceasta reprezintă valoric pierderea relativă a cantității de recoltă la o plantă sau cultură atacată în raport cu recolta obținută de la o plantă sau cultură neatacată (sănătoasă). Dauna este redată prin relația:

$GD = (s-b/s) \times 100 = (1-b/s) \times 100$ , în care  
 s=producția plantei sau culturii sănătoase;  
 b=producția plantei sau culturii bolnave.

Presupunând că la o parcelă cu viță de vie, producția a fost de 8000 kg la hectar, pe o suprafață fără atac, iar la altă suprafață atacată numai de 3000 kg, gradul de dăunare este:

$$GD = (1 - 3000/8000) \times 100 = 62,5\%$$

**Pragul economic de dăunare (PED).** Prin prag economic de dăunare se înțelege nivelul de atac al agenților patogeni, respectiv valoarea pagubelor din recoltă, la care trebuie aplicat tratamentul (Tab. 3).

Tabelul 3

**Pragul economic de dăunare (PED) al unor agenți fitopatogeni la care se aplică tratamente de avertizare**

Planta cultivată	Fenofaza plantei	Agentul patogen	PED (paguba, % din recoltă)
<i>Triticum</i> spp.	Înflorire	<i>Puccinia striiformis</i>	2,5
	Coacere în lapte	<i>Puccinia recondita</i>	3,0
	Maturitatea cariopselor	<i>Puccinia graminis</i>	1,0
<i>Zea mays</i>	Formarea fructului (atac pe știuleți) Apariția mătăsii	<i>Ustilago maydis</i>	5,0
		<i>Helminthosporium turcicum</i>	2,5
<i>Oryza sativa</i>	Maturitate	<i>Piricularia oryzae</i>	1,0
<i>Helianthus annuus</i>	Înflorire	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5,0
<i>Beta vulgaris</i>	Creșterea în greutate a rădăcinilor	<i>Cercospora beticola</i>	1,0
		<i>Peronospora schachtii</i>	2,0

Conform cu PED, agentul fitopatogen a produs deja pagube (de 1-5%) recoltelor, egale cu costul tratamentelor și se prognozează condiții favorabile ce pot imprima bolii un caracter epidemic (Oroian, 2004).

Valoarea pagubei din recoltă, la care trebuie avertizate tratamentele chimice, este cuprinsă între 1-5%. Aceasta este diferită, între limitele men-

ționate, în funcție de planta cultivată, fenofaza dezvoltării ei și agentul patogen (Tab. 3).

**Eficacitatea tratamentelor.** În aprecierea măsurilor de combatere a bolilor la plante, o importanță practică deosebită prezintă cunoașterea eficacității tratamentelor. Eficacitatea (E) tratamentelor se calculează după relația:

$$E = 1 - \frac{Gav}{GAMt} \times 100$$

E = eficacitatea;

Gav = grad de atac la varianta tratată;

GAMt = grad de atac la martor netratat.

Determinarea frecvenței, intensității și a gradului de atac are o importanță deosebită în evaluarea pagubelor produse, în estimări de producție pe parcursul vegetației, în stabilirea ritmului de aplicare a tratamentelor, precum și în stabilirea eficacității diferitelor metode și mijloace de protecție a culturilor împotriva agenților fitopatogeni (Rădulescu și Rafailă, 1967).

### 3. Măsuri și metode de combatere a bolilor la plante

În combaterea bolilor (viroze, bacterioze, micoze, antofitoze) la plante, se folosesc diferite măsuri: agrofitehnice, fizico-mecanice, chimice, biologice, legislative (de carantină fitosanitară), de prognoză și avertizare (Oroian și Oltean, 2003).

Măsurile de combatere a agenților fitopatogeni pot fi preventive (profilactice) și curative (terapeutice). Aplicarea măsurilor de protecție a plantelor se realizează pe mai multe căi numite **metode**. Pentru aplicarea unei măsuri de combatere pot exista una sau mai multe metode.

#### 3.1. Măsuri agrofitehnice

Aceste măsuri sunt cele mai vechi și în același timp cele mai eficiente, în ceea ce privește prevenirea bolilor la plante. Ele mai sunt cunoscute sub denumirea de măsuri culturale sau măsuri de igiena plantelor. Prin aceste măsuri (alegerea terenului de cultură, pregătirea terenului, distrugerea samulastrei, rotația culturilor, cultivarea de soiuri rezistente, folosirea de sămânță sănătoasă etc.) se creează condiții nefavorabile dezvoltării agenților fitopatogeni și se mărește rezistența plantelor față de boli (Pârnu, 1996).

### 3.2. Măsurile fizico-mecanice

În general, măsurile fizico-mecanice sunt simple și eficiente. Aceste măsuri au aplicare restrânsă, dar sunt de perspectivă, fiind nepoluante. În vederea combaterii paraziților vegetali, se folosesc ca agenți fizici: temperatura, lumina solară și radiațiile.

#### Temperatura

Temperatura ridicată – căldura – este folosită la dezinfectarea solului și a semințelor. Prin această metodă se distrug prin ardere plantele bolnave și resturile de plante rămase pe câmp după recoltare, se devirozează butașii și materialul săditor.

**Dezinfectarea termică a solului.** Prin aceasta se obțin rezultate bune în combaterea ciupercilor și bacteriilor fitopatogene termosensibile. Durata tratamentului termic și valoarea temperaturii diferă în funcție de punctul termic de inactivare a agentului patogen.

În dezinfectarea termică a solului sunt folosite mai multe metode.

**Sterilizarea prin căldură uscată a terenului de cultură a plantelor în câmp.** Această metodă nu are posibilități mari de aplicare. În această categorie, poate intra vechea practică de ardere a resturilor vegetale, după recoltare.

**Sterilizarea prin căldură uscată a solului din sere.** Este o metodă simplă și se aplică ușor în practică. Se folosește pentru dezinfectarea cantităților mici de pământ necesare în răsadnițe și sere. Sterilizarea se face prin încălzirea pământului (la peste 80°C) pe foi de tablă.

**Sterilizarea prin căldură umedă.** Această metodă se folosește la dezinfectarea ghivecelor, a utilajelor mici, care se introduc timp de 5-10 minute în apă clocotită. Pentru suprafețe mici de răsadnițe și sere se poate aplica opărirea solului prin turnare de apă clocotită (10 l/m<sup>2</sup>). Înainte de a se realiza dezinfecția termică, se sapă solul pe o adâncime de 30-40 cm, se scot rădăcinile sau alte resturi de plantă și se mărunțesc bulgării de pământ, până la dimensiuni de 5-6 cm. Totodată, se dezinfectează chimic scheletul intern al serei.

**Sterilizarea prin aburi.** Această metodă se aplică pentru dezinfectarea unor cantități mici de pământ sau pentru solul de la locul definitiv (răsadnițe, sere). În timpul sterilizării, aburii circulă în pământ până la cel puțin 30-40 cm adâncime, timp de 60 minute. Temperatura solului, în timpul tratamentului, este de 75-80°C.

La tratarea pe cale termică, în special când se folosește metoda sterilizării prin aburi, trebuie să se țină seama de faptul că, în afară de

agenții fitopatogeni, sunt distruse și o serie de microorganisme folositoare din sol. De aceea, plantarea pământului se face după 15 zile de la sterilizare, perioadă de timp în care se reface microflora utilă.

**Dezinfectarea termică a semințelor.** Prin intermediul tratamentului termic se pot combate agenții patogeni care se transmit prin sămânță. Pentru tratarea termică a semințelor se folosesc diferite metode: metoda tratării cu apă caldă, metoda tratării cu căldură (aer) uscată etc.

Durata tratamentului termic diferă în funcție de specia patogenă și metoda de dezinfecție folosită.

Este necesar ca tratamentul termic să fie realizat în întreprinderi specializate, deoarece există diferențe mici de valoare, între temperatura de inactivare a agenților patogeni și cea care distruge embrionul seminței.

### **Lumina solară**

În combaterea unor agenți patogeni se folosește lumina solară (**helioterapia**). Tuberculii de cartof expuși la soare timp de 3-4 zile se clorofilizează și sunt mai rezistenți față de agenții patogeni (*Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* etc.), care produc putregaiuri în depozite.

### **Radiațiile**

Diferite radiații (gamma, beta, infraroșii, ultraviolete) au fost experimentate cu succes în combaterea agenților patogeni. Aceste radiații inactivează și distrug o serie de agenți patogeni (virusuri, bacterii și ciuperci).

### **Mijloacele mecanice**

Pentru înlăturarea unor paraziți de pe suprafața plantelor și îndepărtarea organelor vegetative bolnave se folosesc mijloace mecanice. Această măsură de combatere se poate realiza prin metode diferite: extirparea, curățirea trunchiurilor, decuscutarea, sortarea plantelor sănătoase de exemplarele bolnave etc.

### **Electricitatea**

Ca și alte surse de încălzire, electricitatea poate fi folosită la sterilizarea solului prin încălzire directă sau prin încălzire indirectă.



Metoda sterilizării prin încălzire indirectă a solului sau prin imersiune se aplică în instalații speciale de forma unor cutii, în care se introduce pământul de sterilizat.

Metoda sterilizării prin încălzirea directă a solului, cu ajutorul electricității, se bazează pe principiul trecerii curentului direct prin sol. În timpul sterilizării, temperatura pământului care se pune în instalații speciale ajunge la 70°C și durează 30 minute (Popescu, 1993).

### **Mijloacele electronice**

Aparatele electronice se folosesc pentru elaborarea avertizărilor, sortarea semințelor și în efectuarea tratamentelor chimice etc. Unele aparate electronice servesc la separarea semințelor necorespunzătoare de cele sănătoase, pe baza diferenței de culoare.

Tot cu ajutorul aparatelor electronice, poate fi dirijată soluția fitofarmaceutică numai asupra plantelor pe care vrem să le tratăm (Popescu, 1993).

### **3.3. Măsuri chimice**

Combaterea chimică constituie și în prezent un mijloc important pe care practica agricolă îl are la dispoziție pentru reducerea pagubelor produse de agenții fitopatogeni. Astfel, în combaterea speciilor *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans*, *Tilletia* spp. și altele, trebuie să se aplice tratamente chimice, fără de care nu se poate garanta producția plantelor cultivate.

#### **3.3.1. Noțiuni generale despre produsele farmaceutice folosite în protecția plantelor**

Măsurile chimice se bazează pe folosirea unor substanțe toxice pentru paraziții vegetali. Produsele chimice preparate pe baza acestor substanțe active se numesc produse antiparazitare și fac parte din categoria produselor fitofarmaceutice.

Clasificarea produselor fitofarmaceutice se face după mai multe criterii. După agentul patogen de combătut (virusuri, bacterii, ciuperci), se clasifică în virusocide (produse antivirale), bactericide și fungicide. În funcție de locul unde acționează, aceste produse sunt exoterapeutice (de suprafață, de contact) și endoterapeutice (sistemice).

După natura lor chimică, substanțele și produsele fitofarmaceutice sunt anorganice și organice. Dintre produsele fitofarmaceutice anorganice utilizate în protecția plantelor menționăm: produse pe bază de cupru

(**Zeamă bordeleză, Champion 50 WP, Kocide 101, Oxicig 50 PU** etc.), produse pe bază de sulf (**Polisulfură de calciu, Kumulus S, Sulfomat PU, Microthiol, Thiovit** etc.).

Dintre numeroasele produse organice fitofarmaceutice menționăm: **Dithane M45** (mancozeb 80%), **Polyram combi** (metiram 80%), **Benlate 50 WP** (benomil 50%), **Topsin 70 PU** (metil tiofanat 70%), **Sumilex 50 PU** (procimidon 50%), **Anvil 5 SC** (hexaconazol 50g/l), **Systhane 12,5 CE** (miclobutanil 125g/l), **Tilt 250 CE** (propiconazol 250 g/l), **Curzate super C** (cimoxanil 4,5%+ mancozeb 68%) etc.

De la aplicarea ultimului tratament până la darea în consum a produselor vegetale tratate, este necesar să treacă o perioadă de timp în care produsul fitofarmaceutic folosit se degradează și devine netoxic pentru consumator. Această perioadă de timp se numește  **timp de pauză**.

Pentru fiecare produs fitofarmaceutic folosit în protecția plantelor este stabilită o toleranță – limita maximă admisibilă (**LMA**). Aceasta (**LMA**) se stabilește pentru ca produsele agricole tratate să poată fi consumate, fără a fi afectată sănătatea consumatorilor.

**LMA** se exprimă în părți per milion (ppm) și este de 100 ori mai mică decât concentrațiile sau dozele care, administrate în hrana animalelor de experiență, le produc primele tulburări (Baicu și Șesan, 1996).

Respectarea timpilor de pauză, în mod normal asigură și respectarea limitelor maxime admisibile pentru produsele fitosanitare (Baicu și Șesan, 1996).

La aplicarea tratamentelor chimice se ține cont de remanența reziduurilor de pesticide, de timpul de pauză și de limita maximă admisibilă (**LMA**).

### **3.3.2. Metode de aplicare in vivo a produselor fitofarmaceutice**

Produsele fitofarmaceutice se folosesc în practică pentru tratarea semințelor, a tuberculilor, bulbilor și rizomilor la plante. De asemenea, aceste produse se aplică pe plante în timpul perioadei de vegetație. Unele produse fitofarmaceutice se folosesc pentru dezinfectarea solului pe cale chimică.

#### **3.3.2.1. Metode de tratare a semințelor**

Tratarea pe cale chimică dă rezultate bune, în practică, în combaterea agenților patogeni localizați pe sămânță sau în aceasta. În funcție de substanța activă a produsului folosit, de semințele de tratat, de biologia

agenților fitopatogeni și altele, tratarea sau dezinfectarea chimică a semințelor se face prin mai multe metode.

**Metoda tratării uscate** (prin prăfuire). Această metodă constă în acoperirea semințelor cu produse fitofarmaceutice, sub formă de pulberi, care aderă pe suprafața tegumentului seminal. În practică, o importanță deosebită pentru dezinfectarea semințelor prezintă produsele sistemice. Acestea protejează embrionul și plantulele tinere de acțiunea agenților fitopatogeni localizați în sămânță.

**Metoda tratării umede.** Metoda se bazează pe folosirea de produse fitofarmaceutice, sub formă de soluții sau suspensii, în care se introduc semințele de tratat. Această metodă prezintă avantajul unei economii de substanță activă și al unei dezinfectări complete. Tratarea pe cale umedă se recomandă în zonele aride, cu solul uscat în momentul semănării.

**Metoda tratării prin mocirlire.** Această metodă este folosită pentru a realiza pe suprafața semințelor un strat mai consistent de produs. Produsul fitofarmaceutic se prezintă sub formă de suspensie densă într-o cantitate mică de apă și se amestecă cu sămânța (Șandru, 1996).

### 3.3.2.2. Metode de tratare a tuberculilor, bulbilor și rizomilor

Aceste metode de tratare se aplică frecvent la plantele horticole, pentru dezinfectarea chimică a tuberculilor, bulbilor și rizomilor. În funcție de produsul utilizat, tratamentele chimice se aplică pe cale umedă sau prin prăfuire.

#### 3.3.2.3. Metode de dezinfectare chimică a solului

Dezinfectarea solului pe cale chimică are drept scop distrugerea agenților fitopatogeni (bacterii, ciuperci), insectelor, nematozilor etc. care atacă plantele. Tratamentele chimice se aplică cu precădere solului din sere și răsadnițe, dar și în câmpul de cultură al plantelor horticole. Dezinfectarea chimică a solului se realizează prin metoda tratării umede și metoda tratării uscate (prin prăfuire).

**Tratarea solului pe cale umedă.** Această metodă se bazează pe stropirea solului cu o soluție sau o suspensie a produsului fitofarmaceutic, până la o adâncime de 20 cm.

În tratarea solului din sere și răsadnițe se folosește frecvent **Formalină** 1,0 %. Pentru dezinfectarea solului se folosesc 10 l soluție (de **Formalină** 1,0 %)/m<sup>2</sup>, apoi se acoperă pământul tratat timp de 2-3 zile pentru sudație. Însămânțarea solului se face după cel puțin 12-15 zile, de la aplicarea tratamentului (Șandru, 1996).

Înainte sau după semănat, pământul din răsadniță poate fi dezinfectat cu **Previcur N**. Pentru dezinfectarea solului, se folosesc 2-3 l soluție de **Previcur N** 0,25%/m<sup>2</sup> (Șandru, 1996).

**Tratarea solului pe cale uscată.** Prin această metodă, se realizează dezinfectarea chimică a solului, folosindu-se produs fitofarmaceutic sub formă de pulbere. Produsul fitofarmaceutic este încorporat în sol prin săpare, până la o adâncime de 20 cm sau prin amestecarea pământului prin lopățare. De exemplu, pentru dezinfectarea solului prin prăfuire, se folosește **Basamid** 200 g/m<sup>3</sup> de pământ sau 20-50 g/m<sup>2</sup>. Acest produs este eficient împotriva ciupercilor fitopatogene tericole și nematozilor la plante. După aplicarea tratamentului chimic, timpul de așteptare, până la folosirea amestecului de pământ, este de 10-30 zile, în funcție de temperatura solului. Timpul de așteptare crește, la temperaturi mai scăzute de 15-20°C (Șandru, 1996).

#### 3.3.2.4. Metode de tratare a plantelor în timpul perioadei de vegetație

Aplicarea produselor fitofarmaceutice pe plante se realizează prin diferite metode.

**Metoda tratării umede.** Această metodă constă în aplicarea produselor fitofarmaceutice sub formă lichidă (soluție, suspensie, emulsie) și poate fi realizată, în practică, sub diferite forme: stropit, pulverizare, ceață toxică.

**Metoda tratării prin prăfuire.** Aplicarea produselor fitofarmaceutice pe plante, prin prăfuiri, asigură o mai bună pătrundere a pulberii în interiorul vegetației stufoase. De asemenea, această metodă asigură o distribuție mai uniformă a particulelor pe suprafața tratată.

#### 3.3.3. Testarea acțiunii in vitro a produselor fitofarmaceutice

Pentru testarea acțiunii in vitro, a produselor farmaceutice asupra agenților fitopatogeni, se folosesc diferite metode.

##### Metoda includerii produsului în mediul de cultură

Prin această metodă se testează acțiunea in vitro a produselor fitofarmaceutice asupra agentului fitopatogen (bacterie, ciupercă) cultivat pe mediu de cultură. Pentru fiecare produs testat se realizează mai multe concentrații. La fiecare concentrație a produsului fitofarmaceutic, se fac mai multe repetiții. Pentru cultivarea speciilor studiate se folosesc medii

nutritive solidificate (maț-agar, cartof-dextroză-agar, Czapek-agar etc.) sau lichide.

În cazul folosirii unui mediu ce se solidifică, acesta se distribuie, după includerea produsului fitofarmaceutic, cel mai frecvent în vase Petri. Inoculul speciei pe care o cercetăm se plasează cu acul de însămânțare în mijlocul vasului Petri (metoda însămânțării în punct central). Periodic, la intervale egale de timp, se fac observații asupra mărimii, aspectului coloniei pe suprafața mediului, sporulației, dacă este cazul, comparativ cu martorul, fără produs fitofarmaceutic. Rezultatele obținute se interpretează statistic (testul student, ANOVA etc.).

Pe baza rezultatelor obținute se stabilește concentrația limită de toxicitate și concentrația letală a produsului fitofarmaceutic asupra speciei studiate.

Metoda includerii în mediul de cultură se poate folosi și pentru testarea acțiunii *in vitro* a altor produse (antibiotice, extracte vegetale etc.) asupra agenților fitopatogeni.

### 3.4. Măsurile biologice

Combaterea biologică a agenților fitopatogeni se realizează prin hiperparazitism, antagonism microbial, imunizarea plantelor și altele.

**Hiperparazitismul.** Combaterea agenților fitopatogeni cu ajutorul paraziților naturali (bacteriofagi, ciuperci), denumiți hiperparaziți, a dat rezultate bune și prezintă perspective de extindere în practică. Cele mai cunoscute cazuri de hiperparazitism sunt micoparazitismul și bacteriofagia.

**Micoparazitismul** este un fenomen biologic întâlnit frecvent în natură. Ciupercile hiperparazite au o virulență pronunțată și inhibă dezvoltarea, reproducerea și răspândirea speciilor fungice pe seama cărora se dezvoltă. De exemplu, *Trichoderma viride* reprezintă principala specie micoparazită și antagonistă, folosită ca mijloc de prevenire și combatere biologică a diferitelor specii de ciuperci fitopatogene. *Coniothyrium minitans* este un hiperparazit al fungilor (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis* spp.) formatori de scleroți.

**Bacteriofagia** este un fenomen biologic care se bazează pe distrugerea unor bacterii fitopatogene de către virusuri denumite bacteriofagi.

**Antagonismul microbial.** Între diferite microorganisme (bacterii, ciuperci) din natură există relații antagoniste. Aceste relații au la bază concurența sau anabioza. S-a constatat că pentru fiecare agent patogen există microorganisme antagoniste. Antagonismul microbial este utilizat în practică, pentru combaterea unor agenți patogeni.

Studierea relațiilor (micoparazitismul, antagonismul microbial etc.) între diferite specii de microorganisme, care se pot cultiva pe medii nutritive, se realizează prin metoda culturilor duble. Această metodă constă în însămânțarea în același vas Petri cu mediu nutritiv agarizat a câte două specii ale căror interrelații sunt observate in vitro.

**Antibioticele.** Acestea sunt produși ai metabolismului unor microorganisme care distrug selectiv sau împiedică multiplicarea altor organisme patogene. În combaterea agenților fitopatogeni, s-au experimentat și s-au folosit în practică, pe scară mică, numai câteva antibiotice, datorită costului foarte ridicat al acestor tratamente (Pârvu, 1996).

### 3.5. Măsuri de carantină fitosanitară

Carantina fitosanitară reprezintă un ansamblu de măsuri care se iau pentru a preveni răspândirea paraziților vegetali, dăunătorilor și buruienilor (“obiectelor de carantină”), deosebit de periculoși, dintr-o țară în alta sau dintr-o regiune în alta. Carantina fitosanitară este de două tipuri: externă și internă.

### 3.6. Măsuri de prognoză și avertizare

Un rol important în prevenirea și combaterea bolilor la plante au măsurile de **prognoză și avertizare**.

Prin **prognoză** se înțelege stabilirea anticipată a datei apariției în masă a agenților fitopatogeni, în anumite perioade de timp și pe anumite teritorii, precum și estimarea gravității atacurilor pe care le pot produce.

**Avertizarea** constă în determinarea momentului optim de aplicare a tratamentelor, a metodelor și mijloacelor eficiente pentru combatere, în funcție de biologia agentului patogen, fenofaza plantei gazdă și condițiile climatice locale.

## 4. Metode și tehnici de lucru în studiul virusurilor fitopatogene

Pentru studiarea virusurilor fitopatogene, se folosesc diferite metode. Dintre acestea, în continuare vor fi prezentate câteva metode uzuale folosite în virologia vegetală.

### 4.1. Metode de determinare a caracteristicilor biologice

Virusurile fitopatogene prezintă o serie de caracteristici biologice care pot fi determinate în laborator.

## **Determinarea rezistenței in vitro**

Pentru determinarea rezistenței in vitro se folosește suc vegetal brut care conține virus sau preparat viral purificat. Rezistența virusului în sucul vegetal se testează, de obicei, la temperatura camerei. Pentru aceasta, se determină imediat infectivitatea inoculului proaspăt preparat, precum și la diferite intervale de timp de la preparare. Determinarea infectivității se realizează prin infecții mecanice pe plante test sensibile. În timpul testării, inoculul este ținut la temperatura camerei. Cu timpul, infectivitatea scade, până ce dispare. Se notează limita de timp la care inoculul încă mai păstrează infectivitatea.

## **Determinarea punctului de inactivare termică**

Pentru determinarea punctului de inactivare termică, se încălzește inoculul viral la diferite temperaturi, o perioadă de timp (1 minut, 5 minute sau cel mai frecvent 10 minute). Se notează prima valoare de temperatură la care, încălzind inoculul, acesta își pierde infectivitatea după 10 minute. Determinarea infectivității se face prin metoda infecțiilor mecanice pe plante test sensibile.

## **Determinarea rezistenței la pH**

Se modifică pH-ul suspensiei de inocul viral, până ce se constată pierderea infectivității. Se notează valoarea acelui pH.

## **4.2. Metode de identificare a infecțiilor virotice la plante**

Identificarea infecțiilor cu virusuri la plante prezintă importanță teoretică, dar mai ales practică. Pentru identificarea infecțiilor virotice se folosesc diferite metode, dintre care vom prezenta câteva (observația vizuală, tehnici serologice, microscopia imunoelectronică).

### **4.2.1. Observația vizuală**

Această metodă de identificare a infecțiilor virotice la plante este cea mai expeditivă, dar și cea mai puțin sigură. Metoda se bazează pe observarea simptomelor (reducerea taliei, tumori, scurtarea internodiilor,

pătări foliare etc.) evidențiate de plantele infectate. Observația vizuală a virozelor prezintă anumite limite. Astfel, prin aceasta nu se stabilește cu certitudine virusul sau virusurile care au produs infecția. De asemenea, se știe că simptomele produse de virusuri diferă în funcție de planta gazdă și de condițiile de creștere a acestora. De exemplu, *Plum pox virus* determină de multe ori infecții latente la prun.

#### **4.2.2. Tehnici serologice**

Tehnicile serologice sunt foarte precise, dau rezultate rapide, sunt laborioase și permit efectuarea unui număr foarte mare de teste. Cele mai multe dintre ele au fost preluate din medicina umană și au fost adaptate pentru studiul virusurilor fitopatogene. Reacția serologică are la bază contactul dintre suspensia virală și antiserul specific. Evidențierea reacției specifice dintre antigen și antiser se realizează prin diferite teste, precum testul de floculare, testul de difuzie în gel, testul ELISA etc.

##### **Testul de floculare**

Când particulele virale interacționează cu anticorpii specifici, în mediu lichid, formează combinații care precipită. Aceste precipitate pot fi observate în tuburi (testul tub) sau în picături plasate pe suprafețe netede (testul de microprecipitare). Testul de microprecipitare se utilizează, în principal, pentru diagnoza virusurilor alungite. De obicei, se folosește sucul plantei purificat prin centrifugare și așezat în vase Petri, sub formă de picături.

##### **Testul ELISA**

Testul ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este un test imunologic foarte sensibil al cărui principiu se bazează pe interacțiunea antigen-anticorp. Această tehnică a fost introdusă în virologia vegetală în anul 1976 (Clark și Adams, 1977).

Spre deosebire de testele de difuzie în gel și de floculare, ELISA permite detectarea virusurilor care se găsesc în concentrație foarte mică în plante și chiar direct din vectorii lor. Datorită sensibilității ridicate a testului, virusurile se pot evidenția înaintea manifestării simptomelor.

Testul ELISA utilizează o metodă de dozare imunoenzimatică de tip "double antibody sandwich"(DAS), în care anticorpi specifici sunt cuplați direct cu o enzimă (fosfatază alcalină). Antigenul (A) este capturat pe faza solidă, de către anticorpii (IgG) fixați anterior. În următoarea etapă,



anticorpii cuplați cu fosfataza alcalină vin și se leagă pe antigen. În final, hidroliza substratului (p-nitrofenilfosfat) de către enzimă duce la obținerea unei colorații galbene a cărei intensitate poate fi măsurată fotometric prin citirea densității optice la 405 nm (valoarea absorbției).

Testul ELISA este folosit pentru detectarea a numeroase virusuri la plante (Clark și Adams, 1977; Flegg și Clark, 1979 etc.).

### **Microscopia imunoelectronică**

Microscopia imunoelectronică (IEM) este o tehnică recentă (Derrick, 1973) care permite vizualizarea reacției serologice (antigen-anticorp) la microscopul electronic. Are mare precizie și prezintă două mari avantaje: consumul de antiser este extrem de redus, iar antigenul poate fi folosit direct din extract vegetal brut.

### **4.3. Metode de obținere a unor plante libere de virus**

În combaterea virusurilor fitopatogene, s-au experimentat mai multe metode (termoterapia, chimioterapie, culturile meristematice, radioterapie etc.). Prin acestea, s-a urmărit obținerea de plante libere de virus.

#### **Termoterapia**

Inactivarea termică (termoterapie) este metoda cea mai folosită pentru combaterea in vivo a virusurilor fitopatogene din plante. Pentru combatere, se folosesc apă și aer cald. În cazul utilizării apei, temperaturile oscilează în jurul a 40°C, iar timpul de expunere este scurt (câteva minute sau ore.). Când se folosește aerul cald, temperaturile pot fi de 35-40°C, cu timp lung de expunere.

În țara noastră, termoterapia cu aer cald a fost folosită cu succes în combaterea unor virusuri fitopatogene la vița de vie, căpșun, pomi fructiferi. Această metodă se aplică numai în institute dotate cu camere termostat pentru termoterapie.

#### **Chimioterapie**

În literatura de specialitate sunt menționate numeroase substanțe (antibiotice, vitamine și altele) care inhibă activitatea virusurilor fitopatogene și determină dispariția simptomelor de boală. În practică însă, combaterea virusurilor fitopatogene prin chimioterapie nu se aplică, deoarece aceste tratamente sunt costisitoare, iar rezultatele obținute sunt limitate.

## **5. Metode și tehnici de lucru în studiul bacteriilor fitopatogene**

### **5.1. Metode de cercetare a bacteriozelor**

Diagnosticul unei boli bacteriene prezintă mai multe etape: examinarea directă a simptomelor, izolarea bacteriei în stare pură, examenul microscopic al celulelor, determinarea caracterelor morfologice, fiziologice și biochimice etc.

#### **5.1.1. Examinarea directă a materialului vegetal**

Materialul vegetal atacat de bacteriile patogene este colectat de specialiști și este expedit la laboratorul de bacteriologie. Numai pe materiale vegetale proaspete se pot face investigații.

Persoanele care execută examinarea directă a materialului vegetal trebuie să ia în considerare toate detaliile tabloului simptomatologic. În acest sens, este indicat ca examinarea directă să se realizeze cu ajutorul unui stereomicroscop.

În cazul examinării fructelor, tulpinilor, rădăcinilor etc., atacate de bacterioze, se impune cu necesitate efectuarea de secțiuni, prin aceste organe, pentru a forma o imagine clară a tabloului simptomatologic. La plantele care prezintă ofiliri, se examinează în mod obligatoriu, vasele conducătoare din organe (rădăcină, tulpină etc.), secționate la diferite nivele (Severin și colab., 1985).

#### **5.1.2. Izolarea bacteriilor fitopatogene**

Izolarea bacteriilor din plantele atacate este obligatorie, deoarece, de cele mai multe ori, aceleași simptome (pătări, putregaiuri, ofiliri etc.) pot fi provocate de mai multe specii patogene.

##### **5.1.2.1. Izolarea bacteriilor din organe vegetative**

Izolarea bacteriilor fitopatogene se face mai ușor din probe proaspăt recoltate și din țesuturi în primele stadii de infectare. Dezinfectarea suprafeței organelor respective trebuie făcută cu mare atenție, pentru a nu distruge însuși agentul patogen.

Țesuturile vegetale verzi se dezinfectează 1 minut cu hipoclorit de sodiu 5,0 % sau cloramină 1,0 %, după care se spală bine cu apă distilată.

În unele cazuri, este suficientă doar spălarea suprafeței organului vegetal cu apă de robinet și apoi cu apă sterilă.

Izolarea bacteriei patogene din organele vegetale care sunt într-un stadiu avansat de degradare este destul de anevoioasă, datorită numeroșilor infectanți care au invadat țesuturile (Severin și colab., 1985).

Astfel de situații se întâlnesc în cazul izolării și purificării bacteriei patogene *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica* care produce putregaiul moale al tuberculilor de cartof. În acest caz, pentru izolarea bacteriei patogene, se folosește un tubercul de cartof sănătos. Acesta se spală cu apă, se dezinfectează suprafața cu alcool etilic 70% și se flambează câteva secunde.

Astfel pregătit, tuberculul sănătos se secționează cu un cuțit steril. Pe suprafața secțiunii proaspete, se așază o porțiune mică de țesut infectat al unui tubercul cu putregai moale, din care dorim să izolăm bacteria patogenă. Tuberculul sănătos inoculat se introduce într-o placă Petri, captușită cu hârtie de filtru umedă. Se incubează la 26-28°C, timp de 2-3 zile. După incubare, țesutul sănătos al tuberculului prezintă o leziune, datorită infectării cu bacteria fitopatogenă din țesutul bolnav. Din leziunea proaspătă, se izolează bacteria patogenă și se studiază la microscop. De asemenea, se poate însămânța pe medii de cultură.

Din plantele lemnoase, bacteriile patogene care produc infecții sistemice (*Agrobacterium tumefaciens* la vița de vie, *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* la nuc etc.) pot fi izolate din lichidul de lăcrimare. Pentru aceasta, în perioada când "lăcrimarea" este mai intensă (primăvara la vița de vie, primăvara și toamna la nuc etc.), se dezinfectează suprafața unei coarde sau a unei ramuri, se taie cu un instrument steril și se introduce într-o eprubetă sterilă. Locul rămas gol, între gura eprubetei și ramură, se umple cu vată sterilă. Eprubeta se fixează pe ramură cu ajutorul unui dispozitiv. După colectarea a cca. 20 ml lichid de lăcrimare, se centrifughează la 10 000 turații/minut, iar sedimentul se însămânțează pe mediu de cultură.

### **5.1.2.2. Izolarea bacteriilor din semințe**

Multe semințe cu aspect sănătos pot fi purtătoare de bacterii patogene. Analiza seminței cu privire la infecția cu bacterii se realizează prin diferite metode: examinare macroscopică, metoda indirectă sau culturală, metoda sugativei etc.

#### **Examinarea macroscopică**

Pentru examinarea macroscopică a semințelor se poate folosi stereomicroscopul. Cu ajutorul acestuia, se evidențiază pete mai mult sau mai puțin caracteristice, determinate de bacterii patogene (Raicu și Baciuc, 1978).

## **Metoda indirectă sau culturală**

Semințele cu simptome evidente se însămânțează în nisip steril, care se găsește în vase sau lădițe, acoperite cu geam. După semănat, acestea se păstrează la temperatura optimă bacteriei respective (18-25°C). După 5-8 zile, când s-au deschis complet cotiledoanele, pe acestea apar simptome de boală. Unele simptome sunt tipice bacteriozei urmărite, iar altele sunt atipice. De cele mai multe ori, observarea simptomelor de boală de pe cotiledoane nu este suficientă. De aceea, trebuie efectuate analize suplimentare: executarea unui preparat microscopic, izolarea și cultivarea bacteriei patogene etc.

Metoda culturală de analiză poate fi folosită în cazul bacteriozelor care produc arsuri la leguminoase, pătarea unghiulară la castraveți etc.

### **Metoda sugativei**

Semințele se dezinfectează (Tab. 4) în prealabil, după care se spală bine cu apă sterilă. Incubarea se realizează în vase Petri, pe sugativă umezită, timp de 1-2 zile, la temperatura de 25-30°C. După incubare, semințele se analizează și se observă dacă prezintă exsudat bacterian pe suprafața lor (Raicu și Baciuc, 1978).

În cazul formării exsudatului, se ia cu ansa din acesta și se diluează într-o eprubetă cu apă sterilă. Din această diluție se efectuează preparate microscopice și/sau se însămânțează prin epuizare de ansă, pe mediu cu agar. După incubare (1-2 zile, la 25-30°C), se face purificarea coloniilor bacteriene.

## **5.2. Cercetarea și identificarea bacteriilor pe medii de cultură**

Identificarea unei bacterii nu se poate face decât după ce este izolată în cultură pură și este cultivată pe diferite medii nutritive.

### **5.2.1. Morfologia bacteriilor**

Bacteriile au diferite forme: de bastonaș (bacil), sferică (coc), de virgulă (vibron), formă filamentoasă ondulată (spiril), de filament ramificat etc. (Fig. 1). Forma coloniilor bacteriene este foarte diferită în funcție de specie și de tulpină (Florian, 2001; Muntean, 2009). Pentru stabilirea cât mai exactă și completă a caracterelor de cultură, bacteriile se însămânțează, pe medii solide și lichide. Pentru înregistrarea caracterelor creșterii, examinarea culturilor bacteriene se face zilnic.

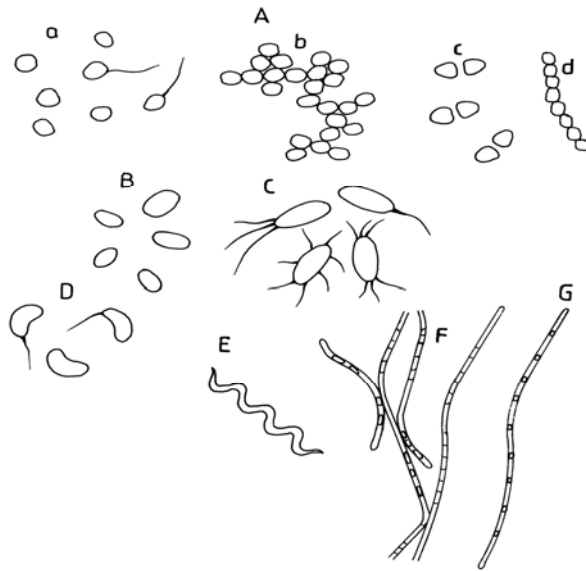


Fig.1. Morfologia bacteriilor:

**A. coci:** a. coci (cu și fără flagel); b. stafilococi; c. și peritrih); **B. cocobacili;** **C. bacili;** **D. vibriion;** **E. spiril\*;** **F. filamente ramificate** (cu și fără endospori); **G. filamente\*\*;** (\*tip *Treponema*; \*\* tip *Beggiatoa*).

### Morfologia coloniilor bacteriene pe medii solidificate

Tehnica însămânțării bacteriilor (Fig. 2) pe medii de cultură din eprubete și vase Petri este prezentată în diferite lucrări de specialitate.

După însămânțarea bacteriei pure, prin tehnică adecvată, pe mediu nutritiv solidificat în vase Petri, se asigură incubarea la termostat. După incubare, pe baza observațiilor zilnice, se notează: momentul apariției coloniilor, gradul de uniformitate, forma coloniilor, aspectul suprafeței, aspectul marginii, profilul, culoarea, mărimea etc.

Informațiile despre caracterele coloniilor bacteriene obținute pe medii nutritive permit identificarea speciei cercetate (Gerhardt, 1981).

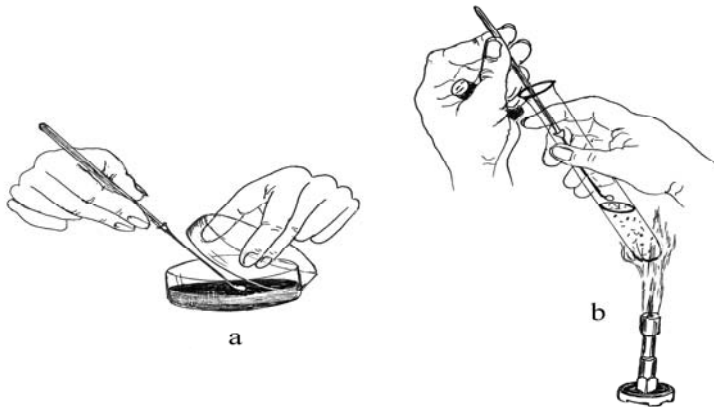


Fig. 2. Tehnica însămânțării bacteriilor și ciupercilor pe medii solidificate:  
a. în vas Petri; b. în eprubetă.

### 5.2.2. Medii uzuale pentru bacterii fitopatogene

#### Bulionul de carne

Acesta reprezintă mediul de bază în bacteriologie. Este un mediu aproape universal pentru cultivarea multor grupe de bacterii. Prepararea lui se realizează în două etape: prepararea maceratului de carne și prepararea bulionului propriu-zis.

**Prepararea maceratului de carne** (zemii de carne). Se iau 500 g carne de vacă sau cal, se curăță de oase, tendoane, aponevroze, grăsime și se taie în fragmente mici. Apoi, carnea se introduce într-o oală emailată și se adaugă 1000 ml apă de robinet. Se ține 24 ore la rece pentru macerare, după care se fierbe 30 minute. După fierbere și răcire, se filtrează prin tifon, apoi prin hârtie de filtru sau vată. Filtratul obținut constituie zeama de carne. Acesta se completează cu apă la volumul inițial și se repartizează în baloane mari, spălate și sterilizate, care se închid cu dopuri de vată, învelite în tifon.

Sterilizarea se realizează la 120°C, timp de 30 minute. Astfel pregătită, zeama de carne se poate păstra timp îndelungat la rece și întuneric, servind la prepararea mediilor lichide și solide.

**Prepararea bulionului propriu-zis.** La 1000 ml zeamă de carne se adaugă 10 g peptonă și 5 g NaCl. Se amestecă și se încălzește până la dizolvarea completă a peptonei. Se lasă să se răcească, apoi se determină

pH-ul și se ajustează la 7,5-7,8, cu ajutorul unei soluții de NaOH 10%. Apoi, mediul se autoclavează timp de 15 minute, la 120°C, pentru precipitarea sărurilor alcalino-pământease. Pentru îndepărtarea precipitatului și a resturilor de grăsime, mediul se filtrează prin hârtie de filtru, după care se repartizează în baloane sau eprubete. Acestea se închid cu dopuri de vată și se sterilizează în autoclav la 120°C, timp de 30 minute.

#### Mediul cu extract de porumb

Acest mediu înlocuiește bulionul de carne, în cultivarea multor bacterii, mai ales a celor fitopatogene. Se prepară din :

Apă distilată.....	1000 ml
Peptonă.....	5 g
Extract de porumb.....	10 g
Clorură de calciu.....	0,5 g
Clorură de sodiu.....	5 g
Agar.....	15-18 g

Agarul se topește în apă și apoi se adaugă peptona, extract de porumb și sărurile indicate. Se amestecă bine pentru uniformizarea soluției, se filtrează la cald și se ajustează pH-ul la 7,4 -7,5. Apoi, se distribuie în vase și se sterilizează 30 de minute la 1,2 atm.

Mediile cu extract de carne și extract de porumb permit dezvoltarea a numeroase grupe de bacterii, ceea ce îngreunează purificarea culturii cercetate. Prezența în acest mediu a anumitor substanțe inhibă dezvoltarea unor grupe de bacterii. Verdele malachit și cristalul violet inhibă în mare parte dezvoltarea bacteriilor Gram-pozitive. Bicromatul de potasiu inhibă dezvoltarea bacteriilor Gram-negative.

#### Mediul Lieske

Mediul este folosit pentru izolarea bacteriei *Agrobacterium tumefaciens*. Pentru prepararea mediului se folosesc: 1 litru apă, 20 g glicină, 5 g KNO<sub>3</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub> și 18 g agar. La acest mediu se adaugă 10 ml soluție 1:400 roșu de Congo. Se ajustează pH-ul la 7,2-7,4 și se sterilizează la 1 atm., timp de 20 minute.

#### Mediul Hugh și Graham

Este un mediu selectiv pentru *Erwinia carotovora*. Mediul se prepară din 1 litru apă, 10 g salicin, 5 g taurocolat de sodiu, 1 g NH<sub>4</sub>K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

0,2 MgSO<sub>4</sub>, 0,2 g KCl, 0,05 g albastru de bromtimol (se dizolvă separat în apă) și 18-20 g agar. Se sterilizează 20 minute la 1 atm. (120°C).

Mediul cartof - dextroză - agar

Acest mediu este foarte bun, pentru cultivarea bacteriilor. Se prepară precum mediul folosit pentru cultivarea ciupercilor. Trebuie ajustat însă la un pH=7,4 – 7,6.

### 5.3. Tehnici de colorare a bacteriilor

Dintre tehnicile de colorare, pentru studiul bacteriilor fitopatogene se folosesc frecvent colorația vitală, colorația simplă și colorația Gram.

#### 5.3.1. Colorația vitală

Această metodă folosește coloranți netoxici sau foarte diluați, care nu omoară microorganismele, ci doar le colorează, făcându-le mai ușor vizibile.

Pentru realizarea colorației vitale sunt necesare: cultură bacteriană, colorant, lame și lamele, pipetă Pasteur. Pentru colorarea celulelor bacteriene se pot folosi diferiți coloranți: roșu neutru (0,5g/100 ml apă distilată), albastru de metilen (0,1g/100 ml apă distilată), albastru de Nil (0,1g/100 ml apă distilată) sau verde de metil (0,1g/100 ml apă distilată).

**Tehnica de lucru.** Pe o lamă de microscop se amestecă o picătură din soluția de colorant, cu o picătură de suspensie bacteriană. Se examinează la microscop, între lamă și lamelă, cu obiectivul 40x.

**Interpretare.** Celulele bacteriene apar mai colorate, în raport cu fondul preparatului. În cazul în care au flageli, celulele sunt mobile.

#### Examinarea bacteriilor pe preparate fixate

Pentru efectuarea unui preparat fixat cu bacterii care urmează a fi examinate, trebuie parcurse următoarele etape: etalonarea celulelor pe suprafața unei lame de microscop, fixarea frotiului și apoi colorarea.

Preparatul astfel obținut este cunoscut sub denumirea de **frotiu**.

Pentru realizarea unui frotiu sunt necesare următoarele: cultură bacteriană (dezvoltată pe mediu solidificat sau lichid), soluție salină fiziologică (NaCl 0,85%), ansă sau pipetă Pasteur, lame de sticlă curate și degresate, cristalizoare, stative și bec Bunsen.



**Tehnica de lucru.** Pentru realizarea frotiului se parcurg mai multe etape.

Pe o lamă de microscop se pune, cu bucla ansei sau cu pipeta Pasteur, o picătură de apă fiziologică. În bucla ansei se recoltează o cantitate mică din suspensie sau dintr-o colonie bacteriană și apoi se dispersează omogen în picătura de apă fiziologică. Pentru etalonare, se descriu cu bucla ansei trasee concentrice ovale. În cazul culturilor foarte sărace în celule, se recomandă punerea pe lamă, cu ajutorul ansei sau al pipetei Pasteur, a uneia sau mai multor picături. Apoi, acestea sunt lăsate să se usuce.

În toate cazurile, uscarea se face la temperatura camerei, acoperind frotiurile cu capacul unei plăci Petri. De asemenea, uscarea se poate realiza la termostat, la 37°C (Drăgan-Bularda și Kiss, 1986).

**Fixarea frotiurilor.** Prin fixarea frotiurilor, se omoară celulele, se asigură aderența bacteriilor pe lamă, o mai bună colorare și posibilitatea de studiere a detaliilor. De asemenea, prin aceasta crește permeabilitatea peretelui celular pentru coloranți etc.

Fixarea frotiurilor se realizează cu ajutorul unor agenți fizici (căldura) sau chimici (alcool absolut, alcool metilic, acid osmic etc.).

**Fixarea cu ajutorul căldurii.** Prin flacăra unui bec Bunsen se trece lama de microscop care este ținută de margini, la una din extremități, având frotiul în sus. În timpul trecerii, se efectuează o mișcare lentă de “călcare” a flăcării. Operația se repetă de trei ori, iar fiecare trecere durează aproximativ o secundă. Pentru a evita supraîncălzirea lamei, care poate determina carbonizarea celulelor, după fiecare trecere prin flacăra, se controlează gradul de încălzire a preparatului. În acest sens, se atinge cu lama dosul palmei, aproape de baza degetului mare. Fixarea se efectuează corect, când temperatura poate fi suportată cu ușurință (Drăgan-Bularda și Kiss, 1986).

## Colorarea frotiurilor

La colorarea frotiurilor, trebuie cunoscute și respectate câteva reguli generale.

Frotiurile se așază, după fixare, pe suporturi metalice sau suporturi formate din două baghete de sticlă, reunite la capete printr-un tub de cauciuc și așezate deasupra unui cristalizator folosit numai pentru colorații.

La colorare, colorantul se aplică direct pe frotiu, cu sticla picurătoare sau cu ajutorul unei pipete tetină de cauciuc.

În cazul în care colorația necesită o expunere prelungită sau acoperirea completă a frotiului, lama cu frotiul se cufundă în vase speciale (pahare Borrel, plăci Laveron).

După acțiunea colorantului, spălarea lamei cu frotiul se face sub curent de apă direct de la robinet sau cu ajutorul unei pipete.

Pentru colorare la cald, flambarea se face prin trecerea lamei prin flacăra unui bec Bunsen. Pentru uscarea frotiului, se așază lamele pe masă în poziție verticală, în stelaje de lemn speciale, în termostat sau între două foi de hârtie de filtru. Nu se recomandă uscarea frotiului la flacăra.

În cazul utilizării uleiului de imersie, pentru studiul microscopic al preparatelor, acesta trebuie îndepărtat de pe lamă cu xilol sau benzol. Pentru aceasta, se acoperă frotiul cu o bucată de hârtie de filtru sau vată bine umezită cu una din aceste substanțe și se șterge suprafața lamei printr-o mișcare de translație (Drăgan-Bularda și Kiss, 1986).

### 5.3.2. Colorația simplă

Tehnica utilizează acțiunea unui singur colorant care transferă culoarea sa celulelor din preparat.

Pentru colorarea celulelor bacteriene sunt necesare: colorant Loeffler, cultură bacteriană (de 24-48 ore), lame de microscop degresate, apă fiziologică (soluție fiziologică de NaCl 0,85%) și ansă de platină. Colorantul Loeffler (soluție alcoolică de albastru de metilen) se prepară din albastru de metilen (0,3g), alcool etilic (30 ml), soluție apoasă de KOH 1% (1,0 ml) și apă distilată (100 ml). Albastrul de metilen se dizolvă în alcool etilic, după care se adaugă soluția de KOH 1% și apa distilată.

**Tehnica de lucru.** Pe lame de microscop, se realizează frotiuri. Acestea se fixează termic (la flacăra) și apoi se colorează cu soluție Loeffler, 1-2minute. După colorare, se spală cu apă de robinet. Frotiul se usucă la temperatura camerei și se examinează la obiectivul cu imersie (Drăgan-Bularda și Kiss, 1986).

### 5.4. Testul ELISA

În cercetările moderne, pentru determinarea corectă a bacteriilor fitopatogene se folosește tot mai frecvent testul ELISA. Unele bacterii fitopatogene (*Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* etc.) prezintă numeroase tulpini (patovaruri). De aceea, identificarea acestora necesită folosirea unor metode și tehnici de mare sensibilitate și precizie. Prin testul ELISA se determină diferite bacterii fitopatogene, precum *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*, *Clavibacter michiganense* pv. *michiganense* etc.

## **6. Metode și tehnici de lucru în studiul ciupercilor fitopatogene**

### **6.1. Metode de izolare a ciupercilor fitopatogene**

Izolarea ciupercilor fitopatogene din substratul pe care se dezvoltă se realizează prin metode generale și metode speciale.

#### **6.1.1. Metode generale**

Dintre metodele generale de izolare, la studierea ciupercilor fitopatogene se folosesc izolarea directă, metoda diluțiilor etc.

#### **Metoda izolării directe**

Această metodă se folosește pentru izolarea ciupercilor care formează “fructificații” abundente la suprafața substratului pe care se dezvoltă. În unele cazuri, sporulația ciupercii poate fi observată cu ochiul liber.

Examinarea mai detaliată a sporulației se realizează cu ajutorul stereomicroscopului. Din materialul infectat se detașează spori sau micelii de ciupercă, cu ajutorul unui ac de înșămânțat, umectat în prealabil în mediul nutritiv. Materialul izolat este folosit pentru efectuarea de preparate microscopice sau se înșămânțează pe un mediu de cultură. Pentru evitarea contaminării cu bacterii, la mediul de cultură se adaugă substanțe bactericide.

Stimularea dezvoltării și sporulării ciupercii fitopatogene, în vederea identificării, se realizează în cameră umedă, care asigură speciei cercetate condiții optime de temperatură (20-22°C) și umiditate. Materialul vegetal infectat se pregătește corespunzător, înainte de a fi introdus în “camera umedă”. Astfel, acesta se spală bine la suprafață cu apă sterilă, apoi se introduce într-un dezinfectant (Tab. 4). După aceasta, se spală bine cu apă sterilă și se introduce în “camera umedă”. Pentru pregătirea “camerei umede”, se folosesc câteva rondele de hârtie de filtru, umectate cu apă sterilă, care sunt puse într-un vas Petri sterilizat.

Camera umedă cu materialul vegetal infectat se acoperă și se introduce într-un termostat la temperatura de 20-22°C, timp de câteva zile, în funcție de specia cercetată.

În această perioadă de timp, ciuperca se dezvoltă, formând micelii și sporulație caracteristică, necesare pentru determinarea speciei.

## **Metoda diluțiilor**

Este folosită, atunci când ciupercile sunt slab dezvoltate pe substrat sau cresc în amestec cu alte specii de microorganisme.

Pentru realizarea metodei, se cântărește un gram din materialul de analizat (țesut vegetal infectat, suc vegetal infectat etc.) și se pune în 9 ml apă sterilă. Astfel se obține diluția de 1:10, din care se ia 1 ml și se pune într-o eprubetă cu 9 ml apă sterilă, după ce în prealabil s-a agitat conținutul. În acest mod, s-a obținut diluția 1:100. Prin acest procedeu și în același mod se obțin diluții de 1:1000; 1:10 000; 1:100 000 etc.

O cantitate foarte mică din suspensia inițială (1:10) se transferă cu ajutorul unei anse pe suprafața mediului agarizat, turnat în vase Petri. Pentru a inhiba dezvoltarea bacteriilor, în mediul de cultură se adaugă substanțe bactericide. Folosind și celelalte soluții cu diluții mai mari, se însămânțează și alte vase Petri cu mediu agarizat, în același mod.

Suspensia optimă pentru inoculare este aceea care prin inocularea unui mililitru de soluție, pe suprafața mediului, se vor dezvolta numai 3-6 colonii. Frecvent se folosesc diluții de 1:10 000 (Constantinescu, 1974).

Această metodă se aplică și pentru izolarea ciupercilor fitopatogene din sol.

### **6.1.2. Metode speciale**

Pentru izolarea ciupercilor de pe unele organe ale plantelor sau pentru izolarea anumitor grupe de ciuperci s-au adoptat metode speciale.

Aproape întotdeauna, pe organele plantelor, în afara ciupercilor parazite, se află și bacterii sau ciuperci saprofite. Pentru îndepărtarea contaminanților de pe suprafața materialelor colectate, se folosesc diferite metode. Una dintre acestea se bazează pe utilizarea de sterilizanți sub formă de soluții (Tab. 4).

Când se folosesc sterilizanți sub formă de soluții, dezinfectarea la suprafață se realizează astfel: se spală materialul vegetal și se taie în fragmente mici, de cca. 1 cm lungime, apoi se imersează în alcool etilic 75% și imediat în soluție de sterilizare. După scoaterea din soluție, se spală de mai multe ori în apă sterilă, se zvântă între foi de hârtie sterilă, se secționează și se transferă pe mediul de cultură.

După sterilizarea la suprafață a materialului vegetal, urmează etapa de izolare a ciupercilor fitopatogene. Metoda de izolare folosită, diferă în funcție de grupul de ciuperci, de locul unde este localizat agentul patogen (la suprafața plantei sau în țesuturi profunde), de organul vegetal afectat (tulpină, sămânță etc.) etc.

**Sterilizarea la suprafață a materialului vegetal**  
(după Booth , 1971, citat de Constantinescu, 1974)

Sterilizantul	Concentrația (%)	Timp (min.)	Soluția de spălare
Formaldehidă (40%)	51	1-5	Alcool etilic 70%, apoi apă sterilă
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	1-5	Apă sterilă
KMnO <sub>4</sub>	2	1-5	Apă sterilă
Hipoclorit de calciu sau sodiu	0,35	1-5	Apă sterilă
Alcool etilic	75	1-5	Apă sterilă
AgNO <sub>3</sub>	1	1-5	NaCl sterilă, apoi apă sterilă

### Izolarea ciupercilor care sporulează la suprafața plantelor

Izolarea ciupercilor care produc pătări ale frunzelor se realizează în mai multe etape: sterilizarea la suprafață a materialului vegetal (Tab. 4); introducerea în “camera umedă”; incubarea (la 20-22°C, timp de câteva zile); izolarea directă a miceliului și sporulației; identificarea speciei prin studiul preparatelor microscopice.

### Izolarea ciupercilor din țesuturile profunde ale organelor vegetative

Izolarea ciupercilor, care parazitează țesuturile profunde și care, de obicei, nu sporulează la suprafața organelor atacate (bulbi, tuberculi, tulpini etc.), se realizează prin parcurgerea următoarelor etape: sterilizarea, spălarea, secționarea țesuturilor și depunerea fragmentelor pe mediu de cultură sau în camere umede. După câteva zile de incubare la temperatura camerei (20-22°C), din miceliul care se dezvoltă în jurul fragmentului de țesut, se poate izola agentul patogen.

#### 6.1.3. Metode de analiză a seminței cu privire la infecția cu ciuperci

Semințele plantelor sunt infectate uneori de diferite specii de ciuperci. Datorită infecției, semințele prezintă diferite simptome de boală (pete de decolorare, culori diferite etc.), care se deosebesc de semințele sănătoase.

Ciupercile se pot localiza pe suprafața semințelor sau pot pătrunde prin tegumentul seminal în interiorul acestora.

Pentru determinarea precisă a agenților patogeni purtați de sămânță, trebuie să se folosească diferite metode, pe lângă metoda examinării macroscopice. Dintre aceste metode menționăm: metoda suspensiei de spori, metoda sugativei, metoda plăcilor cu agar, metoda Hiltner etc.

### **Metoda suspensiei de spori**

Această metodă de analiză constă în examinarea microscopică a suspensiilor de spori obținute prin spălarea seminței. Este o metodă calitativă, deoarece servește numai la depistarea sporilor, dar nu stabilește viabilitatea acestora sau gradul de contaminare a semințelor.

**Mod de lucru.** Din proba de analizat, se iau câte 200 semințe, care se împart, în mod egal, în două loturi. Fiecare lot se pune într-un balon de sticlă și se adaugă câte 100 ml apă sterilă. Apoi, se agită puternic balonul de sticlă (cu mâna sau la agitator mecanic), timp de 10 minute. Suspensia din baloane se transferă în două tuburi de centrifugă. După centrifugare (la 2000-2500 turații/min., timp de 10-15 min.), se decantează supernatantul, iar sedimentul fiecărui tub se examinează. Din fiecare tub se iau câte 4 picături și se pun în câte 4 picături de lactofenol pe lame microscopice. Se identifică la microscop prezența sporilor de la diferite specii de ciuperci.

### **Metoda sugativei**

Semințele cercetate sunt puse în condiții optime de temperatură și umiditate, astfel încât ciupercile care le-au infectat să se poată dezvolta pe ele.

**Mod de lucru.** Semințele se așază în vase Petri, pe hârtie sugativă umectată și se incubează cca. 7 zile, la temperatura camerei (20-22°C).

Observațiile cu privire la prezența sau lipsa infecției pe sămânță se fac la stereomicroscop. În cazul unor semințe care sunt puternic contaminate cu ciuperci saprofite (*Rhizopus* spp., *Mucor* spp. *Aspergillus* spp. etc.) este necesar să se facă o dezinfecție superficială (Tab. 4), în prealabil.

Metoda sugativei este mult folosită în acele laboratoare care efectuează, în mod curent, analize de stare sanitară a semințelor. Această metodă oferă condiții optime pentru creșterea miceliului la multe ciuperci patogene, cât și pentru dezvoltarea simptomelor produse de aceste specii pe germenii care se dezvoltă în timpul incubării.

## **Metoda plăcilor de agar**

Este folosită pentru izolarea și identificarea pe mediu agarizat a agenților patogeni localizați în sămânță.

Cel mai frecvent sunt folosite mediile extract malț-agar (MA) și extract cartof-agar (CA), cartof-dextroză-agar etc..

**Mod de lucru.** Semințele testate se dezinfectează, în prealabil cu un sterilizant slab (Tab. 4), iar apoi sunt plasate pe mediu de cultură în vase Petri, fiind distanțate în funcție de mărimea lor. Incubarea se realizează la temperatura camerei (20-22 °C), pe o perioadă de 5-8 zile. Estimarea infecției se face prin examinarea coloniei de ciuperci la stereomicroscop. De asemenea, se efectuează preparate microscopice, pentru identificarea speciei patologice (Raicu și Baci, 1978).

### **6.2. Noțiuni de tehnică micologică**

Examinarea ciupercilor se poate face direct pe substratul pe care se dezvoltă în natură, cu ajutorul aparatelor optice (lupă, microscop), fie în culturi pure pe diferite medii de cultură. Culturile pure sunt indispensabile, pentru cercetările din micologie. Ele permit izolarea și determinarea diferitelor specii de ciuperci, cunoașterea morfologiei, fiziologiei și altor caractere ale lor. Nu toate ciupercile pot fi cultivate pe medii de cultură. Pe aceste medii pot fi cultivate ciupercile saprofite (obligate și facultative) și parazite facultative. Ciupercile parazite obligate nu pot fi cultivate pe medii de cultură acelulare. Studiarea lor se face direct pe planta gazdă pe care se dezvoltă.

#### **6.2.1. Medii de cultură pentru ciuperci**

Necesitățile nutritive ale ciupercilor sunt atât de diverse încât nu există un mediu standard pentru toate speciile. Unele medii de cultură (Czapek-agar, cartof-dextroză-agar, malț-agar etc.) permit dezvoltarea unui număr mare de ciuperci, iar altele sunt specifice unui număr restrâns sau chiar unei singure specii. Mediile de cultură se folosesc în stare lichidă sau în stare solidă. Solidificarea mediilor de cultură se realizează prin adăugare de agar sau silicagel (Constantinescu, 1974).

Pentru cultivarea ciupercilor, în literatură s-au descris câteva sute de medii nutritive, dintre care, în continuare, sunt prezentate câteva.

### Apă-agar

Mediul de cultură apă-agar se prepară din:

Agar .....	20 g
Apă distilată .....	1000 ml

Agarul se dizolvă în apă timp de 30 minute și apoi se sterilizează 20 minute, la 121°C. Acest mediu specific este folosit pentru cultivarea și identificarea drojdiilor (Constantinescu, 1974).

### Bere (must)-agar

Mediul de cultură se prepară din:

Agar .....	30 g
Must de bere .....	1000 ml

Agarul se topește în must de bere, prin fierbere pe baie de apă, timp de 15 minute. După ajustarea pH-lui la 5,0-5,5, se sterilizează 10 minute la 116°C (Constantinescu, 1974).

### Cartof-dextroză-agar

Mediul cartof-dextroză-agar este cel mai utilizat în micologie și este foarte favorabil pentru creșterea majorității ciupercilor.

Se prepară din:

Cartof .....	200 g
Dextroză .....	20 g
Agar .....	20 g
Apă distilată .....	1000 ml

Pentru prepararea mediului, se spală și se curăță cartofii, iar apoi se taie în cuburi de circa 12 mm. Se cântăresc 200 g cartofi, se clătesc repede în apă și se fierb într-un vas de sticlă sau smălțuit, timp de o oră, până se înmoaie. Se sfărâmă cartofii și se strecoară cât mai multă pulpă printr-o sită fină sau printr-un tifon. Se adaugă agarul și se fierbe până se dizolvă. Se ia de pe foc, se adaugă dextroza și se amestecă până se dizolvă. Se completează la un litru cu apă distilată. În timpul turnării în eprubete, se va agita soluția, pen-tru a repartiza în fiecare eprubetă o parte din substanța solidă. Se sterilizează la 121°C, timp de 15 minute. În funcție de calitatea agarului, se poate folosi 15 g la un litru de mediu (Constantinescu, 1974).



Față de formula standard, există mai multe variante ale acestui mediu. Pentru producerea de conidii la *Venturia inaequalis*, se recomandă acest mediu preparat din 40 g cartofi, 5 g dextroză, 17 g agar și 1000 ml apă distilată (Boone și Keitt, 1956, citat de Constantinescu, 1974).

#### Czapek-agar

Soluție A ..... 50 ml	<b>Soluția A</b>	<b>Soluția B</b>
Soluție B ..... 50 ml	NaNO <sub>3</sub> ..... 40 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... 20 g
Sucroză ..... 30 g	KCl ..... 10 g	Apă distilată....1000 ml
Agar..... 20 g	MgSO <sub>4</sub> .....10 g	
Apă distilată ...900 ml	FeSO <sub>4</sub> .....0,2 g	
	Apă distilată...1000 ml	

**Preparare.** Se dizolvă sucroza în 50 ml soluție A, diluată cu aproxi-mativ 500 ml apă distilată. Se adaugă 50 ml soluție B, se completează la un litru cu apă distilată, se adaugă agarul și se topește. Se sterilizează 20 minute, la 121<sup>0</sup>C (după Booth, 1971, citat de Constantinescu, 1974).

#### Czapek soluție-agar

Compoziție/l:

Sucroză ..... 30 g	KCl ..... 0,5 g
Agar ..... 15 g	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O ..... 0,5 g
NaNO <sub>3</sub> ..... 2 g	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....0,01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... 1 g	
pH: 7,3 ± 0,2 la 25 °C	

Componentele se amestecă în apă distilată și se aduce la volum de 1,0 l. Se distribuie în vase și se autoclavează 15 minute la 121<sup>0</sup>C. Se folosește pentru cultivarea speciilor de *Aspergillus*, *Penicillium* și altor ciuperci (Atlas, 2004).

#### Fasole-agar

Rețeta de preparare cuprinde:

Fasole ..... 100 g
Agar ..... 15 g
Apă distilată ..... 1 000 ml

Fasole lima (*Phaseolus lunatus*) proaspătă sau înghețată se umectează într-un litru de apă caldută timp de 30 minute. Se înlătură lichidul și se completează cu apă, se filtrează prin sită, se adaugă agarul și se fierbe până

la topirea agarului. Se filtrează prin vată. Se sterilizează 20 minute, la 121<sup>0</sup>C. Acest mediu este recomandat pentru cultivarea speciei *Phytophthora infestans*.

#### Maț (extract)-agar

Rețeta standard cuprinde:

Extract maț .....	30 g
Agar .....	15 g
Apă distilată .....	1000 ml

Se încălzește extractul de maț în apă până se dizolvă, se adaugă agarul și se fierbe până se topește. Se ajustează pH-ul final la 5,5 ± 0,2, la 25<sup>0</sup>C. Se sterilizează prin autoclavare la 121<sup>0</sup>C, timp de 15 min. (Samson și Van Reenen-Hoekstra, 1988).

#### Sabouraud-glucoză-agar

Rețeta standard cuprinde:

Glucoză .....	40 g
Peptonă granulată .....	10 g
Apă distilată .....	1000 ml

Se amestecă ingredientele, se fierb până la dizolvare și se ajustează pH-ul la 5,6. Se sterilizează la 120<sup>0</sup>C, timp de 10 minute. Acest mediu este foarte sensibil și nu trebuie supraîncălzit, la sterilizare. Se folosește în derma-tologie pentru cultivarea ciupercilor care produc micoze ale pielii și părului, la om (Constantinescu, 1974).

#### Extract de orez-agar

Compoziție/l:

Agar .....	20 g	pH: 6,6±0,2 la 25 <sup>0</sup> C
Orez alb (extract) .....	5,0 g	
Polisorbat 80 .....	10,0 ml	

Se amestecă componentele, cu excepția polisorbatalui 80, în apă dis-tilată/deionizată și se aduce la un volum de 990 ml. Se fierbe până la dizol-vare și apoi se adaugă polisorbatal 80. Se sterilizează 15 minute, la 121<sup>0</sup>C. Mediul este folosit pentru cultivarea și diferențierea speciilor de *Candida albicans* și *Candida stellatoidea*, de alte specii de *Candida*, pe baza formării clamidosporilor (Atlas, 2004).

## **Sterilizarea mediilor de cultură**

După preparare, mediul de cultură se toarnă în vase de cultură (eprubete, plăci Petri, flacoane Erlenmeyer etc.). Toată sticlăria care se folosește pentru cultivarea microorganismelor trebuie spălată, uscată și sterilizată.

Toate aceste etape sunt descrise amănunțit în diferite manuale de laborator. Sterilizarea sticlăriei se realizează în etuvă la 180°C cel puțin 60 minute sau la 160°C, cel puțin două ore (Constantinescu, 1974).

Mediul de cultură se toarnă în vase cu ajutorul unei pâlnii de sticlă.

Sterilizarea lor se face prin căldură umedă în autoclav. Durata sterilizării și valoarea temperaturii sunt indicate în rețeta de preparare. După sterilizare, vasele cu medii se scot din autoclav și pot fi folosite pentru cultivarea ciupercilor. Mediile de cultură și soluțiile care conțin substanțe (zaharuri, vitamine etc.) termolabile și ai căror constituenți ar putea fi denaturați sub acțiunea temperaturilor ridicate se sterilizează complet prin tindalizare. Sterilizarea prin **tindalizare** constă în trei pasteurizări repetate (30 minute la 56-90°C), efectuate la intervale de 24 ore, prin imersia recipientelor respective în băi de apă electrice, cu temperatură constantă (Pârvu, 2007).

Culturile în vase Petri se practică în special pentru izolarea ciupercilor prin însămânțări repetate. Aceste culturi nu se păstrează multă vreme, deoarece se usucă mai repede și se pot infecta mai ușor prin deschiderea vaselor. De asemenea, ciupercile pot fi cultivate pe medii de cultură în eprubete și în flacoane Erlenmeyer. Pe aceste medii de cultură, culturile de ciuperci pot fi păstrate la temperaturi scăzute (2-4°C) 2-3 luni, după care trebuie reînsămânțate.

### **6.2.2. Însămânțarea ciupercilor pe mediul de cultură**

Deși par simple, inocularea și transferul sunt efectuate de multe ori greșit. Aceasta duce la contaminări nedorite ale culturilor, la infestarea laboratorului și chiar a operatorului (Constantinescu, 1974). Prin însămânțare se înțelege trecerea pe medii de cultură a microorganismelor din diferite surse (apă, sol, produse patologice etc.), în vederea cultivării și izolării lor în culturi pure.

Ciupercile se cultivă pe medii de cultură în diferite scopuri: pentru examinarea caracterelor culturale, morfologice, biochimice și serologice, în vederea identificării lor; pentru a le conserva, prin reînsămânțare din culturi vechi pe medii proaspete etc. Însămânțarea ciupercilor se poate executa cu ansa sau cu pipeta Pasteur.

## Însămânțarea cu ansa

Pentru inoculare, trebuie folosit un ac de însămânțat confecționat din platină sau un aliaj care nu vibrează. În timpul inoculării, acul de însămânțat nu se introduce fierbinte în cultură. După inoculare, se recomandă ca acul de însămânțat să fie imersat în alcool etilic 70% și după aceea trebuie trecut în flacăra becului de gaz. Această ordine a operațiilor trebuie respectată deoarece, prin încălzire bruscă, fragmente de inocul sunt dispersate în aer. În timpul inoculării mediilor de cultură, trebuie să se lucreze sub hotă, în condiții sterile.

Tehnica transferului inoculului fungic în eprubetă, vas Petri sau alt vas de cultură este prezentată detaliat în diferite manuale de laborator (Botton și colab., 1985; Kreisel și Schauer, 1987).

Materialul de însămânțat se introduce în mediul de cultură din diferite vase (eprubete, vase Petri etc.), cu ajutorul ansei de însămânțat. Dacă nu dispunem de o cultură pură a unei anumite ciuperci, este necesar să o izolăm și să o purificăm.

Din zonele în care ciuperca apare mai puțin amestecată și cu alte microorganisme, se ia o mică porțiune care se însămânțează din nou. Repetând această operație de mai multe ori, se purifică cultura, de microorganisme străine, izolând astfel ciuperca pe care dorim să o studiem. După ce s-a obținut cultura pură în vase Petri, ciuperca se însămânțează din nou în eprubete, spre a putea păstra izolatul mai multă vreme (2-3 luni), la temperatură scăzută (2-4°C). După această perioadă, culturile trebuie însămânțate din nou, spre a le îmbospăta.

Pentru purificarea culturilor de ciuperci, se folosesc o serie de factori chimici care inhibă creșterea bacteriilor. Dintre acești factori chimici, se folosesc frecvent penicilina, streptomicina, cloramfenicolul etc. Penicilina (20-40 unități/ml mediu de cultură) și streptomicina (40-100 unități/ml mediu de cultură) se adaugă după sterilizare, când mediul s-a răcit la 45°C. Cloramfenicolul (0,05 mg/ml mediu de cultură) poate fi inclus înainte de sterilizare (Constantinescu, 1974).

După efectuarea însămânțării, pe vasele cu mediul de cultură se notează specia cultivată, data efectuării operației, mediul de cultură folosit etc. Mediile de cultură însămânțate cu ciuperci se pun în termostat, la temperatura optimă (20-22 °C) de creștere și dezvoltare, timp de 10-15 zile. Periodic, la intervale egale de timp, se fac observații și se notează caracterele morfologice ale coloniilor obținute.

### **6.3. Tehnica examenului microscopic al ciupercilor**

Caracterele morfologice și/sau ultrastructurale ale ciupercilor pot fi studiate în preparate la microscopul optic și/sau la microscopul electronic.

#### **Microscopie optică la ciuperci**

Pentru examinare la microscopul optic, ciupercile trebuie fixate pe un suport transparent, într-un mediu al cărui indice de refracție este cât mai apropiat de cel al sticlei. În general, în preparate se montează sporii ciupercilor, împreună cu structurile pe care se formează sau fragmente ori secțiuni din țesuturile vegetale în care acestea se găsesc.

Preparatele microscopice pot fi provizorii sau permanente. Preparatele provizorii se păstrează numai atât cât este necesar pentru examinare rapidă, iar cele permanente pot fi conservate timp îndelungat în colecții. Efec-tuarea preparatelor presupune parcurgerea mai multor etape: prelevarea, montarea, colorarea, fixarea și lutarea (Constantinescu, 1974).

#### **Prelevarea materialului**

Pentru efectuarea unui preparat microscopic, se detașează direct de pe substrat (frunze, semințe etc.) sau din cultură, un fragment de ciupercă, folosind un ac spatulat sau un ac de însămânțat. Fragmentul detașat se pune pe o lamă de sticlă, într-un lichid de montare. Ulterior, se acoperă cu lamela de sticlă și se examinează la microscop.

#### **Montarea**

Această etapă constă în includerea materialului fungic - miceliu, spori etc. - într-un mediu de montare. Mediul de montare - soluția în care se include materialul - poate rămâne lichid sau se poate solidifica prin evaporarea solventului.

Pentru efectuarea preparatelor micologice se pot folosi diferite medii de montare, precum apa, lactofenolul, acidul lactic etc.

**Apa.** Dacă există suficient material, orice ciupercă trebuie examinată într-un preparat provizoriu în apă de robinet sau apă distilată, deoarece nici un mediu de montare nu are un indice de refracție, atât de scăzut, ca apa.

**Lactofenolul.** Este cel mai folosit lichid de montare în micologie. Într-o singură operație se asigură fixarea, clarificarea țesuturilor, colorarea

(dacă se adaugă un colorant), conservarea și redă turgescența normală a miceliilor sau sporulației contractate. Lactofenolul este miscibil cu majoritatea coloranților și mai ales cu derivații de anilină (Constantinescu, 1974).

Se prepară din:

Fenol cristalizat ..... 20 g  
Glicerină ..... 31 ml  
Acid lactic ..... 16 ml  
Apă distilată ..... 20 ml

Primele trei componente se amestecă și se încălzesc până se dizolvă cristalele de fenol. Se filtrează prin hârtie de filtru, obținându-se astfel lactofenolul anhidru. Acesta se poate hidrata prin adăugarea apei distilate (Constantinescu, 1974). La prepararea lactofenolului hidratat, se încălzește fenolul cu apa până la dizolvare, apoi se adaugă acidul lactic și glicerina. Pentru a împiedica oxidarea (înnegrirea) sa, lactofenolul se păstrează în sticle brune (Șerbănescu-Jitariu și colab., 1983).

**Cloral-lactofenol.** Acest lichid de montare are un indice (1,49) de refracție ridicat și clarifică mai bine decât lactofenolul (Dade, 1960a, citat de Constantinescu, 1974).

Se prepară din:

Cloral hidrat (cristalizat) ..... 20 g  
Fenol (cristalizat) ..... 10 g  
Acid lactic ..... 10 ml

**Acidul lactic.** Este un lichid (mediu) foarte bun de montare, dar mărește volumul materialelor incluse (Constantinescu, 1974). La acidul lactic se poate adăuga bleu coton sau alt colorant.

## Colorarea

În micologie, se folosesc diferiți coloranți. Dintre aceștia, câțiva se folosesc pentru colorarea citoplasmei și pereților celulari la ciuperci.

**Bleu coton** (Albastru de anilină, Coton blue). În funcție de solventul folosit, se cunosc diferite rețete de preparare a acestui colorant, în vederea utilizării.

**Bleu coton în lactofenol.** Se folosește pentru colorarea citoplasmei celulelor fungice. Se prepară din 1,0 g bleu coton pulbere la 200 ml apă distilată, se încălzește și se agită până la dizolvarea completă a colorantului. Apoi, se filtrează. Se amestecă (per volum) o parte din soluția obținută cu 4 părți lactofenol anhidru. Astfel, se obține o soluție cu o concentrație de 0,10%.

Colorarea se poate face prin introducerea materialului prelevat în soluția concentrată de 0,10%, încălzire și apoi transferare în lactofenol pur

sau prin montarea directă în soluție diluată. Soluția diluată se obține din o parte bleu coton 1,0% în lactofenol și 2 părți lactofenol hidratat.

**Bleu coton în acid lactic.** Se obține prin dizolvare, la temperatura camerei, a 0,05 g bleu coton pulbere în 30,0 ml acid lactic. După 24 ore, soluția se filtrează. Este un colorant la fel de bun ca bleu coton în lactofenol (Constantinescu, 1974).

**Bleu coton în acid acetic.** Colorantul se prepară din apă distilată (100ml), bleu coton (0,5g) și acid acetic (3ml). Este indicat pentru colorarea culturilor fungice pe lame sau a secțiunilor prin țesuturi vegetale care conțin ciuperci.

Cultura se deshidratează la 37°C, se fixează cu o picătură de alcool etilic 95% care se lasă să se evapore. Se colorează cultura câteva minute cu o picătură de colorant, se spală în apă, se deshidratează cu alcool etilic și se montează în balsam (Constantinescu, 1974).

**Albastru de tripan** (Trypan blue). Se folosește în concentrație de 0,1-0,5% în acid acetic, pentru colorarea ciupercilor. De asemenea, se poate folosi în concentrație de 0,2% în lactofenol. Încălzirea preparatului grăbește colorarea, care se continuă apoi în timp. Colorează citoplasma în albastru-indigo.

**Fucsină.** Colorantul se poate prepara, după diferite rețete.

**Fucsină acidă.** Este un colorant citoplasmatic. Se prepară din fucsină acidă 0,1 g în 100 ml lactofenol.

**Lacto-fucsină.** Este un colorant superior bleu cotonului în lactofenol, deoarece colorarea este mai rapidă, iar celulele se văd mai bine și pot fi fotografiate cu ușurință. Se prepară din 0,1 g fucsină acidă care se dizolvă în 100 ml acid lactic anhidru. Este un colorant citoplasmatic.

### **Montarea și lutarea preparatelor microscopice**

În laboratorul de micologie, se folosește frecvent lichid de montare care conține colorant. Așa sunt fucsina acidă, lacto-fucsină, bleu coton în lactofenol etc. De aceea, montarea și colorarea materialului fungic prelevat se face concomitent pe aceeași lamă de sticlă, folosind lichide de montare care conțin colorant. Dacă lichidul de montare nu conține colorant, atunci, colorarea se face înainte de montare.

Lamele de sticlă și lamelele folosite pentru efectuarea preparatelor microscopice trebuie spălate cu detergent, clătite cu apă de robinet, apă distilată și apoi uscate.

După curățire, lamele și lamelele se păstrează în alcool etilic 70% sau în vase de sticlă acoperite, pentru a fi ferite de praf. În cazul păstrării în

alcool etilic, lamele și lamelele se scot din lichid și se șterg cu o pânză moale, curată, înainte de utilizare.

### **Montarea materialului**

Pe o lamă microscopică curată se pune la mijloc sau la 1/3 față de unul din capete o picătură din lichidul de montare (fucsină acidă, lactofucsină, bleu coton în lactofenol etc.). Materialul fungic – miceliu, spori etc. – prelevat se pune apoi în lichidul de montare de pe lamă, cu ajutorul unui ac de însămânțat. După aceea, se așază lamela cu o latură pe suprafața lamei, la o distanță mică față de picătura de lichid.

Cu ajutorul unui ac, se coboară lent lamela peste picătura din lichidul de montare. Astfel pregătit, preparatul microscopic se poate examina la microscop. Dacă dorim să realizăm preparat durabil, acesta se încălzește până la evaporarea completă a urmelor de lichid.

### **Etanșarea preparatelor**

Etanșarea preparatelor în medii lichide este necesară, pentru a evita evaporarea lichidului de montare. Astfel, se obțin preparate durabile. Preparatele microscopice montate în medii (balsam de Canada, gumă arabică, glicerină gelatinată etc.) care se solidifică, nu se etanșează.

Pentru etanșarea preparatelor, se folosesc diferite materiale, precum: lacul pentru unghii, rășini naturale, rășini sintetice etc. Lacul pentru unghii a devenit cel mai utilizat lut, datorită faptului că se usucă rapid, se manipulează ușor și este eficient (Constantinescu, 1974).

### **Microscopie electronică la ciuperci**

Caracteristicile morfologice ale ciupercilor pot fi evidențiate în preparate, la microscopul electronic scanning, iar cele ultrastructurale, la microscopul electronic cu transmisie, conform datelor din literatură (Vanky, 1994; Hayat, 2000).

Pentru evidențierea caracteristicilor ultrastructurale la microscopul electronic cu transmisie, se parcurg următoarele etape, necesare realizării unei probe: recoltarea materialului micologic; prefixarea cu soluție de glutaral-dehidă (2,7%) în tampon fosfat; spălări succesive cu tampon fosfat 0,15 M (după a patra spălare se lasă peste noapte, la frigider); postfixarea în soluție de OsO<sub>4</sub> 2 % în tampon fosfat 0,15 M; deshidratarea în soluții de acetonă de concentrații crescătoare (50%-100%); infiltrarea și includerea în rășină poliestică; efectuarea secțiunilor la ultramicrotom și contrastarea cu



acetat de uraniu și citrat de plumb; examinarea secțiunilor la microscop, analiza imaginilor și interpretarea rezultatelor.

Pentru evidențierea aspectelor morfologice ale ciupercilor, la microscopul electronic scanning, trebuie parcurse următoarele etape: recoltarea directă a probelor; centrifugarea materialului, dacă este necesar; acoperirea materialului, prin stropire, cu Au sau Ag, în vid; examinarea probei la microscop, analiza și interpretarea rezultatelor.

#### **6.4. Noțiuni de micrometrie**

Pentru studiul bacteriilor și ciupercilor microscopice, trebuie să cunoaștem dimensiunile lor. Aceasta prezintă importanță pentru determinare. Pentru aceasta, se fac măsurători și este necesar să cunoaștem puterea de mărire a aparatelor optice cu care se lucrează.

În micrometrie se folosesc micrometrul ocular și micrometrul obiectiv, pentru determinarea indicelui micrometric.

Micrometrul ocular este un rondel (disc) de sticlă care se introduce în ocularul microscopului cu care se lucrează. Rondelul de sticlă are gravată la mijloc o scară gradată de 1 cm și împărțită în 100 părți egal depărtate una de alta.

Fiecare diviziune a acestei scări este egală cu 1/10 de milimetru (0,1 mm). Înainte de a efectua măsurători, trebuie stabilite, pentru fiecare ocular și obiectiv ale diferitelor microscopice, valoarea în microni ( $\mu\text{m}$ ) a unei diviziuni de pe micrometrul ocular. Pentru a afla aceasta, se determină indicele micrometric.

Pentru determinarea indicelui micrometric, se folosește micrometrul obiectiv. Acesta este o lamă de sticlă în mijlocul căreia este gravată o scară gradată lungă de 1 mm și împărțită în 100 părți egale. Fiecare diviziune este egală cu 1/100 de milimetru (0,01 mm).

Pentru determinarea indicelui micrometric, așezăm micrometrul ocular în ocularul microscopului și micrometrul obiectiv pe platina microscopului. Potrivim ca diviziunile scării micrometrului ocular să se suprapună exact peste un anumit număr de diviziuni ale micrometrului obiectiv.

Indicele micrometric ( $I_m$ ) se calculează după formula:

$$I_m = (\text{ob} \times 10) : \text{oc}$$

în care:

ob = reprezintă numărul de diviziuni ale micrometrului obiectiv care se suprapun exact peste un anumit număr de diviziuni din micrometrul ocular.

$oc$  = reprezintă numărul de diviziuni ale micrometrului ocular care se suprapun exact peste un anumit număr de diviziuni din micrometrul obiectiv.

Im se exprimă în microni ( $\mu m$ ). În acest mod se apreciază cât este Im pentru fiecare obiectiv al microscopului cu care se lucrează. Cunoscând valoarea în microni ( $\mu m$ ) a unei diviziuni din micrometrul ocular și numărul de diviziuni corespunzătoare dimensiunilor celulei fungice sau bacteriene, pe care o măsurăm, putem aprecia lungimea și lățimea acestora.