

COMBATEREA CU EXTRACTE DIN PLANTE A PUTREGAIUL CENUȘIU PROVOCAT DE *BOTRYTIS CINEREA* PERS.

CONTROL OF GRAY MOLD CAUSED BY *BOTRYTIS CINEREA*, WITH HERBAL EXTRACT

Raluca Miclea, Carmen Puia
USAMV Cluj-Napoca

INTRODUCERE

Tendențele actuale se îndreaptă spre o utilizare redusă a pesticidelor cu aplicare post-recoltare la fructele proaspete și legume. Ca un răspuns la acestea, abordări biologice și fizice au fost evaluate ca o modalitate mai sigură comparativ cu folosirea fungicidelor chimice (Droby *et al.*, 2002 citați de Odeh, 2006). Majoritatea antifungicelor au diferite dezavantaje în ceea ce privește toxicitatea, eficacitatea și costurile, iar utilizarea frecventă a acestora a dus la apariția de tulpini rezistente.

În plus, în ultimii ani presiunea publică de a reduce folosirea fungicidelor sintetice în agricultură a crescut. S-au ridicat probleme cu privire la impactul asupra mediului și la potentialul risc asupra sănătății oamenilor datorat folosirii acestor compuși. Prin urmare, există o mare cerere de noi produse antifungice care să aparțină unei game largi de clase structurale, care să acționeze selectiv asupra noilor ținte și care să prezinte mai puține efecte secundare (Maria Jose Abad *et al.*, 2007).

O abordare ar putea fi testarea de plante utilizate în mod tradițional pentru activitățile lor antifungice ca potențiale surse pentru dezvoltarea de produse de combatere (Maria Jose Abad *et al.*, 2007). Produsele naturale, fie ca și compuși puri sau ca extracte din plante standardizate, asigură oportunități nelimitate pentru obținerea de noi substanțe datorită disponibilității mari a diversității chimice (Maria Jose Abad *et al.*, 2007).

DESCRIEREA PATOGENULUI

Botrytis cinerea Pers. este principalul organism responsabil pentru putregaiul cenușiu al strugurilor și altor fructe și legume, care poate afecta foarte puternic calitatea și cantitatea recoltei (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006 citați de Coetzee *et al.*, 2007).

Botrytis cinerea Pers. poate fi clasificată ca o ciupercă cosmopolită, filamentoasă, mare care aparține regnului *Mycetae*, diviziunii *Eumycota*, clasei *Hyphomycetes*, familiei *Moniliaceae* și genului *Botrytis*. La un microscop cu obiectiv mare această specie apare sub forma unor ciorchini asemănători cu cei de strugure (Coetzee *et al.*, 2007).

Miceliul ciupercii este alcătuit din hife septate și ramificate care pot pătrunde ectofit în spațiile intercelulare ale țesuturilor atacate. Pe miceliu se diferențiază conidiofori lungi, septați, monopodial ramificați în porțiunea terminală. Ultimele ramificații ale conidioforilor prezintă sterigme scurte, care poartă conidii unicele, ovoidale brune sau gălbui. La maturitate conidiile se desprind cu ușurință și sunt împrăștiate de vânt pe organele sănătoase (Grigaliunaite, 2001).

Scleroții (organele de rezistență) joacă un rol important în procesul de perpetuare a ciupercii. De formă oval-aplatizată cu suprafața rugoasă, măsurând 2-4 mm lungime și 1-3 mm lățime, scleroții, sunt compuși din două părți diferite: cortex și medula. Inițial sunt de culoare albă, apoi brună și în final neagră. Primăvara din germinarea scleroților rezultă de regulă, forma conidiană care produce infecțiile primare, pregătind epidemia (Coley-Smith, 1980 citat de Holz *et al.*, 2007).

Numele stadiului asexual sau anamorf, *Botrytis cinerea*, este mai des folosit decât numele stadiului sexuat sau teleomorf, *Botryotinia fuckeliana* (Ten Have, 2000).

Fungul este un patogen necrotic care ucide celulele plantelor și trăiește pe țesuturile moarte (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006 citați de Coetzee *et al.*, 2007).

Numele speciei *Botrytis cinerea* Pers. este derivat din latinescul pentru "struguri ca cenușa"; cuvântul "strugurii" referindu-se la mănunchiul de sporii ai ciupercii care se formează pe conidiofori și "cenușă" la culoarea gri a sporiilor în masă (Coetzee *et al.*, 2007).

Botrytis cinerea Pers. a fost semnalată la noi în țară în anul 1963, în serele și solariile de la Institutul de Cercetări Băneasa, București.

Datorită faptului, că genul *Botrytis* prezintă o importanță practică deosebită, a fost studiat atât din punctul de vedere al taxonomiei, al bioecologiei, biologiei moleculare, dar și al prevenirii și combaterii bolilor pe care le produce la numeroase plante-gazdă.

COMBATEREA CU EXTRACTE DIN PLANTE

Botrytis cinerea Pers. este dificil de controlat, deoarece are o varietate de moduri de atac, gazde diverse ca surse de inocul, și se poate

supraviețui ca miceliu și/sau conidii sau pentru perioade lungi ca scleroți pe resturile vegetale. Pentru aceste motive, utilizarea unui singure măsuri de control este puțin probabil să aibă succes și o înțelegere mai detaliată a interacțiunii gazdă-patogen, a mediului în care ciuperca funcționează și a concurenților săi microbieni pe gazdă este esențială (Williamson et al., 2007).

Lupta împotriva bolilor fungice provocate de *Botrytis cinerea* Pers. necesită utilizarea de fungicide, modificarea tehnicilor de cultivare, precum și dezvoltarea de cultivare rezistente sau tolerante. Costurile tratamentelor cu fungicide împotriva *Botrytis cinerea* Pers. s-au ridicat la aproximativ 540 milioane de euro în 2001, ceea ce reprezintă 10% din piața mondială a fungicidelor (Raportul anual UIPP, 2002, citat de Elad et al., 2007). Un efort considerabil este investit în protecția, împotriva *Botrytis*, a produselor agricole înainte și după recoltare. Dimensiunea pieței de produse anti-*Botrytis* au fost 15 la 25 milioane de dolari în ultimii ani. Intensitatea măsurilor anti-*Botrytis* luate de către agricultori a continuat neabătută în lungul ultimilor 20 de ani (Elad et al., 2007).

În 35 de ani de la prima utilizare comercială a metil - benzimidazolului carbamat (CBM) s-a ajuns la concluzia că pentru fiecare fungicid nou, riscul de rezistență a specie *Botrytis cinerea* Pers., este puternic, dacă produsul este aplicat în mod repetat. În consecință, programe mixte de pulverizare au fost concepute, în mod ideal, cu substanțe alese din grupe diferite de fungicid, pentru a reduce riscul de apariție a rezistenței la acestea și pentru a menține sub nivelul maxim permis fiecare ingredient active. Problema apare, totuși, atunci când unele culturi horticole au nevoie de protecție pe perioade lungi, din cauza înfloriri și fructificării secvențiale.

Substanțele chimice folosite pentru controlul speciei *Botrytis cinerea* Pers. au fost recent revizuite (Leroux, 2004 citat de Williamson et al., 2007). Cinci categorii de fungicide sunt recunoscute, și anume cele care afectează respirația, asamblarea microtubulilor, osmoreglarea, inhibitorii steroli de biosinteza și cele a căror toxicitatea este inversată de către aminoacizi (Rosslensbroich and Stuebler, 2000 citati de Williamson et al., 2007). Substanțe toxice care afectează mai respirația fungică au fost folosite împotriva *Botrytis cinerea* Pers., pe o perioadă lungă de timp fără ca populațiile fungice să dezvolte rezistență (de exemplu, tiram, mancozeb, captan, diclofluanid, tolylfluanid) (Leroux, 2004 citat de Williamson et al., 2007).

Asadar este nevoie de dezvoltarea unor strategii alternative pentru controlul putregaiului cenusiu, strategii care sa fie sigure,

eficiente, economice și compatibile cu practicile comerciale de manipulare.

Controlul biologic reprezintă o strategie propusă, la un simpozion organizat în Berkeley, în 1965 intitulat „Ecologia patogenilor din sol ai plantelor; un preludiu al controlului biologic” (Baker and Snyder, 1965 citați de Pal and McSpadden Gardener, 2006). Patruzeci de ani mai târziu, controlul biologic al bolilor plantelor este încă la început, și doar câțiva agenți biologici de control sunt disponibili pe piața europeană (Pal and McSpadden Gardener, 2006). Control biologic s-a dezvoltat ca o disciplină academică în timpul anilor 1970 și acum este o știință matură susținută, atât în sectorul public cât și cel privat (Baker 1987 citat de Pal and McSpadden Gardener, 2006). Sunt puține produse destinate luptei biologice cu patogenii, care sunt folosite în prezent, deoarece majoritatea metodelor de combatere biologică a patogenilor sunt încă în faza de cercetare (www.fermierul.ro).

Aceste metode prezintă avantaje și anume:

- ✓ lipsa de toxicitate față de animale și oameni,
- ✓ fitotoxicitate redusă,
- ✓ caracterul nepoluant, urmează să ocupe un loc mai important în viitor în combaterea bolilor plantelor (www.fermierul.ro).

În fitopatologie, se aplică la utilizarea de antagoniști microbieni în suprimarea bolilor. În ambele domenii, organismele care suprimă dăunătorul sau agentul patogen este menționată ca agent de control biologic (BCA) (Williamson et al., 2007) iar Elad și Stewart (2007) au studiat modurile de acțiune și utilitatea agenților de control biologic împotriva *Botrytis cinerea* Pers.

În sens larg, termenul de control biologic, de asemenea, a fost aplicat la utilizarea de produse naturale extrase sau fermentate din diverse surse. Aceste formule pot fi foarte simplu amestecuri de ingrediente naturale, cu activități specifice sau amestecuri complexe, cu efecte multiple asupra organismului gazdă și asupra agentului patogen (Pal and McSpadden Gardener, 2006).

Acest lucru a dus la o căutare de alternative terapeutice, în special în rândul plantelor medicinale și compușilor izolați din ele utilizate pentru proprietățile lor empirice, antifungice. În aceste surse naturale, au fost găsite o serie de molecule cu activitate antifungică împotriva diferitelor tulpini de ciuperci, care sunt de o mare importanță pentru oameni și plante (Maria José Abad *et al.*, 2007).

În ceea ce privește combaterea biologică a putregaiului cenușiu provocat de *Botrytis cinerea* Pers. cu substanțe naturale, cercetările

recente sau axat pe căutarea de noi compuși activi împotriva ciupercii, care ar putea avea potențial de control al bolii. Unii compuși naturali au fost deja identificați (Antonov *et al.*, 1997).

Recent, au fost confirmate proprietăți antifungice în extracte crude și semipurificate de plante (Blaeser and Steiner, 1999, Pretorius *et al.*, 2002 citați de Tegegne and Pretorius, 2007). Mai mult, chiar dacă comunitatea științifică acceptă sau nu aplicarea extractelor crude de plante pentru controlul bolilor și a dăunătorilor în sistemele de cultivare reprezintă o practică standard în majoritatea țărilor în curs de dezvoltare (Dales, 1996 citat de Tegegne and Pretorius, 2007).

Activitatea antifungică *in vitro* a extractelor crude de la trei specii de plante etiopiene (*Dolichos kilimandscharicus* (rădăcină), *Phytolacca dodecandra* (fructe) și *Maerua subcordata* (rădăcină) a fost testată împotriva *Botrytis cinerea* Pers.; extractele metanolice ale diferitelor plante inhibând creșterea miceliului ciupercii (Tegegne and Pretorius, 2007).

Uleiurile esențiale sunt substanțe concentrate, hidrofobe care conțin compuși volatili aromatici extrași din plante. Acestea pot asigura alternative potențiale pentru agenții de control folosiți în mod curent, deoarece uleiurile esențiale sunt bogate în substanțe bioactive (Isman, 2000 citat de Sara Burt, 2004). Aceste substanțe au fost raportate ca având activități biologice cu efecte antifungice (Sara Burt, 2004).

Sunt cunoscute un număr de aproximativ 3000 uleiuri esențiale, dintre care 300 sunt importante din punct de vedere economic (Van de Braak and Leijten, 1999 citați de Sara Burt, 2004).

Avantajul uleiurilor esențiale este reprezentat de bioactivitatea lor în faza de vapori, o caracteristică ce le face atractive pentru fumigarea în scopul protejării produselor stocate. Uleiurile esențiale au un rol important în mecanismele de apărare ale plantelor împotriva microorganismelor fitopatogene (Mihaliak *et al.*, 1991 citați de Tripathi and Dubey, 2004).

Majoritatea uleiurilor esențiale inhibă fungii *in vitro* (Bishop and Reagan, 1998; Singh and Tripathi, 1999; Bellerbeck *et al.*, 2001; Hidalgo *et al.*, 2002 citați de Tripathi and Dubey, 2004). Totuși, au fost studiate eficiența *in vivo* și activitatea practică a doar câtorva uleiuri esențiale. Fumigarea cireșelor cu timol a fost eficientă în controlul putregaiului cenușiu cauzat de *Botrytis cinerea* Pers. (Chu *et al.*, 1999 citați de Tripathi and Dubey, 2004). Fumigarea cu timol la 30 mg/l a redus incidența putregaiului cenușiu de la 35% la fructele netratate până la 0.5%.

Perspectiva folosirii uleiurilor din plante ca fungicide este foarte atrăgătoare, datorită faptului că sunt nepoluante și sunt o alternativă la fungicidele sintetice pentru agricultura organică (Northover and Scheider, 1993 citați de Yulia, 2005).

Un număr mare de studii au fost efectuate în ultimii ani cu privire la activitatea antifungică a terpenoidelor de origine naturală (sesquiterpene și sesquiterpene lactone). Unii dintre acești compuși au fost izolați prin fracționare controlată după detectarea în prealabil a activității antifungice în anumite zone ale plantei (Maria José Abad *et al.*, 2007).

Compuși chimic înrudiți cu grupul triterpenicilor, cum ar fi saponinele triterpene, împreună cu saponinele steroidale, au fost, de asemenea, izolate sub formă de constituenți antifungici din plante medicinale (Maria José Abad *et al.*, 2007).

În ultimii ani, un număr mare de studii, au fost efectuate cu privire la activitatea antifungică a compușilor fenolici și de origine naturală. Această secțiune se ocupă în principal cu acele clase de fenoli, cu proprietăți antifungice, găsiți în plantele medicinale, numiți compuși fenolici simpli, flavone și glicozide înrudite cu flavonoidele, cumarinele și derivați, precum și antrachinone (Maria José Abad *et al.*, 2007).

Activitățile fungicide a speciei *Cassia tora* L. (Leguminosae) și a principiilor sale active au fost determinate împotriva *Botrytis cinerea* Pers. Emodin, physcion și rhein au fost izolate și au arătat puternică activitate fungică împotriva microorganismului testat (Maria José Abad *et al.*, 2007).

Rapoarte privind acțiunea antifungică a unor alcaloizi proveniți de la speciile medicinale au fost, de asemenea găsite în literatura de specialitate. Unele dintre aceste plante au fost raportate pentru a fi utilizate în medicina populară ca agenți anti-infecțioși (Maria José Abad *et al.*, 2007).

În ultimii ani, rapoarte privind activitatea antifungică a peptidelor și proteinelor izolate de la plante medicinale au vizat în principal specii din familia *Fabaceae*. Din semințe de boabe de fasole verde, *Phaseolus vulgaris* L. (Wong and Ng, 2005 citați de Maria José Abad *et al.*, 2007) au purificat o peptidă antifungică, numită vulgarinin, care a manifestat activitate antifungică față de speciile *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Physalospora piricola* și *Botrytis cinerea* Pers. (Maria José Abad *et al.*, 2007).

Din semințe de la altă specie de *Fabaceae*, *Phaseolus mungo* L., s-a izolat o lizozimă cu activitate antifungică (Wong *et al.*, 2005 citați de Maria José Abad *et al.*, 2007) față de *Botrytis cinerea* Pers.

Exemple de alte peptide antifungice și proteine obținute de la specii de plante medicinale, includ de asemenea o proteina asemănătoare taumatinei din banane *Musa acuminata* Colla (Leone et al., 2006 citați de Maria José Abad et al., 2007), și o proteină de la rizomii de *Zingiber officinalis* L. (*Zingiberaceae*), care au exercitat activitate antifungică asupra unor ciuperci fitopatogene, inclusiv *Botrytis cinerea* Pers. (Maria José Abad et al., 2007).

Fructele și legumele au un număr de compuși aromați constitutivi care sunt antimicrobieni iar aceștia nu au fost studiați pe deplin ca agenți de control biologic pentru bolile plantelor (Culter et al., 1986 citați de Tripathi and Dubey, 2004).

Acidul jasmonic (JA) și metil - jasmonatele (MJ) numiți în general jasmonate, sunt regulatori de creștere apăruți în mod natural de la plante (Sembdner and Parthier, 1993; Creelman and Mullet, 1995, 1997 citați de Pramila Tripathi and Dubey, 2004).

Recent s-a demonstrat că metil - jasmonatele pot fi aplicate cu success, ca tratament după recoltare, pentru a suprima putregaiul cenușiu cauzat de *Botrytis cinerea* Pers. la căpșuni (Moline et al., 1997 citați de Tripathi and Dubey, 2004). Droby et al. (1999) citați de Tripathi and Dubey (2004) a demonstrat că aplicarea de jasmonate reduce degradarea fructelor cauzată de putregaiul cenușiu după inocularea naturală sau artificială a fructelor de grapefruit, cultivarul "Marsh Seedless".

Când sunt aplicate în concentrații scăzute, jasmonatele sunt considerate potențiale tratamente aplicate după recoltare, pentru a întări rezistența naturală și pentru a reduce degradarea fructelor. Pentru că sunt compuși prezenți în mod natural și sunt aplicate în doze scăzute, jasmonatele pot asigura o metodă de reducere a folosirii substanțelor chimice, ce nu afectează mediul înconjurător, (Tripathi and Dubey, 2004).

Propolisul este o substanță naturală rășinoasă obținută din mugurii și coaja plopului și a coniferelor. Propolisul conține proteine, aminoacizi, vitamine, minerale și flavonoizi (Moreira, 1986; Walker and Crane, 1987; Stangaciu, 1997 citați de Tripathi and Dubey, 2004).

Această substanță are proprietăți antibiotice, antibacteriene și antifungice (Tosi et al., 1996; Lima et al., 1998 citați de Tripathi and Dubey (2004) au determinat proprietățile inhibitoare a propolisului asupra patogenului *Botrytis cinerea* Pers.

Fusapironele este un metabolit antifungic purificat din cultură de *Fusarium semitectum*, izolat din sol. Efectul inhibitor al fusapyrone împotriva creșterii speciei *Botrytis cinerea* Pers. a fost încercat atât *in vitro* cât și *in vivo* pe struguri (Altomare et al., 1998). Toxicitatea

scăzută asupra animalelor și absența fitotoxicității a dus la promovarea fusapyrone ca substanță antifungică folosită în controlul *Botrytis cinerea* Pers. atât la struguri cât și la alte culturi (Altomare *et al.*, 2000 citați de Tripathi and Dubey, 2004).

Chitosanul și derivații săi au proprietăți antifungice și de protecție a plantelor și pot declanșa mecanisme de apărare în plante, împotriva atacurilor de agenți patogeni la concentrații foarte mici (Capdeville *et al.*, 2002 citați de Tripathi and Dubey, 2004).

CONCLUZII

Pericolele pentru sănătatea umană, prin aportul de reziduuri de pesticide în produse alimentare, intoxicații potențiale ale utilizatorilor în timpul aplicării și pericolele ecologice ar trebui să impună căutarea de alternative și minimizarea utilizării pesticidelor. Combaterea integrată ar trebui să poată limita utilizarea pesticidelor iar siguranța, modul de acțiune și biodegradabilitatea sunt aspecte importante care ar trebui să fie luate în considerare înainte de eliberarea unor noi pesticide.

Această lucrare indică faptul că există o distribuție globală a plantelor cu proprietăți fungice care pot avea potențialul de a fi folosite în programele de control al bolilor. În timp ce sunt efectuate cercetări pentru a găsi alternative, ar trebui să se accentueze legile și educația pentru furnizorii și consumatorii cu referire la efectele nocive și utilizarea în siguranță a pesticidelor (Berger A., 1995).

BIBLIOGRAFIE

1. ABAD MARIA JOSÉ, MARÍA ANSUATEGUI, PAULINA BERMEJO, 2007, Active antifungal substances from natural sources, Issue in Honor of Prof. Atta-ur-Rahman, ARKIVOC (VII), 116-145.
2. ANTONOV A., A. STEWART, M. WALTER, 1997, Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products, Proc. 50th N.Z. Plant Protection Conf., 159-164.
3. BURT SARA, 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food—a review, International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.
4. COETZEE G., I.J. MARX, M. PENGILLY, V.S. BUSHULA, E. JOUBERT, M. BLOOM, 2007, Effect of rooibos and honeybush tea extracts against *Botrytis cinerea* Pers.; S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 29, No. 1, 33-38.
5. ELAD Y., ALISON STEWART, 2007, Microbial control of *Botrytis* spp., În Y. Elad et al. (eds.), Botrytis: Biology, Pathology and Control, 223-241.
6. ELAD Y., B. WILLIAMSON, P. TUDZYNSKI, NAFIZ DELEN, 2007, *Botrytis*: Biology, Pathology and Control, Springer.

7. GRIGALIUNAITE B., 2001, Fungi of the genus *Botrytis* P. Micheli: Pers. plants in Lithuania, *Biologija*, nr. 3, 14-17.
8. ODEH M. I. A., 2006, Biological Control of Gray mold, Blue mold and Rhizopus soft rot on Grape, pear, kiwi, strawberry by *Trichoderma harzianum*., An-Najah National University Faculty of Graduate Studies;
9. PAL, K. K., B. MCSPADDEN GARDENER, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*;
10. TEGEGNE G., Æ JOHAN, C. PRETORIUS, 2007, In vitro and in vivo antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from Ethiopian wild plants against economically important plant pathogens, *BioControl*, 52:877–888;
11. Ten HAVE A., The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family, 2000, PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen The Netherlands,
12. TRIPATHI PRAMILA, N.K. DUBEY, 2004, Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables, *Postharvest Biology and Technology*, 32: 235–245.
13. YULIA E., 2005, Antifungal activity of plant extracts and oils against fungal pathogens of pepper (*Piper nigrum* L.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume.), and turmeric (*Curcuma domestica* Val.), essential oil of *Satureja montana* from central Italy, *Chemistry of natural compounds*, Vol. 43, No. 5.

***www.fermierul.ro