

**CERCETĂRI PRIVIND BIOLOGIA ȘI COMBATEREA CU  
EXTRACTE DIN PLANTE A PUTREGAIULUI CENUȘIU  
PROVOCAT DE *BOTRYTIS CINEREA* PERS - rezumat al tezei de  
doctorat**

**RESEARCHES REGARDING THE BIOLOGY AND THE  
BIOLOGICAL CONTROL WITH PLANT EXTRACTS OF GRAY  
MOLD CAUSED BY *BOTRYTIS CINEREA* PERS. - PhD thesis  
summary**

**Raluca MICLEA**  
USAMV Cluj-Napoca

Teza de doctorat a fost realizată sub îndrumarea  
**Prof. univ. dr. Carmen PUIA**

**Abstract:**

The current trends of reducing the use of pesticides leads to the evaluation of biological control methods as safer alternative compared to the synthetic fungicides. Phytopreparations are one of the perspective means of plants biological protection because they have a sufficiently effective impact, the extraction it is not complicated and long and also are harmless to the environment and people. The main purpose of the thesis entitled "Researches regarding the biology and the biological control with plant extracts of gray mold caused by *Botrytis cinerea* Pers." was the study of the *Botrytis cinerea* biology and the control of gray mold using biological methods, namely the effect of different plant extracts on emergence and development of the mycelium. The objectives of this thesis were the was isolation of *Botrytis cinerea* fungus from different host plants, the morphologically and cultural characterization of the isolates, the

establishment of the macroscopic and microscopic phenotypic differences, the obtaining of the tinctures and the in vitro determination of the fungistatic and fungicidal character of tinctures and the testing of the extracts effectiveness on gray mold from stored fruits. The experiments were performed on isolated 27 and 10 hydroalcoholic extracts were used: *Aloe* sp, *Tagetes* sp., *Satureja hortensis*, *Aristolochia clematidis*, *Helleborus purpurascens*, *Allium sativum* and propolis. The results indicated a high-efficiency for the majority of the extracts tested *in vitro*, the level of inhibition was different depending on the concentration and on the isolate against which was applied. Propolis tincture recorded total inhibitory effect at all concentrations applied in the case of all the isolates followed by *Satureja hortensis*, *Tagetes* sp. and *Aristolochia clematidis* who had total fungistatic effect at the lowest concentration applied.

## INTRODUCERE

Rapoartele despre bolile fungice din perioadele antice sau medievale sunt foarte rare și de asemenea foarte imprecise. Totuși, se pare că menționări despre putrezirea boabelor de struguri în vie, cauzată de fungi, sunt la fel de vechi ca și cultivarea viței de vie. Există puține rapoarte despre bolile fungice evidente la struguri de pe vremea lui Plinius cel Bătrân, în secolul I sau de mai târziu, în jurul anului 1350, de pe vremea lui Konrad von Mengengerg (Germania) (Rosslenbroich and Stuebler, 2000).

Genul *Botrytis* a fost citat pentru prima dată în anul 1729 de Micheli, în lucrarea *Nouveau Gen* (Oudemans, 1919 citat de Drobotă, 2008) iar denumirea sa provine de la cuvântul grecesc pentru „ciorchine de strugure” așadar putem ajunge la concluzia că simptomul bolii, așa-numitul „putregai cenușiu” la struguri trebuie să fi fost cunoscut de mulți ani. Multă vreme ciuperca nu a primit nici un nume special, astfel că Viala (1887) citat de Drobotă (2008) o desemnează sub denumirea de “putregaiul cenușiu” sau “putregaiul strugurilor”.

Specia *Botrytis cinerea* Pers. infectează un număr mare de plante gazdă, într-o mare varietate de condiții de mediu și în diferite zone geografice atât în câmp deschis cât și în sere și solarii. *Botrytis cinerea* Pers. deteriorează de asemenea produsele agricole depozitate datorită capacității acestuia de a fi activ și la temperaturi foarte scăzute (Coley-Smith et al., 1980).

Din cauza pagubelor tot mai mari produse de *Botrytis cinerea* Pers. precum și a gradului mare de extindere la plante din familii botanice diferite, ciupercii i s-a acordat o importanță sporită în ultimul timp (Drobotă, 2008).

Ținând cont de faptul că combaterea chimică a bolilor plantelor înregistrează o scădere, controlul biologic al bolilor plantelor prin intermediul extractelor din plante câștigă din ce în ce mai multă importanță, literatura de specialitate demonstrând faptul că utilizarea de produse naturale extrase sau fermentate, din diverse surse, amestecuri de ingrediente naturale, cu activități specifice sau amestecuri complexe, cu efecte multiple asupra organismului gazdă și asupra agentului patogen este un mecanism de control biologic important.

Fitopreparatele reprezintă adevărate mijloacele de perspectivă ale protecției biologice ale plantelor avînd mai multe avantaje, și anume: sunt în mare măsură eficiente, extragerea nu este complicată și lungă, sunt

inofensive pentru mediu și oameni, se descompun rapid în agrocenoză și folosirea lor de obicei este eficientă.

Ținând cont de aspectele menționate anterior și de faptul că putregaiul cenușiu poate avea un impact negativ asupra producției și calității recoltei prezenta teză a avut ca scop principal studiarea biologiei ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. și controlul biologic al acesteia cu extracte hidroalcoolice. Luând în considerare faptul că pe parcursul experiențelor am testat și extractul de propolis, care s-a dovedit a avea efect antifungic ridicat asupra dezvoltării acestui patogen, am introdus și această tinctură în prelucrarea experiențelor realizate, deși nu este un extract din plante.

## CAPITOLUL I

### CARACTERIZAREA SPECIEI *BOTRYTIS CINEREA* PERS.

*Botrytis cinerea* Pers. este cea mai importantă specie din cele 22 de specii ce aparțin genului *Botrytis* (Hennebert, 1973) și este unul dintre cei mai importanți patogeni fungici datorită caracteristicilor sale unice: poate trăi saprofit dar și parazit, poate fi devastator în unele culturi, poate fi de folos în anumite condiții și poate cauza infecții latente timpurii care nu provoacă daune decât în timpul coacerii fructelor (Rosslenbroich and Stuebler, 2000).

#### 1.1. IMPORTANȚĂ

Datorită caracteristicilor sale polifage și necrotrofice, *Botrytis cinerea* Pers. este un bun model pentru studiul proceselor infecțioase fungice.

Oamenii de știință din patologia plantelor au fost fascinați de infecția conidiană a putregaiului cenușiu asupra țesuturilor plantelor de foarte timpuriu astfel că Ward (1888) citat de Elad et al. (2004) a descris infecția speciilor de *Botrytis* prin tuburile germinative.

*Botrytis cinerea* Pers., prin urmare, este un model excelent pentru studiul acestui tip de procese infecțioase care este caracteristic pentru numeroase boli fungice ale plantelor utilizând o gamă largă de mecanisme patogene (enzime litice, forme de oxigen activat, toxine, hormoni din plante) pentru a ataca plantele sale gazdă ([www.genoscope.cns.fr](http://www.genoscope.cns.fr)).

#### 1.2 TAXONOMIE ȘI SINONIMII

*Botrytis cinerea* Pers. aparține subîncrângăturii *Deuteromycotina*, clasei *Hyphomycetes* ordinului *Moniliales*, familiei *Moniliaceae* (Carmen

Puia, 2006). Ciuperca dispersează predominant prin producerea masivă de clustere cenușii-maro de macroconidii.

Teleomorfa speciei *Botrytis cinerea* Pers. este specia *Botryotinia fuckeliana* din familia *Sclerotiniaceae*, ordinul *Helotiales*, clasa *Discomycetes*, subîncrengătura *Ascomycotina* (Carmen Puia, 2005).

### **1.3. CARACTERE MORFOLOGICE**

#### **1.3.1 Miceliu**

Miceliu ciupercii trăiește ca saprofit pe diverse substraturi organice sau ca parazit (Tomoioagă Liliana 2002, Fermaud and Philippe, 2000 citați de Droboță, 2008 și Iacob Viorica și colab., 2000), are o culoare cenușie, este abundent și cu conidiofori ramificați.

Miceliul poate pătrunde ectofit în spațiile intercelulare ale țesuturilor atacate până la vasele conducătoare (Pârvu, 2004). Prezintă celule apicale rotunjite, pe care se găsesc grupate în ciorchini mari, conidiile. Pe miceliu se diferențiază conidiofori lungi, septați, monopodial ramificați în porțiunea terminală. Ultimele ramificații ale conidioforilor prezintă sterigme scurte, care poartă conidii unicelulare, ovoidale brune sau gălbui (Carmen Puia, 2005, 2006).

#### **1.3.2 Macroconidii**

Conidiile speciilor de *Botrytis* sunt considerate de obicei organe de propagare, cu viață scurtă dar, există dovezi că, în anumite condiții, chiar și acestea pot asigura supraviețuirea speciei (Pârvu, 1993).

Tatiana Șesan și Tănase (2007) descriu conidiile de *Botrytis cinerea* Pers. ca având forma ovoidă, unicelulare, mai ascuțite la unul dintre capete, colorate brun, de dimensiuni cuprinse între 9,0-12,0 x 6,5-10,0 μm, cu 4-6 nucleii, fiecare cu câte un nucleol.

#### **1.3.3. Microconidii**

*Botrytis cinerea* Pers. pe lângă macroconidii formează și microconidii care pot să funcționeze ca inocul principal (Brierley, 1918 citat de Droboță, 2008). Forma de fructificare microconidiană a fost observată de Istvanffi citat de Droboță (2008).

Akutsu et al. (2004) citați de Fukumori et al. (2004) în cercetările lor au arătat pentru prima dată că pe timpul înmulțirii sexuate a speciei *Botrytis cinerea* Pers. microconidiile au fost produse în număr mare și că după împerecherea cu scleroții produși de această specie se formează organisme sexuate (apotecii, asce, ascospori).

### 1.3.4. Scleroți

*Botrytis cinerea* Pers. rezistă în sol sub formă de miceliu iar în organele bolnave sub formă de scleroți (Carmen Puia, 2005). Scleroții sunt organele de rezistență de culoare neagră și consistență tare, care joacă un rol important în procesul de perpetuare a ciupercii (Carmen Puia, 2005) și au o formă oval-aplatizată cu suprafața rugoasă, măsurând 2-4mm lungime și 1-3 mm lățime, fiind compuși din două părți diferite: cortex și medulla.

### 1.3.5 Forma sexuată a ciupercii

Deși legătura dintre *Botrytis cinerea* Pers. și *Botryotinia fuckeliana* a fost bănuită de mult timp nici o dovadă definitivă legată de identitatea acestor două forme nu fost publicată până la apariția lucrării lui Istvanffi, numită "Etudes microbiologiques et mycologiques sur le rot gris de la vigne—*Botrytis cinerea* ou *Sclerotinia fuckeliana*". Istvanffi a ajuns la concluzia că *Botrytis cinerea* Pers. este incontestabil stadiul conidian al speciei *Botryotinia fuckeliana*.

## 1.5 PLANTE GAZDA ȘI BOLI PROVOCATE

Simptomele provocate de *Botrytis cinerea* Pers. sunt foarte comune și răspândite pe scară largă (Gonsalves and Ferreira, 1994 citați de Odeh, 2006) această specie fiind o ciupercă cu o gamă extinsă de plante gazdă care include legumele, fructele moi, plantele ornamentale și vița de vie; apare în sere și în câmp dar și pe timpul depozitării și transportului, cauzând pierderi economice mari (Fukumori et al., 2004).

## 1.6 VARIABILITATE FENOTIPICĂ ȘI GENETICĂ

*Botrytis cinerea* Pers. are o variabilitate foarte mare și adaptabilitate la o gamă largă de condiții de mediu. În unele studii efectuate în Europa, s-a demonstrat că izolatele de *Botrytis cinerea* Pers. de pe legume prezintă o mare diversitate genetică și un mare debit de gene între populații (Alfonso et al., 2000, Moyano et al., 2003). Elucidând structura genetică prin măsurarea diversității genetice în interiorul și între populațiile agentului patogen este de mare importanță deoarece ajută la managementul bolii pe baza rezistenței la fungicide.

## **CAPITOLUL II**

### **CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND CONTROLUL BIOLOGIC AL PUTREGAIULUI CENUȘIU**

#### **2.1 METODE DE CONTROL BIOLOGIC**

Tendențele actuale de reducere a folosirii pesticidelor asupra culturilor precum și a fructelor și legumelor proaspete și depozitate duc la evaluarea de metode fizice și biologice ca alternative mai sigure în comparație cu fungicidele sintetice (Droby et al., 2002).

Abordări biologice care includ folosirea de organisme antagoniste, compuși naturali, practicile culturale și biotehnologia vor fi folosite pentru dezvoltarea de noi metode de management al bolilor (Wisniewski et al., 2003 citați de Odeh, 2006).

*Combaterea biologică se poate realiza prin: hiperparazitism, prin antagonismul dintre microorganisme, prin dezvoltarea mai bună a plantelor și prin folosirea unor insecte, folosirea antibioticelor, premunizare, utilizarea de soluri represive, folosirea substanțelor de natură vegetală.*

#### **2.2 CONTROLUL BIOLOGIC CU EXTRACTE DIN PLANTE**

Studiile din literatura de specialitate sugerează că fitopreparatele sunt unele dintre mijloacele de perspectivă ale protecției biologice ale plantelor. Impactul acestor preparate este suficient de eficient, extragerea nu este complicată și lungă, sunt inofensive pentru mediu și oameni, se descompun rapid în agrocenoză și folosirea lor de obicei este eficientă (Zarins et al., 2009).

*Experimental s-au obținut rezultate bune în combaterea unor fitopatogeni, cu extracte din ceapă, usturoi, hrean, mac, nuc, pin dar datorită dificultăților de extragere, până în prezent, nu sunt introduse în practică (Loredana Beatrice Frasin și colab., 2006).*

## **CAPITOLUL III**

### **OBIECTIVE. METODE ȘI MATERIALE DE CERCETARE**

#### **3.1. OBIECTIVELE TEZEI**

Pentru îndeplinirea obiectivelor sugerate de titlul proiectului, se urmărește în principal studierea biologiei speciei *Botrytis cinerea* Pers. precum și controlul putregaiului cenușiu prin metode biologice - extracte hidralcoolice; efectul diferitelor extracte din plante asupra apariției și dezvoltării miceliului.

Obiectivele propuse pentru realizarea temei de cercetare au fost următoarele:

1. Izolarea mai multor izolate ale ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. pe mediu de cultură și obținerea de tulpini pure din fiecare izolat.

2. Studiul biologiei diferitelor izolate de *Botrytis cinerea* Pers. - caracterizarea din punct de vedere morfologic și cultural a izolatelor ciupercii.

3. Stabilirea diferențelor fenotipice dintre diferitele izolate de *Botrytis cinerea* Pers. prin analize macroscopice și microscopice.

4. Obținerea și testarea de tincturi pentru controlul ciupercii *Botrytis cinerea* Pers.

5. Determinarea *in vitro* a caracterului fungicid sau fungistatic unor tincturi.

6. Testarea pe fructe depozitate a efectului extractelor hidroalcoolice asupra putregaiului cenușiu.

Aceste obiective au ca finalitate caracterizarea patogenului izolat de pe diferite plante gazdă, urmărirea dezvoltării ciupercii pe diferite substraturi nutritive precum și testarea eficienței unor extracte hidroalcoolice asupra creșterii și dezvoltării miceliului.

## **3.2 MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE FOLOSITE ÎN STUDIUL BIOLOGIEI CIUPERCII *BOTRYTIS CINEREA* PERS.**

### **3.2.1 Material biologic**

Materialul biologic folosit în realizarea experiențelor privind studiul biologiei ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. a fost constituit din mai multe izolate ale acestei specii prelevate de pe diferite plante gazdă și din locații diferite. În experiențele efectuate am izolat tulpini ale speciei *Botrytis cinerea* Pers. de la 17 plante gazdă.

Materialul biologic prelevat de pe cele 17 plante gazdă este constituit din 27 de izolate. Izolatele de pe mușcate au fost prelevate de pe varietățile Camdared, Cambi, Campeye, Rainbow white, Balcon imperial, Vile de Paris Lila iar izolatele de pe vița de vie de pe soiurile Chasselas, Isabela, Sauvignon blanc, Muscat ottonel.

### **3.2.2 Metode de cercetare**

Metodele de cercetare folosite în experiențe au constatat în:

- ✓ Izolarea patogenului de pe materialul vegetal
- ✓ Obținerea culturilor pure
- ✓ Cultivarea izolatelor ciupercii pe trei medii nutritive
- ✓ Observarea caracterelor culturale și morfologice ale diferitelor izolate luate în studiu
- ✓ Efectuarea de observații microscopice privind forma și mărimea conidiilor
- ✓ Observații privind apariția de scleroți și distribuția acestora

Obiectivul studierii caracterelor morfologice și culturale ale speciei *Botrytis cinerea* Pers., a fost acela de a efectua observații cu privire la unele trăsături ale acesteia, cum ar fi: ritmul de creștere a coloniei ciupercii (rata relativă de creștere), forma, dimensiunile, aspectul și culoarea coloniei, forma, tipul, culoarea hifelor miceliene, forma, culoarea și dimensiunile sporilor, apariția, numărul, aspectul și distribuția scleroților.

Astfel, materialul vegetal prelevat din diferite locații a fost spălat cu apă distilată după care a fost introdus în cameră umedă pentru 24-48 de ore, timp în care ciuperca s-a dezvoltat formând miceliul și sporulația caracteristică necesare pentru identificarea patogenului precum și pentru izolarea acestuia pe un mediu nutritiv.

Pentru studierea simptomelor de boală, pentru o examinare mai detaliată a caracterelor morfologice ale sporulației și pentru identificarea speciei s-a folosit stereomicroscopul iar pentru a observa conidioforii și conidiile ciupercii s-au efectuat preparate microscopice.

### **Izolarea ciupercii**

Izolarea și creșterea ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. s-a efectuat în plăci Petri pe mediu nutritiv agarizat, mediul de cultură folosit fiind mediul Cartof – Dextroză - Agar (PDA) a cărui rețetă a fost preluată după Constantinescu (1974).

Metoda culturilor în plăci Petri a fost folosită pentru izolarea ciupercii iar metoda de însămânțare a fost inocularea în punct central cu porțiuni de miceliu. Porțiuni de miceliu s-au trecut cu ajutorul unui ac de repicat, pe mediul de izolare PDA, afundându-se ușor.

După câteva zile s-au examinat creșterile din plăcile Petri, pentru a observa dacă coloniile sunt pure, în caz contrar acestea purificându-se trecând o mică porțiune din acea colonie pe o altă placă Petri cu mediu de cultură.

În experiențe s-au utilizat plăci Petri cu diametrul de 85 mm, în care, în condiții sterile s-a adăugat mediu de cultură. Pentru evitarea unei posibile impurificări cu bacterii s-a adăugat streptomycină în cantitate de 0,05 g/l.

### **Cultivarea izolatelor ciupercii pe medii nutritive**

După obținerea culturilor pure izolatele speciei *Botrytis cinerea* Pers. au fost însămânțate pe mediile de cultură: Cartof-Dextroză Agar (PDA), Czapek – Agar și Malț - Agar (MA).



### Examinarea caracterelor culturale

În experiențele efectuate examinarea macroscopică s-a realizat vizual, luându-se în considerare caracterele coloniilor fungice dezvoltate pe toate cele trei medii de cultură.

Caracterele culturale urmărite au fost: ritmul de creștere a coloniei ciupercii, forma coloniei, culoarea coloniei, aspectul coloniei, apariția sporulației, apariția scleroților, numărul și distribuția scleroților.

Observațiile cu privire la creșterea și dezvoltarea coloniilor speciei *Botrytis cinerea* Pers. pe cele trei medii de cultură s-au efectuat prin măsurarea zilnică a diametrului acestora până la ocuparea întregii plăci Petri., astfel putându-se stabili rata de creștere a coloniei fiecărui izolat.

Incubarea plăcilor a fost la temperatura de 25°C iar pentru o interpretare corectă a rezultatelor experiențele s-au realizat în trei repetiții.

Pentru aproximarea procentului de sporulare a fost elaborat un sistem de apreciere a acestuia, care a constatat în folosirea unui cerc cu diametrul de 85 mm căreia i s-a calculat suprafața (22686,50 mm<sup>2</sup>). Acesta a fost împărțit în 8 părți egale, cu suprafața de 2835,81 mm<sup>2</sup> care la rândul lor au fost separate fiecare în 10 segmente egale, cărora li s-a calculat suprafața în procente (1,25% pentru fiecare segment).

### Examinarea caracterelor morfologice

- ✓ forma, tipul și culoarea hifelor miceliene
- ✓ forma, culoarea și dimensiunile sporilor

Vizualizarea fructificațiilor ciupercii s-a realizat cu ajutorul microscopului optic, în urma examenului microscopic putându-se observa forma și culoarea sporilor iar cu ajutorul programului Motic Images au fost determinate dimensiunile acestora, prin măsurarea a 100 conidii din fiecare izolat. Pentru aceste date au fost întocmite șiruri de variație, datele obținute în urma măsurărilor fiind așezate în funcție de frecvența lor în intervale de clasă, pe centre de clasă stabilindu-se histogramele aferente cu ajutorul programului StatSoft Statistica 8.

## **3.3 MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE ÎN CONTROLUL CIUPERCII *BOTRYTIS CINEREA* PERS. CU TINCTURI**

### **3.3.1 Material biologic**

Materialul biologic folosit în realizarea experiențelor privind controlul cu extracte din plante a ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. a fost constituit din 11 izolate ale acestei specii prelevate de pe ardei, tomate, ardei iute, salată, zmeur, mur, căpșun, viță de vie, precum și extracte

hidroalcoolice din 9 specii de plante (tabelul 1) precum și extractul din propolis.

Pentru testarea eficacității extractelor din plante asupra fructelor depozitate infectate cu specia *Botrytis cinerea* Pers. s-au folosit opt extracte din cele 10 utilizate iar fructele asupra cărora s-au testat au fost boabe de strugure, tomate Cherry și fructe de căpșun.

Prepararea extractelor s-a realizat cu material vegetal uscat sau proaspăt și anume la extractele de *Aloe* sp. și *Tagetes* sp. s-a folosit herba proaspătă iar la extractele de *Satureja hortensis*, *Aristolochia clematitis* și *Helleborus purpurascens* s-au folosit herba uscată respectiv rizomi uscați. Tincturile de *Sambucus nigra* și *Allium sativum* au fost achiziționate gata preparate.

**Tabelul 1**

| Extractele din plante utilizate |                                |                         |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Nr.                             | Denumire științifică           | Familie                 |
| 1.                              | <i>Aloe arborescens</i>        | <i>Aloaceae</i>         |
| 2.                              | <i>Aloe paradisiacum</i>       | <i>Aloaceae</i>         |
| 3.                              | <i>Aloe marlothi</i>           | <i>Aloaceae</i>         |
| 4.                              | <i>Satureja hortensis</i>      | <i>Lamiaceae</i>        |
| 5.                              | <i>Helleborus purpurascens</i> | <i>Ranunculaceae</i>    |
| 6.                              | <i>Aristolochia clematitis</i> | <i>Aristolochiaceae</i> |
| 7.                              | <i>Sambucus nigra</i>          | <i>Caprifoliaceae</i>   |
| 8.                              | <i>Allium sativum</i>          | <i>Liliaceae</i>        |
| 9.                              | <i>Tagetes</i> sp.             | <i>Asteraceae</i>       |

### 3.3.2. Metode de cercetare

Metodologia de cercetare propusă pentru realizarea obiectivelor urmărite cuprinde următoarele etape:

- ✓ izolarea ciupercii
- ✓ prepararea extractelor din plante
- ✓ încorporarea extractelor în mediul de cultură
- ✓ inocularea izolatelor ciupercii *Botrytis cinerea* Pers, pe mediul PDA la care s-au adăugat extractele în diferite concentrații
- ✓ testarea efectului tratamentelor cu tincturi asupra ciupercii

#### Izolarea ciupercii

Izolarea și creșterea ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. s-a efectuat în plăci Petri pe mediu nutritiv agarizat, mediul de cultură folosit fiind mediul Cartof – Dextroză - Agar (PDA) iar în experiențe s-au utilizat plăci Petri cu diametrul de 80 mm.

### Prepararea extractelor hidroalcoolice

Extractele hidroalcoolice utilizate în experiențe s-au realizat după metodologia propusă de Elena Iancu și Pârvu (2007).

Pentru prepararea extractelor hidroalcoolice din plante materialul vegetal a fost spălat în apă după care a fost tăiat în porțiuni mici de 1-3 cm lungime și lăsat să se usuce la temperatura camerei. După uscare a fost mojarat până la obținerea unei pudre cât mai fine și ținute la rece până în momentul utilizării.

Pudrele obținute de la cele șase specii de plante a fost dizolvate în etanol 70% în proporție de 1:5 (plantă:alcool) după care au fost turnate în recipiente de sticlă, brune și agitate zilnic timp de 12 zile. După ce a trecut perioada de tincturare extractele din plante au fost decantate iar soluția hidroalcoolică rezultată a fost stocată în sticlule brune cu capac, etanș, însurubabil pentru a se evita evaporarea constituenților volatili ale acestora.

### Testarea efectului extractelor *in vitro*

Pentru testarea activității antifungice a extractelor din plante am folosit tehnica încorporării extractului în mediul de cultură (Pârvu, 1993). Toate extractele din plante au fost testate în trei concentrații (4 μg/ml, 6 μg/ml, 8 μg/ml). Extractele hidroalcoolice din plante în diferite concentrații au fost adăugate la mediul de cultură PDA la care a fost adăugat anterior streptomycină (0,05 g/l) pentru a inhiba dezvoltarea bacteriilor.

Diferitele substanțe în cele trei concentrații au fost testate pe plăci diferite pentru a evita interacțiunea dintre acestea iar capacul fiecărei plăci Petri a fost aplicat imediat după încorporarea și turnarea mediului în acestea pentru a preveni evaporarea și interacțiunea dintre extracte și au fost sigilate cu folie de plastic.

După solidificarea mediului de cultură cu extract s-a realizat inocularea patogenului prin amplasarea de porțiuni de miceliu de 1 mm în diametru în centrul plăcii Petri folosind un ac de înșămânțat sterilizat în prealabil. Plăcile Petri astfel inoculate au fost apoi incubate la temperatura de 25°C timp de 9 zile. Varianta martor a fost reprezentată de plăcile Petri fără extract. Experimentele au fost efectuate în trei repetiții.

Pentru a observa efectul antifungic al extractelor folosite, coloniile dezvoltate pe plăcile Petri au fost măsurate la intervale de timp de 1, 3, 6, 9 zile prin prelevarea a patru diametre ale coloniei și calcularea ariei coloniilor dezvoltate atât pe mediul cu extract cât și pe varianta

martor. Pentru calcularea mai exactă a suprafeței coloniilor, diametrele au fost măsurate două câte două perpendicular și s-a calculat astfel media între el.

Calcularea suprafeței coloniilor dezvoltate s-a realizat după stabilirea celor două diametre medii, cu ajutorul cărora s-a putut stabili aria elipsei, calculată după formula matematică:

$$A = \pi ab$$

Procentul de inhibare a dezvoltării miceliului a fost calculat după formula:

$$\text{Procentul de inhibare} = (C-T/C) \times 100$$

unde C reprezintă diametrul coloniei martor și T reprezintă diametrul coloniei crescute pe mediul tratat după metodologia utilizată de Pârvu (1993) cu specificarea că în locul diametrelor coloniilor am calculat suprafața acestora pe care am aplicat-o în formulă.

Toate datele prelevate au fost interpretate statistic cu ajutorul programului Polifact (testul ANOVA și testul Duncan).

Testarea efectului extractelor

Pentru testarea eficacității tincturilor asupra apariției și dezvoltării putregaiului cenușiu pe fructe depozitate s-a înființat 3 experiențe în laborator care au presupus sterilizarea fructelor utilizate, inocularea patogenului și aplicarea extractelor.

În experiența realizată pe boabe de strugure s-au folosit boabe de aproximativ aceeași dimensiune, sănătoase fără simptome evidente de putregai cenușiu. Boabele au fost înlăturate de pe ciorchine și au fost supuse unui tratament de sterilizare care a constatat în înmuierea acestora timp de 30 secunde în permanganat de potasiu în concentrație de 1<sup>o</sup>/<sub>oo</sub> și apoi sterilizarea la suprafață cu etanol 70%. Același protocol de sterilizare s-a folosit și în cazul fructelor de tomate și căpșun.

După sterilizare fructele au fost amplasate în recipiente de plastic sterilizate cu alcool etilic. Inocularea ciupercii pe fructe s-a realizat prin rănirea fructelor cu un ac de însămânțat sterilizat în prealabil și amplasarea de porțiuni de miceliu fructificat pe zonele rănite.

Efectul fungistatic constă în proprietatea anumitor substanțe de a inhiba dezvoltarea ciupercilor patogene iar efectul fungicid este acea proprietate a anumitor substanțe de a ucide fungii patogeni (Archbold et al., 1997).

Extractele hidroalcoolice (tincturile mamă) au fost aplicate prin pulverizare după care recipientele au fost închise etanș pentru a evita

evaporarea tincturilor iar observarea simptomelor s-a efectuat la intervale de trei zile timp de nouă zile.

#### CAPITOLUL IV

### REZULTATE EXPERIMENTALE PRIVIND BIOLOGIA CIUPERCII *BORYTIS CINEREA PERS.*

#### 4.1 BIOLOGIA CIUPERCII *BOTRYTIS CINEREA PERS.* IZOLATĂ DE PE MUȘCATE

##### 4.1.1 Dezvoltarea coloniei

Pentru observarea caracterelor morfologice și culturale ale ciupercii *Botrytis cinerea* Pers., izolate de pe mușcate s-a folosit ca material vegetal miceliul ciupercii izolat de pe următoarele varietăți de mușcată izolatul Cambi, Angeleyes Orange, Camdared, Campeye, Rainbow White, Balcon Imperial, Ville de Paris Lila.

În tabelul 4.1 se prezintă suprafețele coloniilor obținute pe mediul PDA la cele 7 izolate luat în studiu deoarece în urma cercetărilor efectuate acest mediu de cultură a fost cel mai potrivit pentru creșterea și dezvoltarea coloniilor acestor izolate. Analizând datele din tabelul 4.1 se pot distinge diferențe de suprafață între izolate la nivelul unei zile dar și diferențe în creșterea coloniei la același izolat în zile diferite, excepție făcând primele două zile și ziua a șasea, în care diferențele nu sunt asigurate statistic. Astfel, cu privire la suprafața coloniilor izolatelor de *Botrytis cinerea* Pers., pe mediul PDA putem observa că valorile acestea se încadrează între 21,20 mm<sup>2</sup> (izolatul Cambi) și 93,68 mm<sup>2</sup> (izolatul Rainbow White) în prima zi după inoculare, cu diferențe neasigurate statistic față de martor.

În a treia și a patra zi de la inoculare se evidențiază izolatele Angeleyes Orange și Campeye cu diferențe foarte semnificativ negative față de martor. O creștere a suprafețelor coloniilor ciupercii, se remarcă în cazul izolatelor Rainbow White și Ville de Paris Lila unde diferențele față de martor au fost foarte semnificativ pozitive.

Valorile suprafețelor înregistrate în ziua cinci, din punct de vedere statistic, au înregistrat diferențe semnificativ negative la izolatul Campeye precum și diferențe distinct semnificativ negative la izolatul Angeleyes Orange.

În urma analizei datelor din tabelul 2 putem afirma ca o concluzie generală faptul că izolatele Campeye și Angeleyes Orange au avut o creștere lentă și uniformă pe parcursul observațiilor efectuate pe când

izolatele Rainbow White și Ville de Paris Lila au avut o creștere explozivă în a treia și a patra zi, când suprafața lor a fost de 22686,50 mm<sup>2</sup>.

**Tabelul 2**

**Dezvoltarea coloniilor pe mediul de cultură PDA**

| Izolatul            | Ziua 1    |                  |                          |                         | Ziua 2    |                  |                          |                         |
|---------------------|-----------|------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|------------------|--------------------------|-------------------------|
|                     | Suprafața | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței | Suprafața | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței |
| Media               | 55,40     | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 1736,42   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
| Cambi               | 21,20     | 38,26            | -34,12                   | -                       | 1671,53   | 96,26            | -64,89                   | -                       |
| Angeleyes Orange    | 66,46     | 120,0            | 11,06                    | -                       | 778,72    | 44,8             | -957,70                  | -                       |
| Camdared            | 51,81     | 93,5             | -3,59                    | -                       | 1329,27   | 76,6             | -407,15                  | -                       |
| Campeye             | 38,20     | 69,0             | -17,20                   | -                       | 785,79    | 45,3             | -950,63                  | -                       |
| Rainbow white       | 93,68     | 169,1            | 38,28                    | -                       | 2478,51   | 142,7            | 742,09                   | -                       |
| Balcon Imperial     | 56,52     | 102,0            | 1,12                     | -                       | 1799,22   | 103,6            | 62,80                    | -                       |
| Ville de Paris Lila | 59,93     | 108,2            | 4,53                     | -                       | 3311,92   | 190,7            | 1575,50                  | -                       |
| Ziua 3              |           |                  |                          |                         | Ziua 4    |                  |                          |                         |
| Media               | 12129,67  | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 17967,94  | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
| Cambi               | 9995,14   | 82,40            | -2134,53                 | -                       | 18858,06  | 104,95           | 890,12                   | -                       |
| Angeleyes Orange    | 6340,71   | 52,3             | -5788,97                 | 000                     | 12712,03  | 70,7             | -5255,91                 | 000                     |
| Camdared            | 10929,82  | 90,1             | -1199,86                 | -                       | 17664,86  | 98,3             | -303,08                  | -                       |
| Campeye             | 5192,25   | 42,8             | -6937,42                 | 000                     | 12822,98  | 71,4             | -5144,97                 | 000                     |
| Rainbow white       | 21090,33  | 173,9            | 8960,66                  | ***                     | 22686,50  | 126,3            | 4718,56                  | ***                     |
| Balcon Imperial     | 14042,60  | 115,8            | 1912,93                  | -                       | 18344,67  | 102,1            | 376,72                   | -                       |
| Ville de Paris Lila | 17316,84  | 142,8            | 5187,17                  | ***                     | 22686,50  | 126,3            | 4718,56                  | ***                     |
| Ziua 5              |           |                  |                          |                         | Ziua 6    |                  |                          |                         |
| Media               | 21029,9   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22686,5   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
| Cambi               | 22421,9   | 106,6            | 1392,00                  | -                       | 22686,50  | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Angeleyes Orange    | 17515,7   | 83,3             | -3514,26                 | 00                      | 22686,5   | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Camdared            | 20834,1   | 99,1             | -195,80                  | -                       | 22686,5   | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Campeye             | 18378,4   | 87,4             | -2651,55                 | 0                       | 22686,5   | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Rainbow white       | 22686,5   | 107,9            | 1656,54                  | -                       | 22686,5   | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Balcon Imperial     | 22686,5   | 107,9            | 1656,54                  | -                       | 22686,5   | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Ville de Paris Lila | 22686,50  | 107,9            | 1656,54                  | -                       | 22686,50  | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| DL (p 5%)           |           |                  | 2643,73                  |                         |           |                  |                          |                         |
| DL (p 1%)           |           |                  | 3514,18                  |                         |           |                  |                          |                         |
| DL (p 0.1%)         |           |                  | 4574,37                  |                         |           |                  |                          |                         |

#### 4.1.2 Conidii

Procentele de sporulare a izolatelor ne arată că izolatul Rainbow White a sporulat cel mai repede pe toate mediile de cultură, înregistrând

un procent de sporulare de 7,5 %, 10,42 % respectiv 10,63 % la șase zile după inoculare.

Pe mediul MA, în ziua a șasea, au sporulat și izolatele Camdared și Campeye, procentele înregistrate de acestea fiind de 15% respectiv 24,58 %. În ziua a doisprezecea, toate izolatele au sporulat, pe toate cele trei medii de cultură, dar pe mediul Czapek - agar a fost înregistrat cel mai mare număr de izolate care au atins procentul de 100% al sporulării (izolatele Cambi, Camdared, Rainbow White și Ville de Paris Lila).

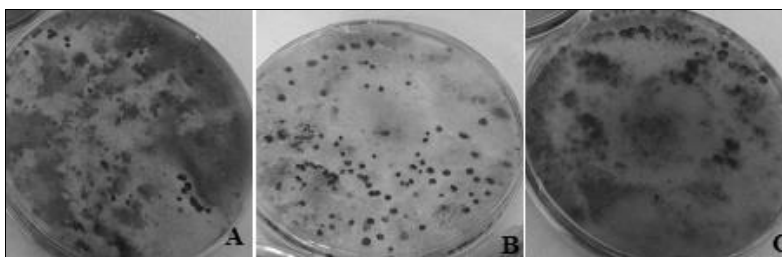
După 30 de zile aceleași observații asupra caracterelor culturale au fost efectuate pentru a urmări evoluția coloniilor și de a identifica eventualele diferențe în dezvoltarea patogenului.

Conidiile au fost solitare, hialine sau maro deschis care în masă au culoarea cenușie, devenind mai închise la culoare pe măsură ce se maturează. Formele sporilor observate în câmpurile microscopice au fost elipsoidale și globoase. Acestea au fost netede, adesea cu un hil protuberant și unicele.

#### **4.1.3 Scleroți**

La mușcată numai unele izolate au format scleroți. Modelele de distribuție ale scleroților formați au fost: în cercuri concentrice, pe marginea plăcii sau neregulat iar aceștia au fost bine fixați pe suprafața mediului de cultură. Au fost observate variații de culoare, formă și mărime; organele de rezistență formate au fost negre, maro deschis sau de culoare albă la început devenind negre pe măsură ce s-au maturat.

După o perioadă de 30 de zile de la inoculare, numărul de izolate care au format scleroți a fost de trei izolate pe mediul PDA, patru izolate pe mediul Czapek- agar și două izolate pe mediul MA iar modele de distribuție ale scleroților formați pe plăci au fost: în cercuri concentrice, pe marginea plăcii sau neregulat (figura 1).



**Figura 1 Scleroții formați pe mediul PDA  
(A - Rainbow White, B - Balcon imperial, C - Ville de Paris Lila)**

## 4.2 BIOLOGIA CIUPERCII *BOTRYTIS CINEREA* PERS. IZOLATĂ DE PE VIȚA DE VIE

### 4.2.1 Dezvoltarea coloniei

Tabelul 3

Suprafața coloniilor pe mediile de cultură

| Izolatul        | Mediul de cultură | Ziua 1   |                  |                          |                         | Ziua 2   |                  |                          |                         |
|-----------------|-------------------|----------|------------------|--------------------------|-------------------------|----------|------------------|--------------------------|-------------------------|
|                 |                   | Supraf.  | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței | Supraf.  | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței |
| Chasselas       | M1                | 875,54   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 3886,54  | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 261,67   | 29,9             | -613,87                  | -                       | 1097,43  | 28,2             | -2789,11                 | -                       |
|                 | M3                | 738,43   | 84,3             | -137,11                  | -                       | 3332,06  | 85,7             | -554,47                  | -                       |
| Isabela         | M1                | 342,52   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 2378,81  | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 372,61   | 108,8            | 30,09                    | -                       | 1523,95  | 64,1             | -854,87                  | -                       |
|                 | M3                | 664,11   | 193,9            | 321,59                   | -                       | 3019,63  | 126,9            | 640,82                   | -                       |
| Sauvignon blanc | M1                | 335,20   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 2456,27  | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 408,20   | 121,8            | 73,00                    | -                       | 631,66   | 25,7             | -1824,60                 | -                       |
|                 | M3                | 408,20   | 121,8            | 73,00                    | -                       | 2469,87  | 100,6            | 13,61                    | -                       |
| Muscot ottonel  | M1                | 616,49   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 3053,65  | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 379,68   | 61,6             | -236,81                  | -                       | 1394,42  | 45,7             | -1659,23                 | -                       |
|                 | M3                | 762,76   | 123,7            | 146,27                   | -                       | 3385,45  | 110,9            | 331,80                   | -                       |
| Ziua 3          |                   |          |                  |                          | Ziua 4                  |          |                  |                          |                         |
| Chasselas       | M1                | 13156,08 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22421,96 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 7261,77  | 55,2             | -5894,31                 | 00                      | 16808,10 | 75,0             | -5613,86                 | 00                      |
|                 | M3                | 11142,55 | 84,7             | -2013,53                 | -                       | 17751,73 | 79,2             | -4670,22                 | 00                      |
| Isabela         | M1                | 10150,57 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 17876,54 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 5473,02  | 53,9             | -4677,55                 | 00                      | 10073,38 | 56,3             | -7803,16                 | 000                     |
|                 | M3                | 9350,92  | 92,1             | -799,65                  | -                       | 15108,37 | 84,5             | -2768,17                 | -                       |
| Sauvignon blanc | M1                | 10008,49 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 20681,09 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 5732,33  | 57,3             | -4276,16                 | 00                      | 13061,09 | 63,2             | -7619,99                 | 000                     |
|                 | M3                | 9902,51  | 98,9             | -105,98                  | -                       | 14809,03 | 71,6             | -5872,06                 | 00                      |
| Muscot ottonel  | M1                | 12416,09 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22334,56 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 6798,62  | 54,8             | -5617,46                 | 00                      | 14479,59 | 64,8             | -7854,98                 | 000                     |
|                 | M3                | 10978,49 | 88,4             | -1437,60                 | -                       | 16357,06 | 73,2             | -5977,50                 | 00                      |
| Ziua 5/Day 5    |                   |          |                  |                          | Ziua 6/Day 6            |          |                  |                          |                         |
| Chasselas       | M1                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
|                 | M3                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Isabela         | M1                | 20289,63 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 17818,45 | 87,8             | -2471,18                 | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
|                 | M3                | 21991,51 | 108,4            | 1701,88                  | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Sauvignon blanc | M1                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 20613,05 | 90,9             | -2073,45                 | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
|                 | M3                | 19060,59 | 84,0             | -3625,91                 | 0                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| Muscot ottonel  | M1                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     |
|                 | M2                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
|                 | M3                | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       | 22686,50 | 100,0            | 0,00                     | -                       |
| DL (p 5%)       |                   | 2584,01  |                  |                          |                         |          |                  |                          |                         |
| DL (p 1%)       |                   | 3451,92  |                  |                          |                         |          |                  |                          |                         |
| DL (p 0,1%)     |                   | 4544,16  |                  |                          |                         |          |                  |                          |                         |

M1 – PDA, M2 – Czapek – agar, M3 – MA

Influența mediilor de cultură asupra dezvoltării patogenului este redată în tabelul 3 din care rezultă că cel mai favorabil mediu a fost mediul



nutritiv PDA, urmat de MA, pe care izolatele nu au înregistrat diferențe asigurate statistic față de martor și de mediul Czapek - agar pe care în a treia zi de la inoculare toate izolatele au înregistrat valori asigurate statistic prin diferențe distinct semnificativ negative față de martor.

#### 4.2.2 Conidii

Din tabelul 4 se poate observa că procentul sporulării la nivelul coloniilor, pe mediul PDA, în a noua zi de la inoculare în cazul izolatului Sauvignon a fost de 78,33% și în a 12-a zi în cazul izolatului Muscat ottonel de 100% pe când izolatele Chasselas și Isabela nu au format spori pe acest mediu de cultură.

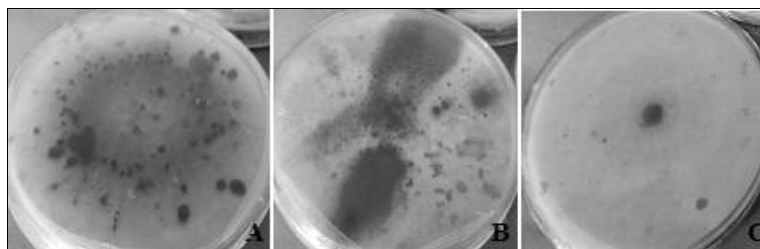
**Tabelul 4**

**Procentul sporulării pe mediile de cultură**

| Mediul de cultură | Izolatul        | Ziua a 3-a | Ziua a 6-a | Ziua a 9-a | Ziua a 12-a | Ziua a 30-a |
|-------------------|-----------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| PDA               | Chasselas       | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        |
|                   | Isabela         | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        |
|                   | Sauvignon blanc | 0,00       | 0,00       | 78,33      | 91,66       | 0,00        |
|                   | Muscat ottonel  | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 100,00      | 0,00        |
| Czapek - agar     | Chasselas       | 0,00       | 0,00       | 60,83      | 90,83       | 3,75        |
|                   | Isabela         | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        |
|                   | Sauvignon blanc | 0,00       | 0,00       | 97,50      | 100,00      | 100,00      |
|                   | Muscat ottonel  | 0,00       | 0,00       | 8,33       | 100,00      | 71,25       |
| MA                | Chasselas       | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 100,00      |
|                   | Isabela         | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00        | 0,00        |
|                   | Sauvignon blanc | 0,00       | 0,00       | 70,00      | 100,00      | 0,00        |
|                   | Muscat ottonel  | 0,00       | 0,00       | 80,00      | 80,00       | 100,00      |

Cele mai mari valori ale conidiilor s-au înregistrat pe mediul Czapek – agar; cele mai mari dimensiuni s-au observat în cazul izolatului Sauvignon blanc (11,26  $\mu\text{m}$  - 8,75  $\mu\text{m}$ ) iar cele mai mici în cazul izolatului cu valorile cuprinse între 9,79  $\mu\text{m}$  - 11,26  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3 Scleroți



**Figura 2 Scleroții formați pe mediul PDA  
(A - Chasselass, B - Sauvignon blanc, C - Muscat ottonel)**

Referitor la prezența, numărul și distribuția organelor de rezistență la nivelul plăcilor Petri cu cele trei medii de cultură se poate

afirma faptul că la o perioadă de 30 de zile de la inocularea izolatelor cu excepția izolatului Isabela (pe toate mediile de cultură) și a izolatului Chasselas (pe Czapek – agar și MA) toate celelalte au format scleroți. Modelele de distribuție a scleroților au fost neregulat sau concentric (figura 2).

### **4.3 BIOLOGIA CIUPERCII *BOTRYTIS CINEREA* PERS. IZOLATĂ DE PE ALTE PLANTE GAZDĂ**

#### **4.3.1 Dezvoltarea coloniei**

Influența mediului de cultură asupra suprafeței coloniilor a fost determinată prin analizarea măsurătorilor efectuate coloniilor fiecărui izolat, obținute pe fiecare mediu de cultură în parte. Din datele prelevate s-a putut observa faptul că dezvoltarea coloniilor este mai bună pe mediul de cultură PDA drept pentru care în studiul influenței substratului nutritiv asupra dezvoltării ciupercii varianta cu acest mediu a fost considerată varianta martor. Aceste date vin să susțină afirmațiile din literatura de specialitate referitoare la faptul că mediul de cultură PDA este cel mai potrivit mediu pentru dezvoltarea și sporularea patogenului *Botrytis cinerea* Pers.

#### **4.3.2 Conidii**

După cum se poate observa din tabelul 4.30, pe mediul PDA, în ziua a treia un singur izolat (I11 - petunia) a sporulat acesta înregistrând un procent de 28%, pe când în ziua a șasea nouă dintre izolate au format fructificații, procentele încadrându-se între 2,92% la izolatul de la vinete și 60% la izolatul de la petunia. În ziua a doisprezecea 15 dintre izolate au sporulat pe mediul PDA cu precizarea că trei dintre acestea au atins procentul de 100%, și anume izolatele de la salată, vinete și petunia.

Referitor la momentul apariției sporilor putem remarca faptul că izolatul de la petunia a sporulat cel mai repede, acesta fructificând pe mediile PDA și MA încă din ziua a treia.

În cazul mediului Czapek - agar, sporularea a apărut doar în ziua a șasea și doar la două dintre izolate, la izolatul de la mușcată cu un procent de 3,75% și la izolatul de la petunia unde procentul înregistrat a fost de 14,58%. În ziua a 12-a, putem afirma că doar două dintre izolate nu au sporulat iar numărul de izolate cu sporulare de 100% este de patru (salată, tomate, ardei iute, mușcată), izolatul de pe petunia remarcându-se cu o sporulare de 95%.

Pe mediul MA ca și în cazul mediului PDA izolatul de la petunia se remarcă printr-o sporulare rapidă, înregistrând un procent de 27,92% ajungând în ziua a 12-a la o sporulare de aproximativ 92,08%. Procentul maxim în cazul acestui mediu de cultură a fost atins de un singur izolat și anume cel de la fucsia pe când izolatele de la mur și dalia au înregistrat cele mai scăzute procente de 0,67% respectiv 1,25%.

#### 4.3.3 Scleroți

În urma experiențelor efectuate prezența organelor de rezistență ale ciupercii au variat atât în ceea ce privește numărul lor dar și modelul de distribuție a acestora la nivelul coloniilor formate pe cele trei medii de cultură. De asemenea diferă și momentul apariției acestor scleroți pe plăcile Petri.

Astfel, pe mediile PDA și MA scleroții au fost formați începând cu ziua a noua iar pe mediul Czapek – agar doar în ziua a doisprezecea, când au fost observați la patru din cele 16 izolate: vinete, dalia, tisa și mur. Pe acest mediu de cultură, la nivelul coloniei formate de izolatul de pe tisa, s-a înregistrat cel mai mare număr mediu de scleroți, acesta fiind de 102,5.

Analizând apariția scleroților la fiecare izolat în parte, putem constata faptul că doar două izolate, cel de pe dalia și cel de pe tisa au format organele de rezistență pe toate cele trei medii de cultură utilizate. Pe mediul PDA, în ziua 12 numărul de scleroți a variat de la valoarea de 6,5 în cazul izolatului de la *impatiens* la valoarea medie de 54 la izolatul de pe trandafir japonez.

### CAPITOLUL V

#### REZULTATE EXPERIMENTALE PRIVIND EFICACITATEA UNOR TINCTURI ÎN CONTROLUL CIUPERCII *BOTRYTIS CINEREA* PERS.

Experiențele privind eficacitatea unor extracte hidroalcoolice aplicate *in vitro* pentru controlul patogenului *Botrytis cinerea* Pers. s-au efectuat asupra a 11 izolate ale ciupercii, izolate de pe următoarele plante gazdă: ardei, tomate, salată, ardei iute, zmeur, mur, căpșun, viță de vie (patru soiuri).

Variantele experimentale au fost reprezentate de tincturile de *Aloe paradisiacum*, *Aloe marlothi*, *Aloe arborescens*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis, aplicate în trei concentrații (4%, 6%, 8%) iar varianta martor a constat în mediul de cultură fără extract. Astfel, pentru controlul putregaiului cenușiu *in vitro*, cu ajutorul extractelor

hidroalcoolică a fost realizată o experiență cu 10 variante de tratament la care s-a adăugat varianta martor netratată.

În continuare se vor prezenta rezultatele, înregistrate și prelucrate statistic, cu referire la efectul extractelor asupra creșterii coloniilor ciupercii, procentul de inhibare al dezvoltării coloniilor pe mediul cu extract, precum și influența concentrațiilor produselor aplicate asupra patogenului.

Pentru o mai bună interpretare a rezultatelor obținute, pe lângă testarea semnificației diferențelor cu ajutorul diferențelor limită (DL) s-a folosit și testul Duncan.

## **5.1 EFICACITATEA EXTRACTELOR *IN VITRO***

### **5.1.1 Izolate *Solanaceae***

Pentru exemplificare vă prezentăm efectul extractelor din plante asupra izolatului de ardei iar eficiența extractelor testate asupra tuturor izolatelor poate fi evidențiată la capitolul de Concluzii și recomandări.

Efectul inhibitor al tincturilor aplicate asupra izolatului de ardei se poate observa din primele zile de tratament, în care toate tincturile, în toate cele trei concentrații au manifestat efect inhibitor asupra dezvoltării coloniilor de *Botrytis cinerea* Pers.

La sfârșitul perioadei experimentale (9 zile de la aplicarea extractelor) eficacitatea tratamentelor aplicate pentru controlul ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. este prezentată în tabelul 5, de unde observăm că efectul inhibitor se menține la majoritatea tincturilor cu excepția celor de *Sambucus nigra* și *Allium sativum*, la care, la cea mai mică concentrație - 4% - coloniile dezvoltate au avut dimensiuni apropiate de cele ale martorului netratat (diferențele fiind nesemnificative).

În figurile 3-5 este prezentată evoluția gradului de inhibare al dezvoltării miceliului ciupercii la cele trei concentrații ale tincturilor aplicate, calculat ca și procent de inhibare, din ziua întâi până în ziua a noua.

După cum observăm din figura 3, la concentrația de 4% procentul de inhibare de 100% este realizat de tinctura de propolis iar cel mai mic grad de inhibare s-a obținut în cazul extractelor de *Sambucus nigra*, *Allium sativum*, *Aloe marlothii*. Această diferență între tincturi se păstrează pe parcursul celor nouă zile, validându-se în final tinctura de propolis cu 100% grad de inhibare și cea de *Tagetes* sp. cu un procent de inhibare de peste 99%.

Tabelul 5

## Efectul tincturilor asupra dezvoltării coloniei - ziua 9

| Varianta                       | Concentrația | Suprafața (mm²) | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței | Testul Duncan |
|--------------------------------|--------------|-----------------|------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Netratat                       | -            | 20096,00        | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | E             |
| <i>Aloe arborescens</i>        | 4            | 1036,46         | 5,2              | -19059,54                | 000                     | AB            |
|                                | 6            | 103,62          | 0,5              | -19992,38                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| <i>Aloe marlothi</i>           | 4            | 15584,67        | 77,6             | -4511,33                 | 00                      | D             |
|                                | 6            | 153,86          | 0,8              | -19942,14                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| <i>Aloe paradisiacum</i>       | 4            | 2764,51         | 13,8             | -17331,49                | 000                     | AB            |
|                                | 6            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| <i>Satureja hortensis</i>      | 4            | 2828,10         | 14,1             | -17267,90                | 000                     | AB            |
|                                | 6            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| <i>Helleborus purpurascens</i> | 4            | 425,21          | 2,1              | -19670,79                | 000                     | A             |
|                                | 6            | 20,15           | 0,1              | -20075,85                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| <i>Aristolochia clematidis</i> | 4            | 2882,52         | 14,3             | -17213,48                | 000                     | AB            |
|                                | 6            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| <i>Sambucus nigra</i>          | 4            | 20096,00        | 100,0            | 0,00                     | -                       | A             |
|                                | 6            | 9897,02         | 49,2             | -10198,98                | 000                     | C             |
|                                | 8            | 1651,12         | 8,2              | -18444,88                | 000                     | AB            |
| <i>Allium sativum</i>          | 4            | 20096,00        | 100,0            | 0,00                     | -                       | A             |
|                                | 6            | 13635,97        | 67,9             | -6460,03                 | 000                     | D             |
|                                | 8            | 4013,97         | 20,0             | -16082,03                | 000                     | B             |
| <i>Tagetes</i> sp.             | 4            | 181,60          | 0,9              | -19914,40                | 000                     | A             |
|                                | 6            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| Propolis                       | 4            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
|                                | 6            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
|                                | 8            | 0,01            | 0,0              | -20095,99                | 000                     | A             |
| DL (p 5%)                      |              |                 |                  | 2822,57                  | DS 2828,13              |               |
| DL (p 1%)                      |              |                 |                  | 3756,82                  |                         |               |
| DL (p 0,1%)                    |              |                 |                  | 4872,25                  |                         |               |

La concentrația de 6% - figura 4 - extractele de *Aloe paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Aristolochia clematidis*, *Tagetes* sp. și propolis au avut un grad maxim de inhibare al dezvoltării ciupercii pe când extractele de *Sambucus nigra* și *Allium sativum* au înregistrat procente de 50,75% respectiv 32,15% la sfârșitul perioadei experimentale.

La concentrația de 8% (figura 5) majoritatea extractelor au avut procente de 100% al inhibării dezvoltării miceliului acestui izolat cu excepția extractelor de *Sambucus nigra* și *Allium sativum* (figura 6) care au avut cel mai slab efect fungistatic la această concentrație.

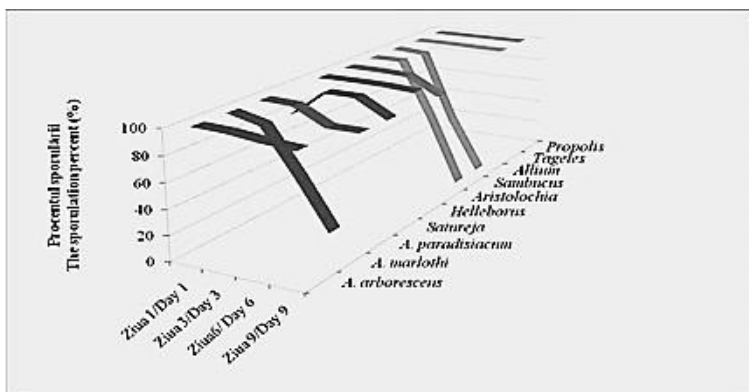


Figura 3 Gradul de inhibare al dezvoltării coloniei – concentrația 4%

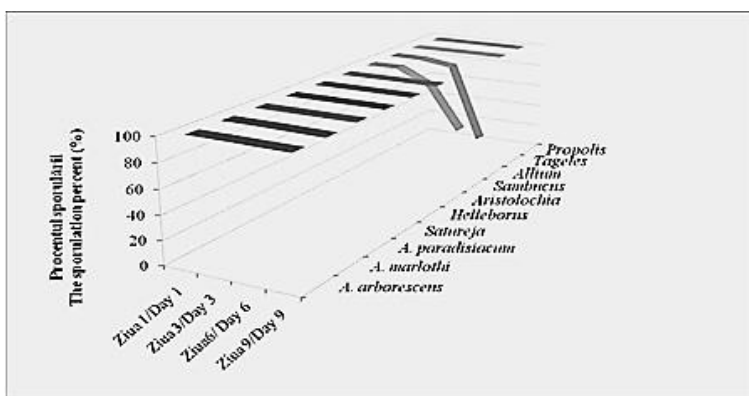


Figura 4 Gradul de inhibare al dezvoltării coloniei – concentrația de 6%

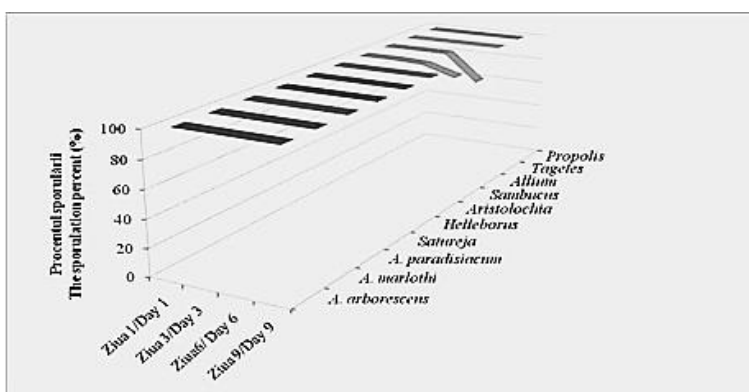
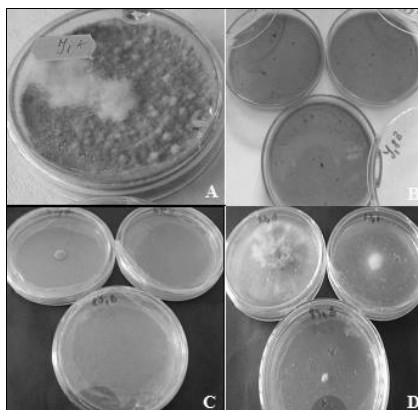


Figura 5 Gradul de inhibare al dezvoltării coloniei – concentrația de 8%

### 5.2.1 Testarea efectului antifungic pe boabe de strugure

Efectul inhibitor al tincturilor aplicate asupra boabelor de strugure infectate artificial cu izolatul prelevat de pe soiul Muscat ottonel se poate observa analizând datele din tabelul 6.



**Figura 6 Eficacitatea tratamentelor cu tincturi asupra izolatului de ardei (A - marmor/control, B - propolis, C - *Tagetes* sp., D - *Allium sativum*)**

La sfârșitul perioadei experimentale (9 zile de la aplicarea extractelor) eficacitatea tratamentelor aplicate pentru controlul ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. este prezentată în tabelul 6, unde observăm că efectul inhibitor general se menține la toate tincturile (diferențele fiind foarte semnificativ negative).

**Tabelul 6**

#### **Efectul tincturilor asupra dezvoltării coloniei - ziua 9**

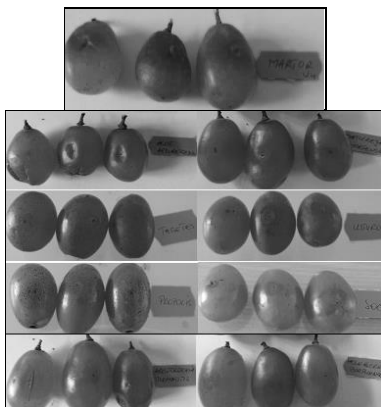
| Varianta                       | Suprafața | % față de marmor | Diferența față de marmor | Semnificația diferenței | Testul Duncan |
|--------------------------------|-----------|------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Netratat                       | 3219,81   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | C             |
| <i>Aloe arborescens</i>        | 137,90    | 4,3              | -3081,91                 | 000                     | A             |
| <i>Satureja hortensis</i>      | 211,43    | 6,6              | -3008,38                 | 000                     | A             |
| <i>Helleborus purpurascens</i> | 884,96    | 27,5             | -2334,85                 | 000                     | B             |
| <i>Aristolochia clematitis</i> | 77,45     | 2,4              | -3142,36                 | 000                     | A             |
| <i>Sambucus nigra</i>          | 209,33    | 6,5              | -3010,48                 | 000                     | A             |
| <i>Allium sativum</i>          | 45,53     | 1,4              | -3174,28                 | 000                     | A             |
| <i>Tagetes</i> sp.             | 97,34     | 3,0              | -3122,47                 | 000                     | A             |
| Propolis                       | 93,68     | 2,9              | -3126,13                 | 000                     | A             |
| DL (p 5%)                      |           |                  | 457,97                   |                         | DS 336,08     |
| DL (p 1%)                      |           |                  | 624,36                   |                         |               |
| DL (p 0,1%)                    |           |                  | 846,50                   |                         |               |

Extractele hidroalcoolice care au înregistrat cel mai puternic efect inhibitor sunt evidențiate în tabelul 6, unde se poate observa faptul că extractele de *Aristolochia clematitis* și *Allium sativum* au fost cele mai

eficiente, suprafețele afectate având dimensiuni de 77,45 mm<sup>2</sup> respectiv 45,53 mm<sup>2</sup>. Deasemenea extractele de *Tagetes* și propolis au avut un grad mare de inhibare, suprafețele afectate fiind de aproximativ 90 de mm<sup>2</sup>. Aceste rezultate sunt susținute și de imaginile din figura 7.

În urma analizei testului Duncan se remarcă faptul că tinctura de *Helleborus purpurascens* a înregistrat cel mai slab efect - cea mai mare suprafață afectată (884,96 mm<sup>2</sup>) - urmată fiind de *Sambucus nigra*, *Satureja hortensis* și *Aloe arborescens*.

Tratamentele aplicate boabelor inoculate cu miceliu de *Botrytis cinerea* Pers, izolat de pe soiul Sauvignon blanc, din primele zile de la aplicare nu au înregistrat diferențe semnificative comparativ cu martorul netratat.

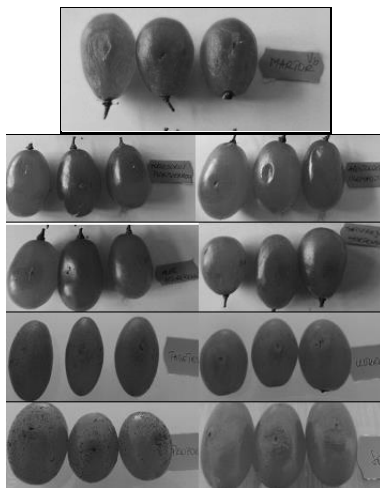


**Figura 7 Testarea efectului inhibitor al tincturilor împotriva izolatului Muscat ottonel**

La sfârșitul perioadei de observații eficacitatea tratamentelor aplicate pentru controlul ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. (tabelul 7) este foarte ridicată la toate tincturile testate, diferențe foarte semnificativ negative, dar testul Duncan ne arată faptul că cel mai ridicat efect antifungic l-au avut tincturile *Aloe arborescens*, *Satureja hortensis*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp. Aceste date sunt susținute și de imaginile din figura 8.

Cel mai bun efect de inhibare a dezvoltării coloniilor – la nouă zile, (tabelul 7) l-au avut extractele de *Allium sativum* și *Tagetes* sp. – dimensiunile zonelor afectate au fost de 98,39 mm<sup>2</sup> respectiv 136,07 mm<sup>2</sup>. La polul opus cel mai bun efect antifungic l-au înregistrat tincturile de *Aristolochia clematitis* și *Helleborus purpurascens* - 2114,79 mm<sup>2</sup> respectiv 796,36 mm<sup>2</sup>.





**Figura 8 Testarea efectului inhibitor al tincturilor împotriva izolatului Sauvignon blanc**

**Tabelul 7**

**Efectul tincturilor asupra dezvoltării coloniei - ziua 9**

| Varianta                       | Suprafața | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței | Testul Duncan |
|--------------------------------|-----------|------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Netratat                       | 4193,21   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | E             |
| <i>Aloe arborescens</i>        | 226,60    | 5,4              | -3966,61                 | 000                     | A             |
| <i>Satureja hortensis</i>      | 295,42    | 7,0              | -3897,79                 | 000                     | A             |
| <i>Helleborus purpurascens</i> | 796,36    | 19,0             | -3396,85                 | 000                     | BC            |
| <i>Aristolochia clematitis</i> | 2114,79   | 50,4             | -2078,42                 | 000                     | D             |
| <i>Sambucus nigra</i>          | 472,05    | 11,3             | -3721,16                 | 000                     | AB            |
| <i>Allium sativum</i>          | 98,39     | 2,3              | -4094,82                 | 000                     | A             |
| <i>Tagetes</i> sp.             | 136,07    | 3,2              | -4057,14                 | 000                     | A             |
| Propolis                       | 259,05    | 6,2              | -3934,16                 | 000                     | A             |
| DL (p 5%)                      |           |                  |                          | 476,85                  | DS 416,74     |
| DL (p 1%)                      |           |                  |                          | 647,38                  |               |
| DL (p 0,1%)                    |           |                  |                          | 872,09                  |               |

### 5.2.2 Testarea efectului antifungic pe tomate

Eficacitatea tratamentelor aplicate asupra fructelor de tomate este prezentată în tabelul 8 care arată faptul că la nouă zile de la aplicarea tratamentelor nu există diferențe asigurate statistic față de martorul netratat. Analizând datele din tabelul 8 se poate observa că variantele de tratament nu pot fi diferențiate dar observând suprafețele zonelor afectate de putregai putem afirma faptul că tinctura de *Tagetes* sp. este singura tinctură care nu a permis dezvoltarea ciupercii.

La nouă zile de tratament efectul total de inhibare al extractului de *Tagetes* sp. se menține iar suprafețe destul de mici se pot observa în

cazul variantelor tratate cu tincturile de *Satureja hortensis* și *Allium sativum*.

**Tabelul 8**

**Efectul tincturilor asupra dezvoltării coloniei - ziua 9**

| Varianta                       | Suprafața | % față de martor | Diferența față de martor | Semnificația diferenței | Testul Duncan |
|--------------------------------|-----------|------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Netratat                       | 4791,64   | 100,0            | 0,00                     | Mt.                     | B             |
| <i>Aloe arborescens</i>        | 39,77     | 0,8              | -4751,87                 | 000                     | A             |
| <i>Satureja hortensis</i>      | 11,51     | 0,2              | -4780,13                 | 000                     | A             |
| <i>Helleborus purpurascens</i> | 14,92     | 0,3              | -4776,72                 | 000                     | A             |
| <i>Aristolochia clematitis</i> | 182,12    | 3,8              | -4609,52                 | 000                     | A             |
| <i>Sambucus nigra</i>          | 90,01     | 1,9              | -4701,63                 | 000                     | A             |
| <i>Allium sativum</i>          | 12,56     | 0,3              | -4779,08                 | 000                     | A             |
| <i>Tagetes</i> sp.             | 3,14      | 0,1              | -4788,50                 | 000                     | A             |
| Propolis                       | 78,50     | 1,6              | -4713,14                 | 000                     | A             |
| DL (p 5%)                      |           |                  |                          | 1241,92                 | DS 1316,57    |
| DL (p 1%)                      |           |                  |                          | 1674,83                 |               |
| DL (p 0,1%)                    |           |                  |                          | 2233,09                 |               |



**Figura 9 Testarea efectului inhibitor al tincturilor împotriva izolatului de tomate**

Analizând suprafețele afectate de ciuperca *Botrytis cinerea* Pers. pe fructele de tomate, în urma aplicării extractelor (figura 9) putem susține faptul că cele zece extracte testate au fost mai eficiente în controlul izolatului de pe tomate decât a izolatelor de pe vița de vie.

### CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

În baza cercetărilor efectuate se pot enunța următoarele concluzii și recomandări:

2. Ciuperca *Botrytis cinerea* Pers. prezintă o variabilitate fenotipică ridicată care este influențată de planta gazdă de pe care a fost izolată precum și de mediul de cultură pe care a fost cultivată.

3. Din studiul biologiei ciupercii reiese faptul că cel mai eficient mediu de cultură pentru creșterea și dezvoltarea izolatelor ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. a fost mediul PDA.

4. Cel mai potrivit mediu de cultură pentru sporularea ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. a fost mediul Czapek – agar.

5. Dimensiunile conidiilor au variat în funcție de mediul de cultură și de izolatul de la care au fost izolate; cele de me mediile de cultură au avut dimensiuni mai mari decât spori prelevați de pe materialul vegetal infectat.

6. Conidiile prelevate și observate la microscop au fost de formă ovată, elipsoidală, aproape elipsoidală, globoasă.

7. Scleroții au fost variabili ca mărime, formă, număr și distribuție, au fost absenți, rari sau abundenți, cu diferite modele de distribuție: neregulat, în cercuri concentrice, pe marginea plăcii.

8. Caracterele culturale ale coloniilor izolatelor de *Botrytis cinerea* Pers. au variat deasemenea în funcție de mediul de cultură, aspectul coloniilor fiind pufos sau catifelat cu un spectru de culori de la alb, alb murdar, alb crem, cenușiu deschis până la cenușiu închis, maroniu.

9. Pentru creșterea și dezvoltarea ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. recomandăm folosirea mediului de cultură PDA care asigură o dezvoltare mai rapidă a coloniilor.

10. Pentru obținerea de spori se recomandă utilizarea mediului de cultură Czapek – agar pe care deși dezvoltarea coloniilor este mai lentă procentele de sporulare sunt mai ridicate.

11. În general majoritatea extractelor au avut o eficiență ridicată asupra dezvoltării izolatelor testate *in vitro*, gradul de inhibare fiind diferit în funcție de concentrația produsului în mediul nutritiv dar și de izolatul asupra căruia s-au aplicat.

12. Tinctura de propolis a înregistrat efect inhibitor total ceea ce face ca această tinctură să fie singura care se validează ca eficientă la toate concentrațiile aplicate și în cazul tuturor izolatelor.

13. Cele mai eficiente extracte care au efect fungistatic total chiar și la cea mai mică concentrație, la majoritatea izolatelor, au fost cele de *Satureja hortensis*, *Tagetes* sp. și propolis.

14. Eficiența *in vitro* a extractelor din plante poate fi clasificată astfel:  
Izolatul de pe ardei:

- 4% - tinctura de propolis.
- 6% - tincturile de *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis.
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis.

Izolatul de pe tomate:

- 4% - tincturile de *Aristolochia clematitis*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis.
- 6% - *A. arborescens*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis.
- 8% - *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis.

Izolatul de pe ardei iute:

- 4% - tincturile de *Tagetes* sp. și propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis.

Izolatul de pe salată:

- 4% - tincturile de *Satureja hortensis*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Allium sativum*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe zmeur:

- 4% - tincturile de *Satureja hortensis* și propolis
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe mur:

- 4% - tincturile de *Aloe arborescens*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Sambucus nigra*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe căpșun:

- 4% - tincturile de *Satureja hortensis* și propolis.

- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe soiul Chasselas:

- 4% - tinctura de propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe soiul Isabela:

- 4% - tincturile de *Satureja hortensis* și propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe soiul Sauvignon blanc:

- 4% - tincturile de *Satureja hortensis* și propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis

Izolatul de pe soiul Muscat ottonel:

- 4% - tincturile de *Satureja hortensis* și propolis.
- 6% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis
- 8% - tincturile de *A. arborescens*, *A. marlothi*, *A. paradisiacum*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematitis*, *Tagetes* sp., propolis

15. Extractul de *Satureja hortensis* la concentrația de 4% a avut un grad de inhibare total asupra dezvoltării ciupercii, cu excepția izolatelor de pe solanacee, ceea ce ne determină să îl recomandăm pentru controlul patogenului *in vitro*.

16. Pentru controlul *in vivo* al ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. recomandăm utilizarea extractelor de *Allium sativum*, *Satureja hortensis*, *Tagetes* sp. și propolis.
17. Testarea efectului fungicid a extractelor asupra izolatului de pe mur a demonstrat faptul că tincturile de *Aloe arborescens*, *Satureja hortensis*, *Helleborus purpurascens*, *Aristolochia clematidis* și propolis au avut efect fungicid asupra acestui izolat deoarece nu au permis dezvoltarea miceliului atunci când acesta a fost prelevat de pe mediul cu extract și reinoculat pe mediu proaspăt netratat.
18. Extractele hidroalcoolice testate *in vivo* asupra izolatului Muscat ottonel, care au înregistrat cel mai puternic efect inhibitor au fost tincturile de *Aristolochia clematidis* și *Allium sativum* urmate de extractele de *Tagetes* și propolis.
19. Eficacitatea tratamentelor aplicate pentru controlul ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. - izolatul Sauvignon blanc a fost cea mai ridicată în cazul tincturilor de *Allium sativum*, *Tagetes* sp., *Aloe arborescens*.
20. Eficiența extractelor hidroalcoolice a fost mai ridicată în controlul izolatului de pe tomate decât a celor două izolate de pe vița de vie.
21. Tincturile care au înregistrat cel mai puternic efect inhibitor asupra izolatului de pe tomate testate *in vivo* au fost cele de *Tagetes* sp., *Satureja hortensis* și *Allium sativum*, motiv pentru care le recomandăm pentru controlul acestui pe timpul depozitării.
22. În cazul tratamentelor aplicate asupra fructelor de căpșun infectate artificial cu miceliul ciupercii *Botrytis cinerea* Pers. toate extractele aplicate au avut efect inhibitor nepermițând dezvoltarea miceliului dar datorită alcoolului conținut în tincturi aspectul fructelor a fost depreciat nepermițând efectuarea de măsurători. Recomandăm în cazul acestor fructe foarte sensibile utilizarea de extracte cu o concentrație mai scăzută de alcool sau a extractelor hidro – glicerice.
23. Pentru strugurii depozitați în cazul în care apar focare de infecție cu *Botrytis* recomandăm tratamente cu extractele de *Allium sativum* și *Tagetes* sp

### **Bibliografie selectivă**

1. Drobotă I., 2008, Cercetări privind biologia, ecologia, epidemiologia și combaterea patogenului *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, în plantațiile viticole din zona centrală a Moldovei, Teză de doctorat.
2. Coley-Smith J.R., 1980, The Biology of *Botrytis cinerea*, Academic Press, London, 85-114.
3. Hennebert G. L., 1973, *Botrytis* and *Botrytis*-like Genera, Persoonia 7, 183-204.
4. Rosslenbroich H.-J., D. Stuebler, 2000, *Botrytis cinerea*—history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection, 19, 557–561. Elad et al. (2004).
5. Puia Carmen Emilia, 2005, Fitopatologie. Patografie. Etiologie, Ed. Risoprint, Cluj Napoca, 197 p.

6. Puia Carmen, 2006, Fitopatologie horticolă, Ed. Risoprint, Cluj Napoca, 315 p.
  7. Iacob Viorica, M. Hatman, E. Ulea, I. Puiu, 2000 - Fitopatologie horticolă, Editura Ion Ionescu de la Brad –Iași.
  8. Pârvu M., 2004, Bolile trandafirului, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca.
  9. Pârvu M., 1993, Studiul morfologic, fiziologic și biochimic al unor specii de *Botrytis* parazite pe plantele ornamentale din Grădina Botanică Cluj-Napoca, Universitatea "Babeș-Bolyai", Teză de doctorat, Cluj-Napoca.
  10. Șesan Tatiana, C. Tănase, 2007, Ciuperci anamorfe fitopatogene, Ed. Universității din București.
  11. Fukumori Y., M. Nakajima, K. Akutsu, 2004, Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*, J Gen Plant Pathol, 70:256–260, The Phytopathological Society of Japan.
  12. Odeh M. I. A., 2006, Biological control of gray mold, blue mold and rhizopus soft rot on grape, pear, kiwi, strawberry by *Trichoderma harzianum*, PhD Thesis.
  13. Alfonso C, R. Raposo, P. Melgarejo, 2000, Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. Plant Pathol 49:243–251.
  14. Droby S., V. Vinokur, B. Weiss, L. Cohen, A. Daus, E. Goldsmith, R. Porat, 2002, Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Biological Control 92, 393–399.
  15. Frasin Loredana Beatrice, Iulia Nitu, A.C. Nitu, C.R. Manea, 2006, Agricultură ecologică: Combaterea biologică a bolilor plantelor.
  16. Moyano C., R. Raposo, V. Go´mez, P. Melgarejo, 2003, Integrated *Botrytis cinerea* Management in Southeastern Spanish Greenhouses, J. Phytopathology 151, 80–85, Blackwell Verlag.
  17. Zarins Ivars, M. Daugavietis, Julija Halimona, 2009, Biological activity of plant extracts and their application as ecologically harmless biopesticide Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. sodininkystė ir daržininkystė, 28(3).
- \*\*\* [www.genoscope.cns.fr](http://www.genoscope.cns.fr)