IMPACTUL PARAZITAR AL NEMATODEI *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* LA TUBERCULII DE CARTOF ÎN PRIMELE FAZE DE DITILENHOZĂ

Melnic Maria, Erhan Dumitru, Rusu Ștefan, Gliga Olesea

Institutul de Zoologie al MECC, or. Chișinău, Republica Moldova

E-mail: mariamelnic232@gmail.com

<https://doi.org/10.53937/9789975315975.48>

Abstract. *There are presented data about morpho-physiological changes, as well as physiologico biochemicals, which appear in the tissue of potato tubers infested with Ditylenchus destructor (phases 2, 3 ditylenchose). The obtained data confirms that, D. destructor in the nutrition process eliminates in parallel celulosolitic and pectolytic enzymes, which cause complete maceration of the pectocellulosic membranes of the infected potato cell, as well as the parenchymal cortical tissue in which predominantly cellulose and pectic substances, dominating being cellulose. The results of the biochemical analyzes revealed that, at this stage in the parasite tissue there is a diminishing of the dry mass quantity, and the increase of the quantity of water. It is important to mention that in the plasmalemma mechanically traumatized by the nematode stiletto, the main intracellular inclusions of the potato tuber - the starch granules - were kept without change. Subsequently, when plasmalemma is destroyed, the granules diffuse into the nematode suspension.*

Key words: *potato tubers, parasite-host, nematodes, starch granules.*

INTRODUCERE

Cartoful este una dintre cele mai importante culturi agricole din lume, datorită componenței sale bogate în proteine, grăsimi, hidrocarburi, vitamine, substanțe minerale și a altor compuși biologic activi [2; 3 5; 9]. Cartoful este un product bogat în conținut de hidrați de carbon (17-22%) - amidon, celuloză, zaharoză, glucoză, fructoză [7]. Dintre polizaharide prin cantitate se deosebește amidonul - 15 grame/100 grame product. Tuberculi de cartofi sunt organe suculente, cu un conținut mediu de 25% substanță uscată și 75% apă. Cartoful este un aliment hrănitor, sănătos, ușor digerabil, precum și energetic, permis diabeticilor și tuturor celor predispuși obezității. Totodată, aceștea sunt preferați și de diferiți dăunători, printre

care nematoda tuberculilor *Ditylenchus destructor* [4]. Studiul proceselor de adaptare a complexelor de nematode fitoparazite și libere la cultura cartofilor de masă, soiuri locale sau de import din gospodării private și asociații de producere din republică, este de importanță primordială.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetări asupra tuberculilor de cartofi infestați cu nematoda *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945, în primele faze de ditilinhoză (2; 3), s-au petrecut în perioada anilor 2014-2017. Cartofii au fost colectați din depozite în perioada de păstrare. Extragerea nematodelor din țesutul infestat s-a efectuat cu aplicarea metodei clasice Baermann, modificată de către Nesterov [13]. Densitatea unităților *D. destructor* a fost determinată cu ajutorul camerei de Grisse. Cu aplicarea microscopului stereoscopic, precum și a metodelor biochimice [10], au fost urmărite schimbările morfo-fiziologice, care au loc în țesutul infestat a unor asemenea tuberculi de cartofi infestați, comparativ cu cei sănătoși, ca rezultat al impactului cu *D. destructor*, precum și al principalilor indici biochimici – cantității de masă uscată și apă.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza de laborator a cartofilor infestați în primele faze de ditilinhoză (2, 3), a demonstrat o populare primară monotipică cu specia de nematode endoparazită migratoare *D. destructor* – femele, masculi, ouă, larve (L_2 ; L_3 ; L_4 cu dominanța L_2) (Figura 1, A). Intensivitatea acestora în porțiunile de țesut infestat, ce urmează imediat sub coajă, care a fost expus cercetărilor, a constituit 366.6 unități/gram.

■ larve ■ masculi □ femele ■ ouă

B

Figura 1. A - Femela *D. destructor* cu larve și ouă (orig., 2016); B - Repartizarea speciei *D. destructor* pe sex și vârstă

Conform calculelor efectuate, formelor mature și ouălor acestora, le revine corespunzător: masculi - 17%; femele - 14%, iar ouă - 7%. Cel mai mare procent îi revine larvelor *D.destructor* (L_2 , L_3 , L_4) - 62%, cu dominanța L_2 (Figura 1 B). Analiza schimbărilor morfo-fiziologice, care au loc în țesutul infestat a demonstrat, că în asemenea porțiuni, în cazul prezenței doar a populațiilor *D.destructor* (femele, masculi, forme juvenile, ouă), sunt prezente rămășițe ale celulelor disociate. Din figura 2 observăm destul de clar, că în prezența *D.destructor*, în țesutul infestat are loc hidroliza țesutului parenchimatic cortical intercelular al tuberculilor de cartofi, precum și al membranelor pectocelulozice ale celulelor vegetale, compuse din celuloză, protopectină și pectină, dominantă fiind celuloza. Acest fapt ne demonstrează că parazitul, în procesul de nutriție elimină, paralel, enzime celulozolitice și pectolitice, care descompun celuloza și substanțele pectice, ceea ce este foarte important pentru ca acesta să pătrundă în țesutul vegetal al tuberculilor de cartofi și să se deplaseze din porțiunea infestată, în cea neinfestată, cu celule vii. La această etapă de parazitare, își menține parțial forma inițială plazmalema în care se păstrează fără schimbări granulele de amidon.

Figura 2. Țesut vegetal macerat al pulpei tuberculului de cartof parazitat cu *D.destructor*: A- rămășițe ale celulelor disociate cu ouă și nematode *D.destructor* de diferite vârste; **B-** porțiune de țesut de cartof infestat cu rămășițe de celule disociate

Amidonul, după cum se știe, constituie 70-80% din substanța uscată a tuberculilor de cartofi. În citoplasmă amidonul are forma de granule cu dimensiunile de la 1 mkm până la 100 mkm, mai frecvent fiind de mărimea 20-40 mkm. Conform datelor noastre, într-o celulă disociată pot fi enumerate de la 4-6, până la 13-14 granule de diferite forme și dimensiuni. La cartofi granulele de amidon sunt incolore, de formă ovoidală. În celula vegetală, acestea sunt purtate de către leucoplastide, care au fost numite și amidoplastide.

Observările de mai departe au demonstrat, că plazmalema este expusă destrugerii totale, iar granulele de amidon, mai întâi fiind parcă lipicioase, se unesc între ele formând niște aglomerări (fig. 3; 4). Substratul lipicios, rezultă în procesele de hidroliză a membranelor pectocelulozice ale celulelor și țesutului intercelular parenhimatic.

Figura 3. *D. destructor* (femele, masculi, larve, ouă) și aglomerări ale granulelor cleioase de amidon după deformarea completă a plazmalemei (original)

Este cunoscut faptul, că stiletul (stomatostiletul), speciilor de nematode din ordinul *Tylenchida*, printre care *D. destructor*, este organ de înțepare-absorbire cu ajutorul căruia nematoda perforează pereții celulelor vii, din care absoarbe conținutul citoplazmatic.

Capilaritatea stiletului este efectivă datorită prezenței celor 3 glande ec-

toenzimatică - una dorsală și două - latero-ventrale. Aceste glande - câte o glandă pentru fiecare sector al esofagului, cu structură triradială, își varsă conținutul lor în felul următor: glanda dorsală - în cavitatea bucală, imediat după sectorul telostomatic al stomatostiletului, sau puțin mai jos; celelalte două glande, aranjate latero-ventral - în orificiul bulbului esofagian (fig. 5 -A; B).

Figura 4. Aglomerări a nematodei *D.destructor*, care se mișcă foarte vioi, printre granulele de amidon împrăștiat haotic în suspensie (original)

Funcțiile stiletului: 1. mișcări ritmice în procesul de înțepare a țesutului vegetal parazitat, paralel - eliminarea enzimelor din glanda dorsală; 2. stiletul nematodelor pătrunde în interiorul celulelor de unde absoarbe substanțele citoplazmatice -glucide, lipide, proteide, acizi nucleici etc., precum și organitele microsomale - rizomi, lizozomi, dictiozomi, care liber trec prin capilarul stiletului în esofag. Aici nimeresc și secrețiile celorlalte două glande, aranjate în esofag latero-ventral față de intestinul median, care participă la digestia intestinală.

În așa mod sucurile digestive nimeresc în intestinul median unde are loc digestia hranei absorbite. Prin urmare, rolul decisiv în corelațiile dintre plantele-gazdă și nematodele fitoparazite, îi revine secrețiilor glandei esofagiene aranjată dorsal, care sunt eliminate paralel cu procesul de nutriție. Acestea sunt enzime hidrolitice - celulozolitice și pectolitice, care distrug fibrele de celuloză și substanțele pectice.

Figura 5. *D.destructor*, structura esofagului: A - original, 2017; B - schemă (după Paramonov, 1964): 1 - canalul esofagului; 2 - bulbul esofagian median; 3 - cele 3 glande digestive esofagiene; 4 - inelul nervos; 5 - canalul glandei esofagiene dorsale, care își varsă conținutul la baza stiletului; 6 - orificiul celor 2 glande esofagiene digestive, aranjate latero-ventral, care își varsă conținutul în orificiul bulbului esofagian; 7 - stiletul; 8 - nuclee ale glandelor esofagiene digestive. C - specie din ordinul Tylenchida în proces de nutriție (schemă) (Williamson, Hussey, 1996, după Zinovieva, 2004): 1-membrana pectocelulozică; 2 - plasmalema.

În cercetările precedente multianuale [1; 8; 12], prin diferite metode biochimice, printre care și metoda de electroforeză în gel poliacrilamidic, modificată în micro-variantă, a fost stabilită fracționarea proteidelor din exudatele nematodelor din genul *Ditylenchus* - nematoda tuberculilor de cartofi *D. destructor*, precum și a nematodei de tulpină a culturilor *Allium* - *D.dipsaci* și determinată activitatea enzimelor din grupa

hidrolazelor. Rezultatele cercetărilor efectuate de noi au demonstrat, că în exudatele nematodelor sunt prezente doar enzimele celulozolitice și pectolitice, care după cum am observat mai sus, provoacă macerarea țesutului parenchimatic cortical al pulpei tuberculului de cartof, precum și al pereților pectocelulozici ai celulelor, ceea ce favorizează deplasarea paraziților din porțiunile de țesut infestat în porțiuni de țesut sănătos. Mai mult decât atât, rezultatele cromatografiei hidrolizatelor enzimaticale ale substratului de Na-KMC ne-au demonstrat, că fracțiile obținute din exudatul *D.destructor* contribuie la dezagregarea substratului până la celobioză. Unii autori [6] au constatat, că în omogenatul țesutului vegetal de ceapă, atacat de *D. dipsaci*, se conțin enzime de endopoligalacturonază și endopolimetiltranseliminază.

Nematodele endoparazite migratoare ale plantelor, printre care nematoda tuberculilor *D.destructor*, se nutresc exclusiv doar cu conținutul celulelor vegetale vii. O deosebită importanță, ce permite atât pătrunderea parazitului în plante, cât și migrarea acestuia dintr-o porțiune a țesutului în alta, o au enzimele pectolitice, eliminate în procesul de nutriție, care exercită acțiune asupra polimerilor membranelor celulelor vegetale și ale țesutului intercelular parenchimatic cortical.

Asemenea date, precum și observările microscopice efectuate, ne permit să concluzionăm, că nematoda *D.destructor* în procesul de nutriție, pătrunde cu ajutorul stiletului în interiorul celulelor vegetale parazitare ale pulpei tuberculilor de cartofi, de unde absoarbe compușii citoplazmatici - hidrocarburi simple, proteine, aminoacizi, peptide, lipide, acizi organici, acizi grași etc.. Prin lumenul stiletului sunt absorbite de asemenea și microincludiunile intracelulare- ribozomi, lizozomi, dictiozomi, cu diametrul mai mic decât diametrul capilarului stiletului, care liber trec prin stilet în esofag, lăsând să rămână în suspensie celule goale. Paralel cu hrana în esofag nimeresc și secrețiile celorlalte 2 glande esofagiene,

aranjate latero-ventral, care ulterior participă la digestia intestinală.

Este important de menționat, că dispariția granulelor de amidon, are loc în stadii avansate de ditlenhoză (fazele 4, 5), când tuberculii de cartofi sunt infestați de parazitul primar *D.destructor* în asociere cu paraziți secundari - nematode saprofite, bacterii, fungi, acarieni, care pătrund pe căile lăsate de acesta. O mare parte a speciilor de bacterii și sporii fungilor sunt transportați în tuberculii infestați de către nematodele saprofite, atât pe cuticulă, cât și în intestin. Nutriția nematodelor saprofite are loc prin deglutiție a produselor primare, care rezultă sub acțiunea microflorei saprobiotice. Condițiile, care s-au creat în tuberculii infestați în stadiile avansate de ditlenhoză (4, 5), nu sunt favorabile pentru *D. destructor*, de aceea acesta este expus pieirii, sau se deplasează spre sol. În rezultatul acțiunii asociate a nematodelor parazite și saprofite împreună cu microorganismele și acarienii, are loc macerarea totală a tuberculilor de cartofi și transferarea acestora în deșeuri.

În țesutul infestat de *D.destructor* în fazele 2, 3 de ditlenhoză al tuberculilor de cartofi de soi Irga, s-au evaluat paralel variațiile conținutului de masă uscată și apă. După unii autori [7] componenții chimici ai tuberculilor de cartofi, printre care cantitatea de masă uscată și apă, prezintă valori medii, minime sau maxime, în funcție de soiul cultivat, condițiile pedoclimatice și tehnologia de cultivare.

Conform rezultatelor obținute de noi, în porțiunile tuberculilor de cartofi de soi Irga, cultivați în condițiile Republicii Moldova, liberi de nematode (martorul), cantitatea de apă este egală cu 87%, apreciată la mărimi maxime. Paralel se observă, că cantitatea de substanță uscată este de 13%, clasificată la valori minime.

Dacă comparăm datele obținute în rezultatul analizelor efectuate asupra țesutului sănătos al tuberculilor cu cel infestat de *D. destructor* observăm, că sub influența parazitului are loc diminuarea cantității de masă

uscată de la 13% până la 11,2%, adică cu 1,8%, iar cantitatea de apă se majorează corespunzător până la 88,8%, fiind cu 1,8 % mai mare în țesutul infestat, comparativ cu cel neinfestat (fig. 6).

Figura 6. Conținutul de substanță uscată (nr 1; nr 2) și apă (nr 3; nr 4) în cartofii de soi Irga, liberi de *D.destructor* - nr 1, nr 3 și infestați în primele faze de ditilenhoză - nr 2, nr 4

Rezultatele obținute pe cale biochimică, ne confirmă, că nematodele în proces de nutriție, consumă conținutul citoplazmatic al celulelor vegetale, ceea ce în final duce la diminuarea masei uscate a țesutului tuberculilor infestați.

CONCLUZII

1. Nematoda *D.destructor* în procesul de nutriție, perforează cu ajutorul stiletului pereții celulelor vegetale, de unde absoarbe substanțele citoplazmatice (hidrocarburi simple solubile -monozaharide și dizaharide, proteine, aminoacizi, peptide, lipide, acizi organici, acizi grași ș.a. precum și organitele microsomale - ribozomi, lizozomi, dictiozomi, care liber trec prin stilet în esofag, lăsând să rămână celulele goale dissociate.

2. Prin cercetări biochimice s-a determinat, că populațiile *D.destructor* provoacă diminuarea masei uscate a țesutului infestat al tuberculilor de cartofi (fazele 2, 3 de ditilenhoză), ca rezultat al nutriției acestora cu conținutul citoplazmatic al celulelor. Paralel se observă majorarea cantității de apă.
3. Membranele pectocelulozice macerate ale mezocarpului tuberculilor de cartofi infestați, precum și ale țesutului parenchimului cortical macerat, este o dovadă că *D.destructor*, în procesul de nutriție, elimină paralel enzime celulozolitice și pectolitice, care provoacă hidroliza celulozei și substanțelor pectice din componența acestora, ceea ce este foarte important, pentru ca parazitul să pătrundă în tuberculii de cartofi și să se deplaseze dintr-o porțiune de țesut în alta.

Investigațiile au fost realizate în cadrul proiectului 15.817.02.12F, finanțat de Consilul Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică al Academiei de Științe a Moldovei.

BIBLIOGRAFIE

1. Bumbu I.V. Patogeneza și combaterea fitonematodozelor. Chișinău: U.T.M., 2009, -164 p.
2. Cea mai consumată legumă - cartoful //Cotidian Național Nr.2008155 din 27 august 2008.
3. Chiru S. Tendințe actuale în procesarea cartofului //Cartoful în România. INCDCSZ Brașov. 2011, vol. 20, nr 1-2. P.1-7.
4. Melnic M., Erhan D., Rusu Ș., Gherasim E., Chihai N. Risk of use of seed potatoes infested with *Ditylenchus destructor* at initial phase of ditylenhosis //IX-th International Conferehce of Zoologists. 12-13 October, 2016. Chisinau: Tipogr. Elan Poligraf. -P.146-147.
5. Milică C. Cartoful, legumă hrănitoare cu virtuți terapeutice //Ziarul Lumina. Iunie, 2009.
6. Riedel R.M., May W.F. A comparison of pectinases from *Ditylenchus dip-*

- saci* and *Allium* cepa callus tissue //Journal of Nematology.1971, № 2, vol.3. - P.174-178.
7. Starodub V., Gheorghiev N. Plantele tuberculifere și rădăcinoase. Fitotehnie, „Museum”. Chișinău, 2008.- P. 312-330.
8. Бумбу И.В., Мельник М.В. Ферментативная активность фракций белков, выделяемых стеблевой нематодой картофеля //Паразиты животных и растений. Выпуск X1, Кишинев: Штиинца, 1975. - С. 111-118.
9. Гребинский С. Биохимия растений -Львов:Издательское объединение «Вища школа», 1975, 280 с.
10. Ермакова А.И. Методы биохимического исследования растений.- Издание 3-е, переработанное и дополненное. Ленинград ВО: Агропромиздат, 1987, 430 с.
11. Зиновьева С.В. Молекулярные механизмы взаимодействия растений и паразитических нематод: теоретические и прикладные аспекты // Паразитические нематоды растений и насекомых- Москва: Наука. -2004. - С. 50-85.
12. Мельник М.В., Бумбу И.В. Гидролитические ферменты луковочно-чесночной расы *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn,1857) Filipjev,1936 // Известия Академии наук Молдавской ССР, серия биологических и химических наук, Кишинев:Штиинца, 1974, №1. - С. 53-56.
13. Нестеров П.И. Фитопаразитические и свободноживущие нематоды юго-запада СССР. Кишинев: Штиинца, 1979, - 277 с.
14. Парамонов А.А. Основы фитогельминтологии. Том 1, М.,1962, 480 с.