

**EFEK PERLAKUAN KOMBINASI IRADIASI SINAR GAMMA,
CADMIUM, N₂, DAN O₂ PADA DAYA TAHAN KHAMIR
*Schizosaccharomyces pombe***

Nikham

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN

ABSTRAK

EFEK PERLAKUAN KOMBINASI IRADIASI SINAR GAMMA, CADMIUM, N₂, DAN O₂ PADA KHAMIR *Schizosaccharomyces pombe*. Telah dilakukan penelitian efek perlakuan iradiasi sinar gamma ⁶⁰Co, cadmium (Cd), N₂, dan O₂ terhadap 3 galur khamir yaitu *S. pombe* MN55, MN72 dan L972h⁻. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui nilai D₁₀ ke tiga galur khamir akibat efek Cd dan radiasi dalam kondisi N₂ dan O₂. Sampel yang dialiri N₂ dan kontrol diiradiasi menggunakan sinar gamma ⁶⁰Co pada dosis 0; 0,3; 0,6; 1,16; 1,72; 2,28 dan 2,85 kGy, yang dialiri O₂ diiradiasi pada dosis 0; 0,22; 0,43, 0,84; 1,25; 1,65; dan 2,06 kGy, masing-masing dengan laju dosis 3 kGy/jam dan 1,5 kGy/jam. Setelah diiradiasi sampel dibiakkan pada media Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) dan diinkubasi pada suhu 30 ± 2 °C selama 3 hari. Koloni yang tumbuh dihitung, datanya dipakai untuk membuat kurva dan menentukan nilai D₁₀. Hasilnya menunjukkan bahwa nilai D₁₀ sampel yang diiradiasi dengan dialiri N₂ lebih tinggi daripada nilai D₁₀ sampel yang dialiri O₂. Selain itu tidak ada perbedaan nyata nilai D₁₀ sampel baik yang ditambah Cd maupun tidak, ini membuktikan bahwa Cd tidak jelas berperan sebagai *sensitizer* (bahan pemeka) atau tidak terhadap daya tahan galur-galur khamir yang diiradiasi.

Kata kunci: sinar gamma, cadmium, *Schizosaccharomyces pombe*, N₂, O₂, nilai D₁₀.

ABSTRACT

COMBINATION TREATMENT EFFECTS OF GAMMA RAYS IRRADIATION, CADMIUM, N₂, AND O₂ ON THE YEAST OF *Schizosaccharomyces pombe*. The effect of gamma rays irradiation, cadmium (Cd), N₂, and O₂ to radiosensitivity of 3 yeast strains of *S. pombe* MN55, MN72 and L972h⁻ have been observed. The objective of the research is to know the D₁₀ value of the 3 strains of yeast as the effect of Cd and radiation in N₂ and O₂ condition. The suspension of the sample under N₂ flow and the control were irradiated using gamma rays of ⁶⁰Co at doses 0; 0.3; 0.6; 1.16; 1.72; 2.28 and 2.85 kGy, where as the samples

under O₂ flow were irradiated at doses of 0; 0.22; 0.43, 0.84; 1.25; 1.65; and 2.06 kGy, with dose rate 3 kGy/hrs and 1.5 kG/hrs, respectively. After irradiation, the samples were cultured on the Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) medium and incubated at 30 ± 2 °C for 3 days. The surviving colonies were counted, then the data are use to make curve and to determine the D₁₀ value. The results show that the D₁₀ values of the sample, irradiated under N₂ flow are higher than that of the D₁₀ value of the sample irradiated under O₂ flow. Beside that there are not differences of the D₁₀ values of the sample either with or without Cd addition. It proves that Cd has no clear function as sensitizer or not on the radiosensitivity of *S. pombe* strains.

Key words: gamma rays, cadmium, *Schizosaccharomyces pombe*, N₂, O₂, D₁₀ value.

PENDAHULUAN

Senyawa cadmium (Cd) baik yang organik maupun anorganik, secara komersial dipakai untuk menghambat atau mencegah pertumbuhan jamur. Misalnya pertumbuhan *Ctenomyces sp.* pada wool dengan cara mencelupkan bahan ke dalam larutan yang mengandung Cd [1]. Senyawa Cd secara ekstensif juga digunakan dalam fungisida dan dipakai untuk mengontrol penyebaran jamur seperti; *Sclerotinia homoeocarpa* [2], *Coryneum folliicolum* [3], dan *Gloeocercospora sorghi* [4]. Selain itu Cd sebagai bakteriosidal alam yang mempunyai berbagai aplikasi industri. Misalnya bakteriosidal Cd (sebagai CdCl₂) yang berpotensi sebagai detergen sintetik yang efektif dan dipakai sebagai desinfektan pada pabrik kapas untuk keperluan rumah sakit [5].

Beberapa studi menunjukkan berbagai tingkat toleransi jamur terhadap Cd. Pada awal abad 20, *Penicillium glaucum* dilaporkan mampu beradaptasi terhadap Cd [6]. Galur *Fusarium oxysporum* diisolasi dari tanah yang terkontaminasi berat dengan Cd, Cu, Pb dan Zn mempunyai toleransi lebih besar daripada yang diisolasi dari tanah yang tak terkontaminasi logam berat [7].

Penelitian secara ekstensif telah dilakukan untuk menjelaskan tanggapan khamir *Saccharomyces ellipsoideus* terhadap Cd. Konsentrasi 0,4 mM CdCl₂ dapat

mereduksi sel hidup sekitar 50 %, setelah diinkubasi selama 48 jam. Keberhasilan biakan khamir ini (sel induk) dalam media kaldu yang mengandung 0,4 mM CdCl₂ menghasilkan galur yang tahan terhadap Cd sehingga hampir 100 % sel dapat hidup dalam media yang mengandung 0,8 mM CdCl₂. Kenaikan daya tahan terhadap Cd tidak stabil dan kemudian sel yang tahan dibiakkan dalam media yang tidak mengandung Cd, menghasilkan penurunan toleransi terhadap Cd [8]. Atas dasar informasi tersebut telah dilakukan penelitian efek Cd terhadap 3 galur khamir yaitu *S. pombe* MN55, MN72 dan L972h⁻ yang diiradiasi pada sinar gamma ⁶⁰Co dengan dialiri N₂ dan O₂. Khamir *S. pombe* adalah salah satu tipe sel eukariotik yang paling sederhana. Sel ini mempunyai *gen housekeeping* minimal jumlahnya 700 dan ukuran *genome* paling kecil 14 Mb dan diasumsikan sebagai model sel manusia. Beberapa gen manusia umumnya diekspresikan dalam sel *S. pombe*. Sel ini relatif mudah dipelajari fungsi gennya dengan mengacu rekombinan homolog dan dengan mengintroduksi homolog manusia [9]. Menurut beberapa pustaka ada tiga strain khamir yang menarik yaitu *S. pombe* MN55 tidak dapat menghasilkan *Glutathione*, γ -*Glutamyl-Cysteinyl-Glycine* (GSH), *S. pombe* MN72 hanya dapat menghasilkan GSH dan *S. pombe* L972h⁻ dapat menghasilkan keduanya baik GSH maupun senyawa SH lainnya misal sistein dan metionin [10].

Senyawa GSH atau C₁₀H₁₇N₃O₆S yaitu oligopeptida (tripeptida) nonprotein utama yang banyak terdapat dalam bakteri Gram-negatif [10] dan organisme tingkat tinggi termasuk manusia [9]. Senyawa GSH ditemukan dalam sel pada kepekatan hingga 10 mM, sebagian besar dalam bentuk tereduksi. Senyawa GSH juga berperan dalam aktivasi mutagen tertentu misalnya *nitrosoguanidine*, *nitrosamide*, *nitrosocarbamate*, *neocarsinostatin* dan beberapa senyawa dihalogen [11]. Senyawa GSH seluler dilaporkan dapat meningkatkan efek oksigen terhadap kerusakan radiasi dalam *Escherichia coli* [12]. Selain itu, senyawa GSH tampaknya merupakan komponen utama dalam interaksi antara produk radiasi dan sel. Suatu sel yang tidak

mampu mensintesa GSH tidak dapat diproteksi terhadap efek kematian dari radiasi pengion. Selain itu laporan lain menyatakan bahwa GSH dalam *E. coli* tidak mempengaruhi daya tahannya terhadap radiasi gamma [13]. Pustaka lain menyatakan bahwa GSH dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif seperti disebabkan oleh hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radiasi pengion, mempertahankan status protein sulfhidril, kompleksasi senyawa reaktif *xenobiotic* atau *endogenous*, membantu dalam detoksifikasi dan atau ekskresinya serta sebagai transporter asam-asam amino γ -*glutamyl* [14]. Oleh karena itu efek GSH pada kerusakan sel akibat radiasi belum jelas.

Biakan khamir yang diiradiasi dalam kondisi basah, akan mengalami efek radiasi langsung dan tidak langsung. Efek radiasi tidak langsung pada sampel dalam kondisi basah yang dialiri N_2 , akan menghasilkan produk radiolisis berupa radikal e^-_{aq} dan OH, yang dialiri O_2 , menghasilkan radikal OH dan H serta molekul H_2O_2 . Dengan adanya O_2 selama iradiasi, radikal bebas e^-_{aq} dapat bereaksi dengan O_2 sehingga menghasilkan radikal O_2^- [15]. Spesies kimia ini dapat bereaksi dengan DNA baik langsung maupun setelah terjadi transformasi logam dengan cara katalisasi ke dalam sel, akibatnya dapat menghasilkan modifikasi DNA. Ada sekitar 100 jenis modifikasi DNA telah diidentifikasi setelah dipaparkan pada radiasi pengion. Modifikasi ini meliputi kerusakan *strand* tunggal dan *strand* ganda, modifikasi basa dan berikatan silang. Sedangkan efek langsung dari radiasi pada sampel akan menyebabkan eksitasi dan ionisasi pada DNA sehingga terjadi kerusakan seperti alkilasi, hidrasi, kerusakan pada rantai tunggal atau ganda, perubahan bentuk, terjadi ikatan silang *inter-strain*, ikatan silang protein-DNA dan kerusakan karena pirimidin dimmer [16]. Akibat timbulnya modifikasi dan kerusakan-kerusakan pada DNA tersebut dapat menyebabkan kematian sel [17].

Hipotesis penelitian adalah bahwa energi sinar gamma dapat merusak DNA khamir, sehingga menyebabkan kematian sel. Jadi tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui nilai D_{10} (dosis yang diperlukan untuk inaktivasi populasi mikroba sekitar

90%) akibat efek cadmium terhadap daya tahan khamir *S. pombe* galur MN55, MN72 dan L972h⁻ yang diiradiasi pada sinar gamma di mana selama radiasi dengan dialiri gas N₂ dan O₂. Data ini diharapkan dapat dipakai dalam menentukan dosis steril untuk alat-alat kedokteran, sediaan farmasi, obat-obatan, dan pasteurisasi jamu-jamuan, bahan pangan serta hasil olahannya.

TATA KERJA

Bahan.

Galur khamir yang dipakai dalam penelitian ini adalah *S. pombe* MN55, MN72 dan L972h⁻ berasal dari *Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment*, JAERI Jepang. Untuk pembiakan sel khamir ini digunakan media *Yeast Peptone Dextrose Broth* (YPDB) dan untuk pembiakan sel setelah diiradiasi dipakai media *Yeast Peptone Glucose Agar* (YPGA), pemakaian kedua jenis media tersebut berdasarkan rekomendasi dari KUME [18], yaitu media yang biasa dipakai dalam penelitiannya dan masing-masing bahan media adalah buatan Merck. Sebagai cairan untuk membuat suspensi sel khamir digunakan larutan *buffer* fosfat.

Alat.

Tabung khusus dipakai sebagai tempat untuk iradiasi sampel khamir. Iradiator ⁶⁰Co sebagai sumber radiasi dipakai untuk iradiasi sampel. Tabung berdiameter 2,5 cm dan panjang 20 cm, dipakai sebagai wadah akuades steril untuk pengenceran sample. *Petridish* (cawan petri) dipakai sebagai cetakan media datar untuk membiakkan sampel yang telah diiradiasi. Inkubator dipakai sebagai tempat untuk mengering sampel.

Penyiapan biakan.

Galur-galur *S. pombe* MN55, MN72 dan L972h⁻ dibiakkan dalam tabung reaksi yang berisi media YPDB dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 40 jam.

Selanjutnya sel dipanen dengan cara dicuci dengan larutan *buffer* dan sambil dipusingkan dengan alat "HITACHI CENTRIFUGE" pada kecepatan 3.000 rpm selama 30 menit. Setelah bersih suspensi diatur kepadatannya sekitar 10^8 sel per mL.

Iradiasi sel khamir.

Suspensi sampel galur masing-masing ditambah dengan 4,2 mM Cd dan kemudian dikocok untuk mendapatkan sampel yang homogen. Suspensi dibagi dalam lima tabung, siap untuk diiradiasi menggunakan sinar gamma. Satu sebagai kontrol, yang lainnya untuk dialiri N_2 , N_2+Cd , O_2 dan O_2+Cd . Suspensi yang dialiri N_2 , N_2+Cd , dan kontrolnya (tanpa dialiri N_2 , dan O_2 atau udara biasa) diiradiasi pada dosis 0; 0,3; 0,6; 1,16; 1,72; 2,28 dan 2,85 kGy dan laju dosis 3 kGy/jam, sedang yang dialiri O_2 , O_2+Cd diiradiasi pada dosis 0; 0,22; 0,43, 0,84; 1,25; 1,65; dan 2,06 kGy serta laju dosis 1,5 kGy/jam. Penentuan dosis tersebut berdasarkan pada hasil pengukuran dosimeter, di mana sampel diletakan pada ketinggian 15 cm dari lantai dan jarak 92 cm dari sumber sinar gamma untuk sampel yang diiradiasi dengan O_2 dan laju dosis 1,5 kGy/jam. Pada jarak 53 cm dari sumber sinar gamma untuk sampel yang diiradiasi dengan N_2 dan laju dosis 3 kGy/jam.

Pengamatan.

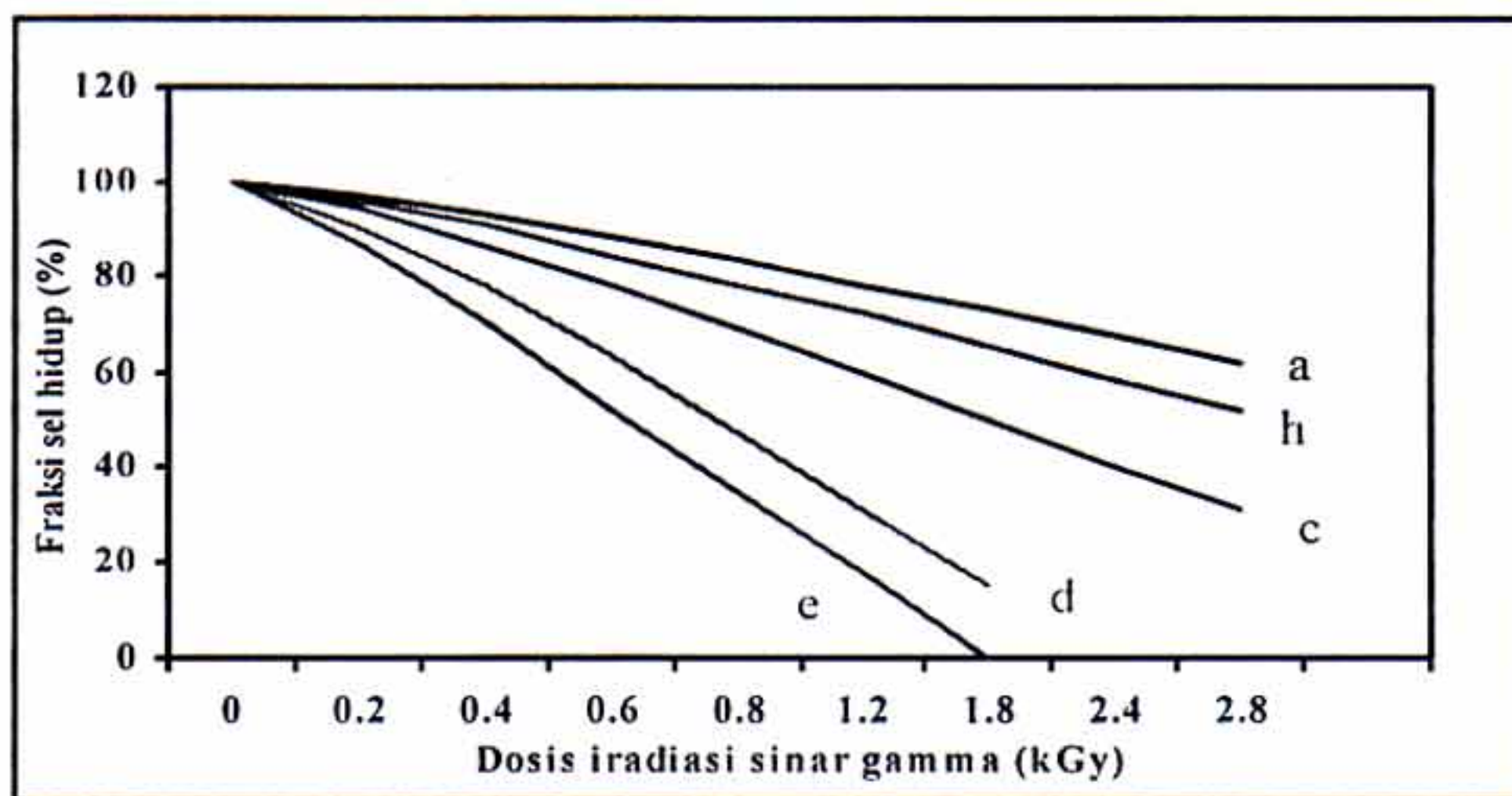
Khamir yang telah diiradiasi, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi akuades dengan *tween* 80 steril, lalu diencerkan. Pada pengenceran tertentu (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} dan seterusnya) suspensi sampel sekitar 0,2 mL dibiakkan pada media YPGA. Kemudian diinkubasi pada suhu $30^{\circ}C$ selama 3 hari. Koloni yang tumbuh dihitung. Data yang diperoleh ditransfomasikan dalam bentuk kurva dan untuk menentukan nilai D_{10} nya dengan bantuan *program basic* dalam komputer (19) .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efek iradiasi dengan dan tanpa penambahan Cd terhadap galur khamir S. pombe MN55.

Walaupun Cd mempunyai sifat menghambat dan toksik terhadap mikroba, namun mikroba berpotensi tersebar di lingkungan terpolusi dengan logam berat. Namun penelitian pengaruh Cd terhadap mikroba jumlahnya masih sedikit. Selain itu, beberapa penelitian tentang interaksi antara logam berat (Cd) dan mikroba, hasilnya ada yang jelas dan tidak jelas efeknya dan penelitian tentang efek Cd terhadap mikrobiota umumnya mempunyai potensi tidak jelas efeknya [20]. Dalam penelitian ini terutama difokuskan pada efek Cd terhadap khamir *S. pombe* yang diiradiasi dalam N₂ dan O₂.

Efek penambahan Cd terhadap sensitivitas galur *S. pombe* MN55 yang diiradiasi dengan sinar gamma dan dialiri gas N₂, O₂ dan udara biasa (kontrolnya) dapat dilihat pada Gambar 1. Kurva berbentuk bahu dan terlihat bahwa efek iradiasi sinar gamma pada khamir yang dialiri O₂ jauh lebih nyata dibandingkan dengan yang dialiri N₂, dan udara biasa (kontrol). Peranan O₂ dalam hal ini dapat mempercepat kerusakan DNA. Hal ini disebabkan jika O₂ yang ada selama radiasi berikatan dengan elektron e⁻ hasil radiolisis air (H₂O) menjadi ion O₂⁻. Ion ini akan menutup *strand* DNA yang rusak akibat radiasi, kondisi demikian kemungkinan kecil sekali atau bahkan tidak bisa diperbaiki oleh enzim ligasa DNA suatu enzim yang berfungsi memperbaiki *strand* DNA yang rusak. Di samping itu radiasi dalam kondisi basah, di mana air yang diiradiasi akan mengalami radiolisis sehingga menghasilkan radikal hidrogen dan hidroksil yang sangat reaktif [16].



Gambar 1. Efek Cd terhadap daya tahan khamir *S. pombe* MN55 diiradiasi dalam kondisi N_2 dan O_2

Jadi keadaan ini akan mempercepat kerusakan DNA khamir karena radikal-radikal tersebut juga berperan sebagai *inhibitor* perbaikan diri DNA yang rusak. Data hasil penelitian memperlihatkan bahwa efek iradiasi dosis 2,06 kGy pada khamir yang dialiri O_2 dapat menurunkan daya tahannya sekitar 3 desimal (*log cycle*), sedangkan yang dialiri N_2 kurang dari 1 desimal. Sedangkan sel khamir baik yang ditambah Cd maupun tidak ditambah Cd, tidak berbeda nyata.

Tabel 1. Nilai D_{10} khamir *S. pombe* galur MN55, MN72 dan L972h⁻ dari masing-masing perlakuan

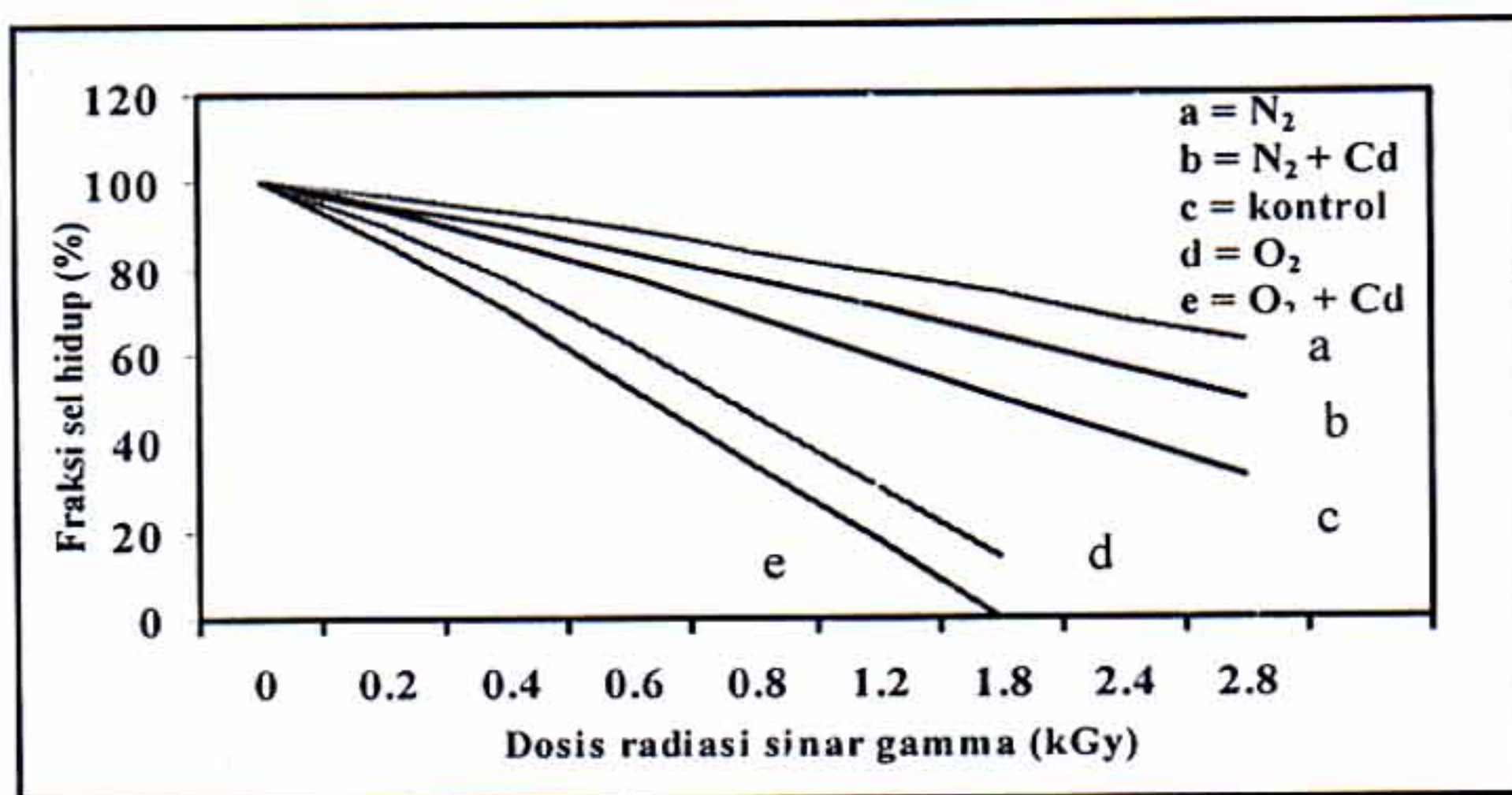
Galur	Nilai D_{10} (kGy)				
	N_2 (a)	N_2 +Cd (b)	Kontrol (c)	O_2 (d)	O_2 +Cd (e)
MN55	3,0	2,9	2,3	0,7	0,6
MN72	2,3	2,2	1,7	0,6	0,5
L972h ⁻	1,7	1,6	1,5	0,5	0,4

Nilai D_{10} (Tabel 1) dari khamir yang ditambah Cd lalu diiradiasi dengan dialiri O_2 adalah 0,6 kGy dan tanpa Cd 0,7 kGy, sedangkan khamir yang ditambah Cd lalu

dialiri N₂ adalah 2,9 kGy dan tanpa Cd 3,0 kGy serta kontrolnya 2,3 kGy. Penurunan daya tahan galur khamir baik ditambah maupun tanpa Cd yang diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 5 kali lipat, dibandingkan dengan yang dialiri N₂ dan 3 kali lipat dibanding dengan kontrolnya.

Efek iradiasi dengan dan tanpa penambahan Cd terhadap galur *S. pombe* MN72.

Efek penambahan Cd terhadap sensitivitas galur *S. pombe* MN72 yang diiradiasi dengan sinar gamma dan dialiri gas N₂, O₂ dan kontrolnya dapat dilihat pada Gambar 2. Dalam gambar dapat dilihat efek iradiasi pada dosis 2,06 kGy terhadap khamir baik tanpa maupun ditambah Cd yang dialiri O₂ dapat menurunkan



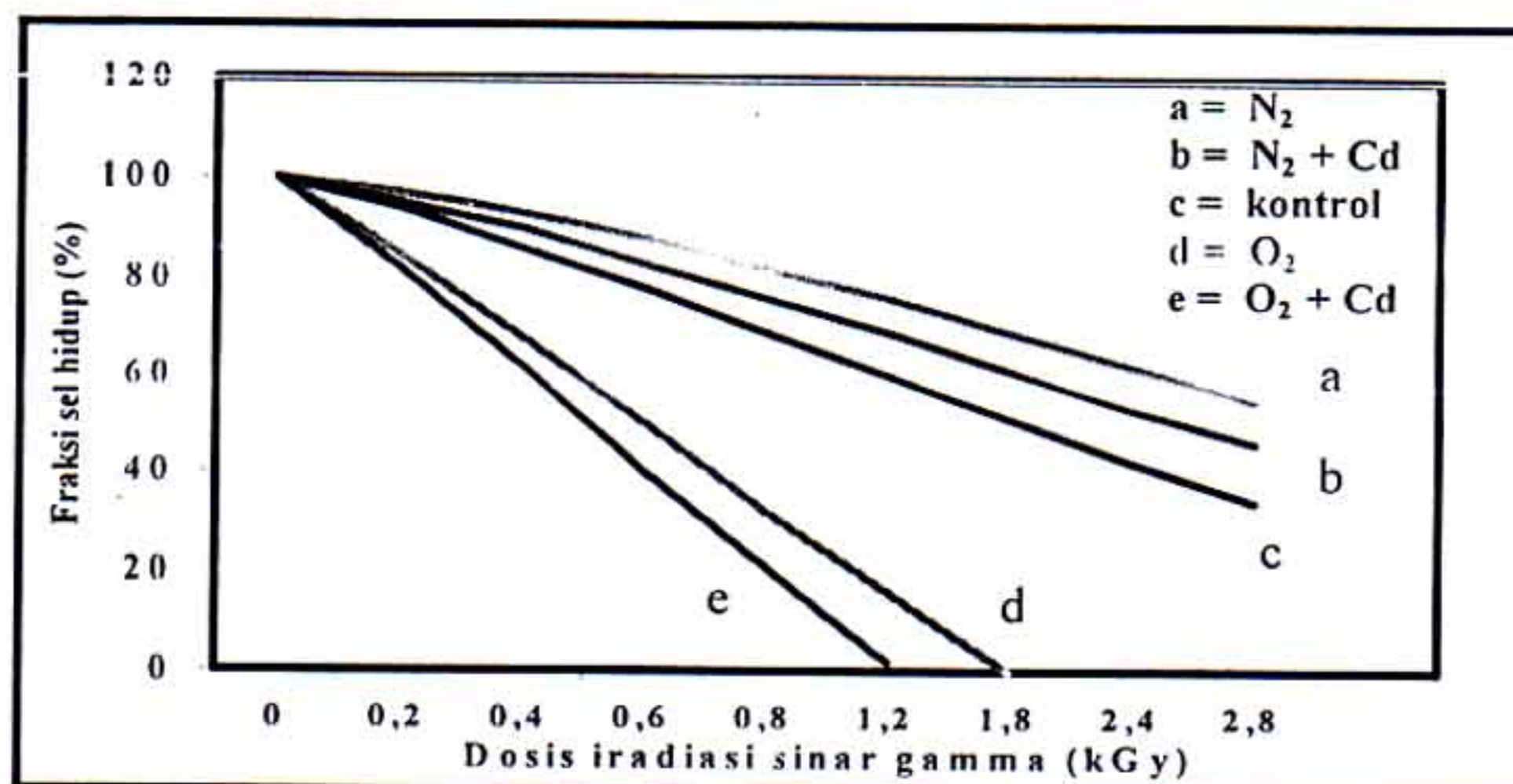
Gambar 2. Efek Cd terhadap daya tahan khamir *S. pombe* MN72 yang diiradiasi dalam kondisi N₂ dan O₂

daya tahannya lebih dari 3 desimal (*log cycle*). Sedangkan yang dialiri N₂ dan kontrolnya lebih dari 1 desimal. Jika dihitung nilai D₁₀, (Tabel 1) khamir yang ditambah Cd dan diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 0,5 kGy dan yang tanpa Cd 0,6 kGy. Sedangkan nilai D₁₀ khamir ditambah Cd yang diiradiasi dengan dialiri N₂ adalah 2,2 kGy dan tanpa Cd 2,3 kGy, dan kontrolnya (tanpa Cd) adalah 1,7 kGy.

Penurunan daya tahan galur khamir baik ditambah maupun tanpa Cd yang diiradiasi dengan dialiri O_2 sekitar 4 kali lipat, dibandingkan dengan yang dialiri N_2 dan 3 kali lipat kontrolnya

Efek iradiasi dengan dan tanpa penambahan Cd terhadap galur *S. pombe* L972h

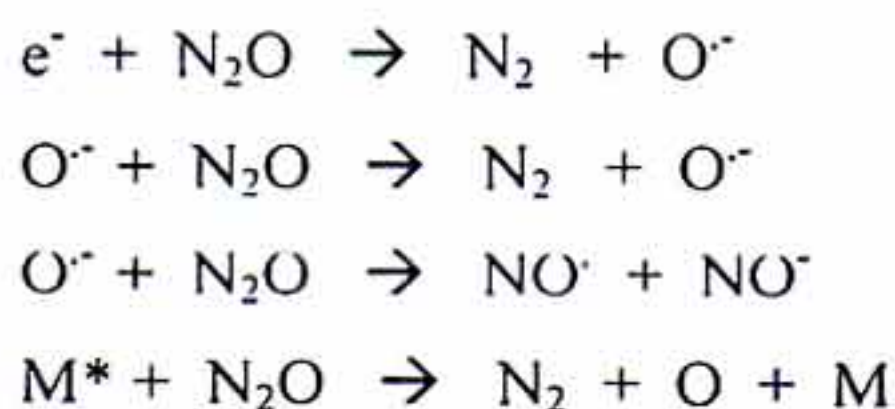
Efek penambahan Cd terhadap sensitivitas galur *S. pombe* L972h yang diiradiasi dengan sinar gamma dan dialiri gas N_2 , O_2 dan kontrolnya dapat dilihat pada Gambar 3. Demikian pula dapat dilihat bahwa efek iradiasi pada dosis 2,06 kGy terhadap khamir ditambah Cd yang dialiri O_2 dan tanpa Cd juga lebih dari 3 desimal. Pada dosis 2,86 kGy terhadap khamir ditambah Cd yang dialiri N_2 dan kontrolnya lebih dari 1,5 desimal. Jika dihitung nilai D_{10} nya (Tabel 1) diperoleh hasil bahwa



Gambar 3. Efek Cd terhadap daya tahan khamir *S. pombe* L972h yang diiradiasi dalam kondisi N_2 dan O_2

khamir ditambah Cd yang diiradiasi dengan dialiri O_2 adalah 0,4 kGy dan tanpa Cd 0,5 kGy. Sedangkan khamir yang ditambah Cd dan dialiri N_2 adalah 1,6 kGy dan tanpa Cd 1,7 kGy dan kontrolnya 1,5 kGy. Dari data nilai D_{10} khamir baik ditambah maupun

tanpa Cd selama diiradiasi dialiri N₂ lebih tinggi daripada khamir yang selama diiradiasi dengan dialiri O₂ dan kontrolnya. Hal ini terjadi karena N₂ merupakan gas *inert* yang tidak menimbulkan efek terhadap daya tahan galur khamir yang diiradiasi. Nitrogen dengan oksigen membentuk senyawa endotermik (N₂O) tidak stabil dalam jumlah besar. Senyawa N₂O dipakai dalam radiasi kimia sebagai suatu penangkap (*scavenger*) yang sangat baik untuk elektron terhidrasi. Senyawa NO adalah materi awal dalam pembentukan asam nitrit. NO adalah radikal bebas, paramagnetik dan sangat reaktif serta membentuk senyawa-senyawa tambahan dengan sejumlah besar garam dan senyawa-senyawa organik [21]. Secara radiolisis N₂O mengalami disosiasi elektron.



Nitrogen oksida (NO) dipakai sebagai *scavenger* radikal umum dan amonia (NH₃) sebagai *scavenger* ion positif [22].

Penurunan daya tahan galur khamir baik ditambah maupun tanpa Cd yang diiradiasi dengan dialiri O₂ adalah 3 kali lipat, dibandingkan dengan yang dialiri N₂ ataupun kontrolnya. Dari data ini dapat disimpulkan bahwa iradiasi dalam kondisi O₂, ternyata lebih efektif untuk menurunkan daya tahan galur khamir tersebut. Di samping itu nilai D₁₀ khamir baik yang ditambah maupun tanpa Cd tidak menunjukkan perbedaan nyata, hal ini dapat disimpulkan bahwa sinergis efek Cd terhadap daya tahan khamir yang diiradiasi dengan dialiri N₂, dan O₂ tidak nyata.

KESIMPULAN

Dari data hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Jika dilihat dari nilai D₁₀ sampel baik ditambah maupun tanpa Cd dan diiradiasi

dengan dialiri N₂ lebih tinggi daripada nilai D₁₀ sampel yang diiradiasi dengan dialiri O₂. Atau dengan kata lain iradiasi dalam kondisi O₂ lebih efektif untuk menurunkan daya tahan galur khamir tersebut.

2. Dari data hasil penelitian ini ternyata tidak ada perbedaan nyata antara nilai D₁₀ khamir baik yang ditambah maupun tanpa Cd, sehingga dapat disimpulkan bahwa efek Cd terhadap daya tahan khamir yang diiradiasi dengan dialiri N₂, dan O₂ tidak berbeda nyata.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada rekan-rekan di Laboratorium Proses Radiasi TRCRE JAERI Jepang yang telah membantu penelitian ini dan rekan-rekan di kelompok Iradiator Gamma yang telah membantu mengiradiasi sampel selama penelitian berlangsung. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala Bidang Proses Industri serta rekan-rekan di Kelompok Sterilisasi atas dukungan moril dan bantuan yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

1. PUVANTHINGAL, J. M., AGARWAL, P. N., and BAJPAI, L.S. *Journal Science Technology. India* (5) (1967) 251-253
2. COLE, H., TAYLOR, B., and DUICH, J., "Phytophathology" (58) (*Advances in Applied Microbiology* (23), Academic Press, London 1978) (1968) : 683 - 686.
3. CRISAN, A., and PITICAS, G., "Serie Biology" (11) (*Study University Babes-Bolyai*,: 35 - 43), *Review Application Mycology* (46) (1967) : 1291
4. HOWARD, F. L., and KEIL, H. L., "Phytopathology" (37) (*Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, London), (23) 1978) (1947) : 10 - 11