

PRELIMINARNO LABORATORIJSKO PREUČEVANJE VPLIVA ANTAGONISTIČNIH GLIV *Trichoderma* spp. NA RAST IZOLATOV PATOGENE GLIVE *Fusarium oxysporum*

Katarina KOS¹, Nuša KANCILJA², Franci Aco CELAR³

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Laboratorijski poskus o vplivu antagonistične glive *Trichoderma* spp. (*T. asperellum* sev T34 iz 2 pripravkov: Trifender Pro in Pannon Starter Perfect Pro) na rast 4 izolatov patogene glive *Fusarium oxysporum* (iz soje, solate, ciklame in jagode) smo izvajali v dvojnih kulturah pri 15 in 25 °C. Pri 15 °C glivi *Trichoderma* spp. nista imeli večjega vpliva na rast micelija izolatov *Fusarium oxysporum*. Obe glivi v dvojni kulturi sta rasli počasi in tudi po 10 dneh ni prišlo do neposredne interakcije. Pri 25 °C pa sta glivi *Trichoderma* spp. močno vplivali na rast micelija izolatov *Fusarium oxysporum*. Do stika micelijev obeh gliv v dvojnih kulturah je prišlo že po štirih dneh, ko je gliva *Trichoderma* sp. zaustavila rast patogena in ga pozneje tudi prerasla. Višja temperatura je godila tudi izolatoma patogena, vendar v laboratorijskih razmerah niso mogli tekrovati z antagonistom. Poskus na sadikah solate v gojitvenih komorah pri 15 in 20 °C z dodajanjem (zalivanjem) spor/pripravka patogena in antagonista med obravnavanji ni pokazal večjih odstopanj v rasti solate ali obsegu okužb.

Ključne besede: antagonistične glive, *Trichoderma asperellum*, *Fusarium oxysporum*

ABSTRACT

PRELIMINARY LABORATORY STUDY OF THE EFFECT OF ANTAGONISTIC FUNGI *Trichoderma* spp. ON THE GROWTH OF ISOLATES OF THE PATHOGENIC FUNGUS *Fusarium oxysporum*

The laboratory experiment was conducted to study the effect of antagonistic fungus *Trichoderma* sp. (*T. asperellum* strain T34 from two products: Trifender Pro and Pannon Starter Perfect Pro) on the growth of 4 isolates of the pathogen *Fusarium oxysporum* (from soybean, lettuce, cyclamen and strawberry) at 15 and 25 °C in dual cultures. At 15 °C both, the pathogen and the antagonist grew slowly and after 10 days they were still not in contact, so the *Trichoderma* fungus had no effect on the growth of *F. oxysporum*. In contrast, at 25 °C, the antagonist had major impact on the growth of *F. oxysporum* isolates, when completely inhibiting the growth in contact after four days in dual culture and eventually overgrew the pathogen culture. The higher temperature also favored the mycelial growth of the pathogens, but was outcompeted by the *Trichoderma*.

¹ doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

² prav tam

³ prof. dr., prav tam

The experiment on the effect of the antagonist and the pathogen on lettuce seedlings in growth chambers at 15 and 25 °C showed no significant difference in growth promotion or its reduction.

Key words: antagonistic fungi, *Trichoderma asperellum*, *Fusarium oxysporum*

1 UVOD

Mikoparazitske in antagonistične glive so preučevane z namenom, da bi razvili alternativo ali dopolnilo kemičnim FFS za zatiranje glivičnih patogenov. *Trichoderma* spp. (Sordariomycetes: Hypocreales: Hypocreaceae) so najbolj uporabljane glive v biotičnem varstvu pred patogeni. Najdemo jih v tleh po vsem svetu. So zelo učinkovite pri kolonizaciji korenin številnih vrst rastlin, pri čemer glive *Trichoderma* spp. tvorijo antibiotične izločke, ki zavirajo naselitev fitopatogenih in drugih gliv, mnoge izmed teh pa lahko tudi parazitirajo (Harman in sod., 2004; Howell, 2003; Kumar in sod., 2017, Monte, 2001). Rastline pogosto tvorijo obrambne presnovke, rod gliv *Trichoderma* pa je na mnoge od teh odporen, kar je v pomoč pri kolonizaciji korenin (Hermosa in sod., 2012). V rastlinah lahko te glive izzovejo tudi sistemsko odpornost, poleg tega pa spodbudno delujejo tudi na rast in razvoj korenin, odpornost rastlin na stres zaradi abiotičnih dejavnikov in boljši prevzem ter izkoristek hranil iz tal (Harman in sod., 2004).

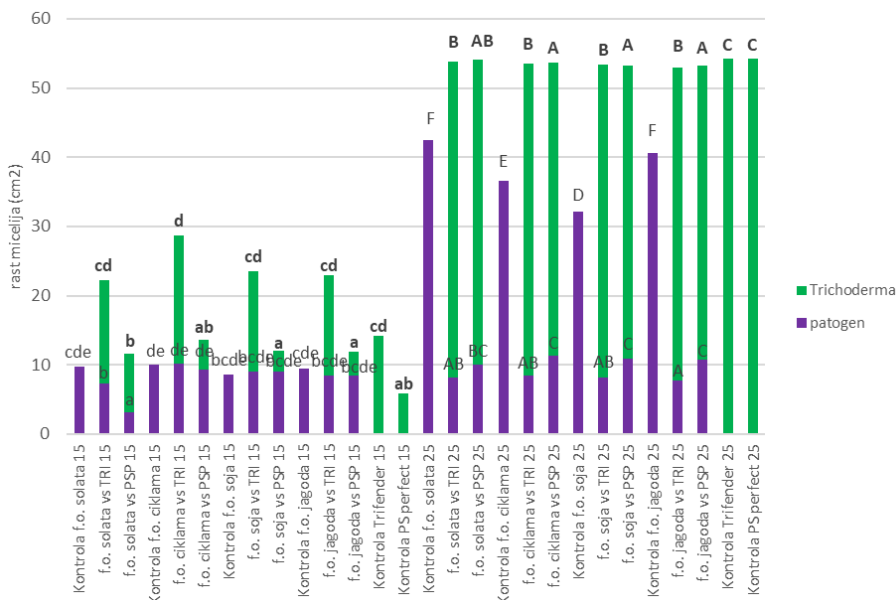
Patogen *Fusarium oxysporum* Schldl. (Sordariomycetes: Hypocreales: Nectriaceae) sodi med najpomembnejše fitopatogene glive, ki lahko okužujejo skoraj 150 različnih rastlinskih vrst. To je patogen širokega ranga gostiteljev, ki izrablja različne strategije okužbe. Gliva povzroča ožige kalčkov in padavico sadik, prizadene koreninski sistem ter je značilen parazit prevodnega sistema (Husaini in sod., 2018; Iida in sod., 2022). V raziskavi smo želeli ugotoviti najbolj optimalne temperaturne razmere, pri katerih je antagonist sposoben omejiti dostop patogena do rastline, njegovo rast in potencialen mikoparazitizem.

2 MATERIALI IN METODE DELA

Glivo *Trichoderma asperellum* (sev T34) smo izolirali iz pripravkov Trifender Pro in Pannon Starter Perfect Pro (Kwizda Agro), izolate patogena *Fusarium oxysporum* (4 izolati iz soje, solate, jagode in ciklame) pa smo dobili iz mikološke zbirke Kmetijskega inštituta Slovenije. V poskus so bila vključena kontrolna obravnavanja in obravnavanja z dvojnimi kulturami (antagonistične VS patogene glive) na gojitvenih ploščah (PDA + tehnični agar) pri temperaturah 15 in 25 °C v 5 ponovitvah. Prirast micelija gliv smo 10 zaporednih dni občrtali in skenirane slike obdelali s programom NIS Elements BR, s katerim smo določili rast micelija gliv (cm²). Pri lončnem poskusu smo sadikam solate (5 ponovitev) v rastni substrat dodali košček micelija patogena (izolat iz solate - kontrola), zalili s suspenzijo spor antagonista (kontrola) in kombinacijo obeh. Z opazovanjem in tehtanjem nadzemskega ter podzemnega dela solate smo po enem mesecu ugotavljali vpliv gliv na rast sadik solate v rastnih komorah pri 15 in 20 °C.

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

Pri 15 °C izolata glive *T. asperellum* nimata večjega vpliva na rast micelija patogena *F. oxysporum*. Oba izolata glive v dvojni kulturi rasteta počasi in po 10 dneh ne pride do neposredne interakcije. Tako na sliki 1, kot tudi na sliki 2 se kaže boljša rast antagonista iz pripravka Trifender (TRI) pri nižji temperaturi v primerjavi z istim sevom iz pripravka Pannon Starter Perfect Pro (PSP). Rast *T. asperellum* (TRI) je ob prisotnosti patogena pri 15 °C celo hitrejša v primerjavi s kontrolo, na kar lahko vplivajo tudi hlapni metaboliti glive *F. oxysporum* (izolat iz ciklame).



Slika 1: Prirast izolatov patogena *F. oxysporum* in agensa *T. asperellum* v kontrolnih obravnavanjih in v dvojnih kulturah pri 15 in 25 °C po 10 dneh.

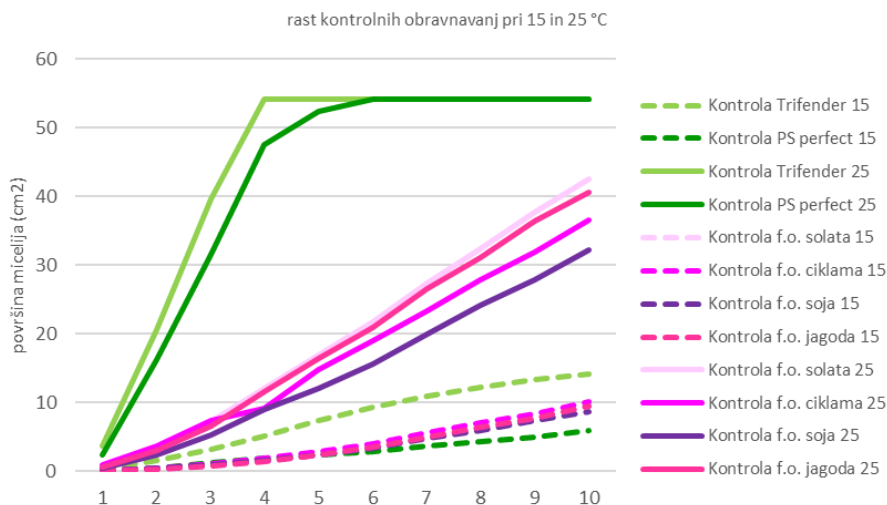
Pri 25 °C pa izolata glive *T. asperellum* močno vplivata na rast micelija patogena *Fusarium oxysporum* (slika 1). Do stika micelija obeh gliv v dvojnih kulturah pride že po štirih dneh, ko *T. asperellum* zaustavi rast fuzariuma in ga pozneje tudi preraste. Višja temperatura godi tudi izolatom patogena, kar se vidi na sliki 2 pri kontrolnih obravnavanjih fuzariuma (izolat iz solate preraste nad 40 cm² površine).

Preglednica 1: Prirast micelija (cm²) in inhibicija rasti patogena ter antagonista po 10. dneh pri 15 in 25 °C in po 3 dneh pri 25 °C (sivo obarvano).

	Prirast 10 dni 15°C	inh 10 dni 15°C	Prirast 10 dni 25°C	inh 10 dni 25°C	Prirast 3 dni 25°C	inh 3 dni 25°C
Kontrola f.o. solata 15	9,684	0,00	42,432	0,00	7,21	0,00
f.o. solata vs TRI 15	7,258	25,05	8,114	80,88	6,47	10,34
f.o. solata vs PSP 15	3,154	67,43	9,97	76,50	6,87	4,80
Kontrola f.o. ciklama 15	10,056	0,00	36,586	0,00	7,34	0,00
f.o. ciklama vs TRI 15	10,226	-1,69	8,414	77,00	6,59	10,22
f.o. ciklama vs PSP 15	9,332	7,20	11,284	69,16	7,76	-5,69
Kontrola f.o. soja 15	8,566	0,00	32,164	0,00	5,31	0,00
f.o. soja vs TRI 15	8,99	-4,95	8,18	74,57	6,48	-22,20
f.o. soja vs PSP 15	8,996	-5,02	10,944	65,97	7,29	-37,39
Kontrola f.o. jagoda 15	9,458	0,00	40,614	0,00	6,57	0,00
f.o. jagoda vs TRI 15	8,432	10,85	7,758	80,90	5,64	14,10
f.o. jagoda vs PSP 15	8,432	10,85	10,77	73,48	6,74	-2,65
Kontrola Trifender 15	14,142	0,00	54,184	0,00	39,58	0,00
Kontrola PS perfect 15	5,9215	0,00	54,184	0,00	31,50	0,00
TRI vs f.o. solata 15	15,03	-6,28	45,696	15,67	36,96	6,62
PSP vs f.o. solata 15	8,41	-42,02	44,196	18,43	31,69	-0,60
TRI vs f.o. ciklama 15	18,47	-30,60	45,15	16,67	36,17	8,61
PSP vs f.o. ciklama 15	4,216	28,80	42,364	21,81	29,77	5,49
TRI vs f.o. soja 15	14,498	-2,52	45,248	16,49	35,48	10,35
PSP vs f.o. soja 15	3,11	47,48	42,256	22,01	30,11	4,41
TRI vs f.o. jagoda 15	14,458	-2,23	45,256	16,48	36,38	8,09
PSP vs f.o. jagoda 15	3,424	42,18	42,472	21,62	28,57	9,31

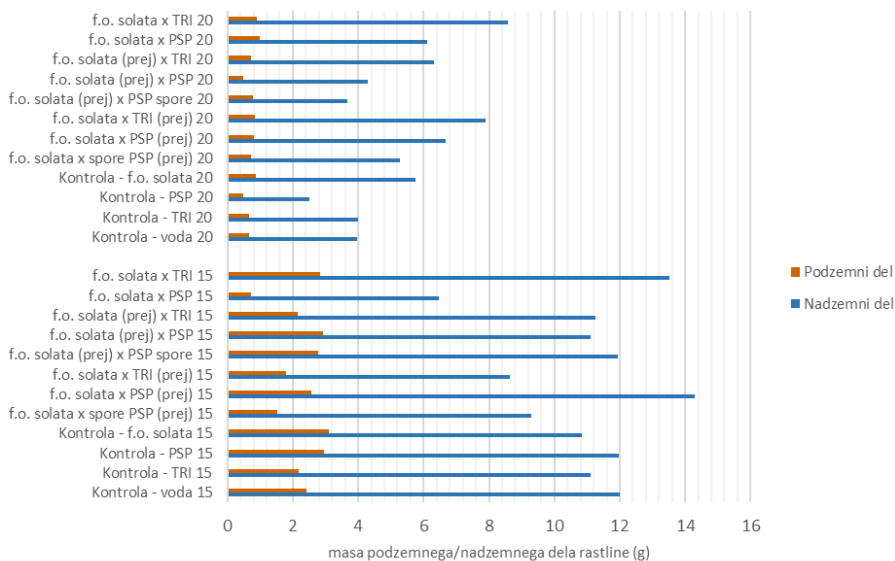
V preglednici 1 je prikazan prirast micelija po 10 dneh v kontrolnih obravnavanjih in v dvojnih kulturah. Pri 15 °C večjih odstopanj ni bilo zaradi zelo počasne rasti gliv, zanimiva pa je močna inhibicija rasti *T. asperellum* iz pripravka PSP v dvojni kulturi

pri treh izolatih patogena (iz ciklame, soje in jagode), pri izolatu iz solate bila rast micelija celo boljša kot v kontroli. Pri 25 °C je inhibicija rasti micelija patogena primerljiva z rezultati v raziskavi Altinok in Erdogan (2015), kjer so preučevali vpliv vrste *T. harzianum* na 4 izolate patogena *F. oxysporum* in je inhibicija rasti segala od 48,20 do 72,69 %, v naši raziskavi pa so bile vrednosti med 65,97 in 80,90 %. Zanimivi so tudi rezultati po 3 dneh sobivanja obeh gliv v isti petrijevki, kjer prisotnost drugih gliv (ko še ni neposrednega stika med njima) lahko vpliva na boljše ali slabšo rast druge glive, na kar lahko vplivajo tudi hlapni metaboliti obeh prisotnih gliv.



Slika 2: Desetdnevna rast agensa *T. asperellum* in patogena *F. oxysporum* v kontrolnih obravnavanjih pri temperaturah 15 in 25 °C.

V lončnem poskusu so sadike solate bolje rastle pri nižji temperaturi (15 °C), vendar razlik v rasti nadzemnega in podzemnega dela rastlin ne moremo pripisati vplivu patogena, antagonista ali kombinaciji obeh v primerjavi s kontrolami, saj so si podatki nasprotujoči. Tako je bil največji prirast nadzemnega dela pri 15 °C v obravnavanju, kjer smo pripravek PSP dodali teden dni prej kot patogena, najslabši pa je bil ob hkrati aplikaciji patogena in pripravka PSP. Pri 20 °C pa so sadike bolje rastle v kombinaciji dodanih gliv (patogen +antagonist) v primerjavi s kontrolnimi obravnavanji.



500

Številne predhodne raziskave so pokazale velik potencial gliv *Trichoderma* spp. za uporabo proti talnim patogenom, kot so bela zrnata gniloba (Hadad in sod., 2017; Smith *et al.*, 2013; Tančić *et al.*, 2013; Smolińska *et al.*, 2016), bela gniloba solate, bela gniloba čebulnic (Ethur *et al.*, 2005; Hernandez Castillo *et al.*, 2011), padavica sadik (Le *et al.* 2003; Abdelzاهر 2004), ogljena trohnoba soje (Khan in Gupta 1998) in bela noga krompirja (Lewis *et al.* 1998). V naši raziskavi se je pokazal močan vpliv antagonista na patogena pri višji temperaturi, kjer *T. asperellum* hitro doseže kulturo patogena in jo sčasoma tudi preraste, s tem pa ustavi rast patogena in ga lahko tudi parazitira.

Priporoča se uporaba pripravkov na podlagi antagonistične glive *T. asperellum* v fazi pred presajanjem sadik na prosto (uporaba proti talnim patogenom). Poleg namakanja sadik, se ga lahko aplicira tudi neposredno ob setvi ali se ga plitko vdela v tla. Ob slednjem je dobro upoštevati, da gliva, glede na rezultate raziskave, najbolje raste in negativno vpliva na patogene (in tudi ostale) glive pri višji temperaturi (25 °C), pri pripravku Trifender lahko tudi pri nižjih temperaturah (15 °C). Tako zagotovimo uspešno preraščanje koreninske grude, ki prepreči dostop patogenov do korenin. S tem se izognemo kompeticiji z ostalimi organizmi v tleh in omogočimo najugodnejše razmere za koristne glive.

4 ZAHVALA

Raziskava je bila opravljena v okviru programa strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin, ki ga financira UVHVVR. Zahvaljujemo se podjetju Arbolus d.o.o za vzorce pripravkov Trifender PRO in Pannon Starter Perfect Pro ter Kmetijskemu inštitutu Slovenije za izolate glive *Fusarium oxysporum*.

5 VIRI

- Abdelzaher H. (2004) Occurrence of damping-off of wheat caused by *Pythium tokunaga* in El-Minia, Egypt and its possible control by *Gliocladium roseum* and *Trichoderma harzianum*. Arch Phytopathol Plant Protect, 37: 147–159.
- Altinok H.H., Erdogan O. (2015) Determination of the in vitro effect of *Trichoderma harzianum* on phytopathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 43(2):494–500.
- Ethur L.Z., Blume E., Muniz M., Silva A.C.F. Da., Stefanelo D.R., Rocha E.K. Da. (2005) Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. Fitopatologia Brasileira, v.30, p.127-133. DOI: 10.1590/S0100-41582005000200004.
- Haddad P.E., Leite L.G., Lucon C.M.M., Harakava R. (2017) Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Pesquisa Agropecuária Brasileira 52: 1140-1148. (<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2017001200002>)
- Harman G., Howell C., Viterbo A. et al. (2004) *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E.G. (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158(1):17–25.
- Hernandez Castillo F.D., Berlanga Padilla A.M., Gallegos Morales G., Cepeda Siller M., Rodriguez Herrera R., Aguilar Gonzales C.N., Castilho Reyes F. (2011) In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, v.6, p.410-417, 2011. DOI: 10.3844/ajabssp.2011.410.417
- Howell C.R. (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4-10.
- Husaini A.M., Sakina A., Cambay S. R. (2018) Host–pathogen Interaction In *Fusarium Oxysporum* Infections: Where Do We Stand? Molecular plant-microbe interactions, v. 31 ,9 pp. 889-898. doi: 10.1094/MPMI-12-17-0302-CR
- Iida Y., Ogata A., Kanda H., Nishi O., Sushida H., Higashi Y., Tsuge T. (2022) Biocontrol Activity of Nonpathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*: Colonization on the Root Surface to Overcome Nutritional Competition. Front. Microbiol. 13:826677. doi: 10.3389/fmicb.2022.826677
- Khan M.R., Gupta J. (1998) Antagonistic efficacy of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina* on eggplant. Z. PflKrankh. PflSch, 105(4): 387–393.
- Kumar G., Maharshi A., Patel J., Mukherjee A., Singh H.B., Sarma B.K. (2017) *Trichoderma* : A Potential Fungal Antagonist to Control Plant Diseases. ATSA Mukhapatra - Annual Technical Issue 21, https://www.researchgate.net/publication/314946122_Trichoderma_A_Potential_Fungal_Antagonist_to_Control_Plant_Diseases [accessed May 18 2022].
- Le H.T., Black L.L., Sikora R.A. (2003) Evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol of tomato sudden caused by *Pythium aphanidermatum* following flooding in tropical hot season. Commun Agric Appl Biol Sci, 68: 463–474.
- Lewis J.A., Fravel D.R. (1996) Influence of Pyrex/biomass preparations of biocontrol fungi on snap bean damping-off in the field caused by *Sclerotium rolfsii* and on germination of sclerotia of the pathogen. Plant Dis, 80: 655–659.
- Monte E. (2001) *Understanding Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int. Microbiol. 4:1-4.
- Smith A., Beltrán C.A., Kusunoki M., Cotes A.M., Motohashi K., Kondo T., Deguchi M. (2013) Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Journal of General Plant Pathology, v.79, p.74-85. DOI: 10.1007/s10327-012-0419-1.
- Smolińska U., Kowalska B., Kowalczyk W., Szczech M., Murgrabia A. (2016) Eradication of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia from soil using organic waste materials as *Trichoderma* fungi carriers. Journal of Horticultural Research, v.24, p.101-110. DOI: 10.1515/johr-2016-0012.
- Tančić S., Skrobolja J., Lalošević M., Jevtić R., Vidić, M. (2013) Impact of *Trichoderma* spp. on soybean seed germination and potential antagonistic effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. Pesticidi i Fitomedicina, v.28, p.181-185.