

LABORATORIJSKO PREIZKUŠANJE UČINKOVITOSTI HIPERPARAZITSKE GLIVE *Coniothyrium minitans* W.A. Campb. NA SKLEROCIJIH RAZLIČNIH FITOPATOGENIH GLIV

Franci Aco CELAR¹, Urša PRISLAN², Katarina KOS³

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

IZVLEČEK

V laboratorijskih razmerah smo v dvojnih kulturah preučevali potencialno antagonistično delovanja glive *Coniothyrium minitans*, seva NCAIM 51/2004, proti šestim fitopatogenim glivam: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum*, *Athelia rolfsii*, *Botrytis* sp. in *Macrophomina phaseolina*. Ugotoviti smo hoteli optimalne pogoje za učinkovito antagonistično delovanje te glive s poudarkom na parazitiranju sklerocijev fitopatogenih gliv. V dvojnih kulturah, pri temperaturi 15 °C, prisotnost patogenih gliv ni vplivala na rast antagonistične glive *C. minitans*, medtem ko so pri temperaturah 20 in 25 °C prisotni patogeni vplivali na čas ustavitve rasti hiperparazitske glive *C. minitans*. Obseg parazitiranja sklerocijev fitopatogenih gliv je bil vrstno specifičen, medtem ko je bila hitrost parazitiranja odvisna od temperature. Vrsta *C. minitans* v celoti parazitira sklerocije gliv *S. sclerotiorum* in *S. minor*, medtem ko sklerocije ostalih gliv samo posamično in pri določenih temperaturah (*Botrytis* sp., *S. cepivorum*) ali pa sploh ne (*A. rolfsii*, *M. phaseolina*). Optimalna temperatura za rast in parazitiranje hiperparazitske glive *C. minitans* je bila 20 °C.

Ključne besede: *Coniothyrium minitans*, fitopatogene glive, parazitizem, sklerociji, temperatura, učinkovitost

ABSTRACT

LABORATORY STUDY OF THE EFFICACY OF THE HYPERPARASITIC FUNGUS *Coniothyrium minitans* W.A. Campb. ON SCLEROTIA OF VARIOUS PHYTOPATHOGENIC FUNGI

The potential antagonistic activity of the fungus *Coniothyrium minitans*, strain NCAIM 51/2004, against six phytopathogenic fungi: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum*, *Athelia rolfsii*, *Botrytis* sp. and *Macrophomina phaseolina* was studied in double cultures under laboratory conditions. We aimed to determine the optimal conditions for the effective antagonistic action of this fungus with emphasis on parasitizing sclerotia of phytopathogenic fungi. In dual cultures, at 15°C, the presence of pathogenic fungi did not affect the growth of the antagonistic fungus *C. minitans*, while

¹ izr. prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

² mag. inž. hort., prav tam

³ doc. dr., prav tam

at 20°C and 25°C, the presence of pathogens affected the time of cessation of growth of the hyperparasitic fungus *C. minitans*. The extent of parasitization of sclerotia by phytopathogenic fungi was species specific, while the rate of parasitization was temperature dependent. *C. minitans* completely parasitized the sclerotia of *S. sclerotiorum* and *S. minor*, whereas the sclerotia of other fungi were parasitized only singly and at certain temperatures (*Botrytis* sp., *S. cepivorum*) or not at all (*A. rolfsii*, *M. phaseolina*). The optimal temperature for growth and parasitism of the hyperparasitic fungus *C. minitans* was 20°C.

Key words: *Coniothyrium minitans*, efficiency, parasitism, phytopathogenic fungi, sclerotia, temperature

1 UVOD

Fitotogene glive, ki tvorijo sklerocije, predstavljajo za pridelovalce gojenih rastlinskih vrst veliko težavo, ker lahko s sklerociji preživijo zelo neugodne okoljske razmere, zlasti zimo. Sklerociji so glivne preživetvene strukture, gosti kompaktni spleti hif, v notranjosti katerih so shranjene zaloge hrane. Pri nekaterih patogenih glivah so sklerociji edini vir kužila v naslednji rastni dobi. Poleg tega, da se večinoma ohranjajo v tleh, so tudi izredno trdoživi in jih tudi s fitofarmaceutskimi sredstvi ne moremo uničiti. Gospodarsko pomembnejše vrste patogenih gliv, ki tvorijo sklerocije in se pojavljajo tudi na naših pridelovalnih zemljiščih, spadajo v rodove *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Macrophomina* in *Athelia*.

Zaradi neučinkovitega kemičnega načina varstva rastlin pred to skupino patogenov so se v zadnjem času raziskave usmerile predvsem v možnosti biotičnega zatiranja le teh. Kot najbolj obetajoč biotični agens se kaže antagonistična gliva *Coniothyrium minitans*. Gliva je hiperparazit, ki se hrani s sklerociji patogenih gliv v tleh, zaradi česar jo uvrščamo med koristne organizme z velikim potencialom v varstvu proti tovrstnim patogenom.

Parazitsko glivo *C. minitans* je iz parazitiranih sklerocijev glive *S. sclerotiorum* prvič izoliral Campbell (1947), ki je na podlagi svojih poskusov opozoril na njen velik potencial v biotičnem varstvu rastlin. V naravi se pojavlja predvsem v sklerocijih gliv *S. sclerotiorum* in *S. trifoliorum*, vendar je sposobna parazitirati tudi sklerocije vrst gliv iz rodov *Sclerotinia* in *Sclerotium* (Whipps in Gerlagh, 1992).

Sposobnost parazitiranja sklerocijev je ključna lastnost, da je gliva uporabna v biotičnem varstvu rastlin. Kot je značilno za mnoge biotične agense za varstvo rastlin, je uspešnost parazitiranja patogena odvisna od različnih okoljskih in biotičnih dejavnikov. Temperatura pomembno vpliva na rast in razvoj glive *C. minitans*. V laboratorijskih poskusih je bilo ugotovljeno, da temperature višje od 25 °C povzročijo neaktivnost glive *C. minitans* (Whipps *et al.*, 2008). Zeng *et al.* (2012) so ugotovili, da gliva najbolje raste pri 20 °C, potem pa se rast postopoma zmanjšuje z višanjem oziroma nižanjem temperature.

Hiperparazitska gliva *C. minitans* prodira v sklerocije neposredno skozi njihovo zunanjo pigmentirano skorjo ali prek obstoječih razpok, ki se pojavijo na njihovem površju. Potem z rastjo nadaljuje v medcelični in znotrajcelični prostor sklerocijskega

tkiva. V okuženih celicah se začnejo najprej kazati znaki plazmolize, agregacije in vakuolizacije, nato pa začnejo celične stene sklerocijev postopoma propadati (Whipps in Gerlagh, 1992). Prodor glive *C. minitans* v celice omogoča tvorba širokega nabora encimov, ki pospešujejo kolonizacijo in razgradnjo sklerocijev (Zeng *et al.* 2012).

Namen raziskave je bil ugotoviti učinkovitost glive *C. minitans* za zatiranje sklerocijev šestih izbranih patogenih gliv: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Sclerotinia minor* Jagger., *Sclerotium cepivorum* Berk., *Athelia rolfsii* /Curzi/ C.C. Tu & Kimbr., *Botrytis* sp. Pers., in *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. v laboratorijskih pogojih.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Izolati gliv in testiranje v dvojnih kulturah

Monosporni izolat hiperparazitske glive *C. minitans* (sev NCAIM 51/2004) smo s pomočjo standardne metode redčenja pridobili iz komercialnega pripravka Őko-ni[®]-WP. Pripravek pri nas ni registriran kot fitofarmaceutsko sredstvo, ampak kot mikrobiološki pospeševalec rasti in je dovoljen v ekološki pridelavi (Arbolus, 2019). Patogene glive *M. phaseolina*, *Botrytis* sp., *S. cepivorum* in *S. minor* so bile iz zbirke Kmetijskega inštituta Slovenije. Gliva *S. sclerotiorum* je bila izolirana iz solate na Biotehniški fakulteti leta 2013, gliva *A. rolfsii* pa je bila izolirana iz paradižnika leta 2018.

Vse patogene in parazitska gliva so bile namnožene na polovičnem trdnem PDA gojišču (½ PDA + ½ tehničnega agarja; Biolife) pri 20 °C. Poskus je bil izveden v laboratoriju Katedre za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo, na Oddelku za Agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

V prvem delu raziskave smo ugotavljali optimalno temperaturo za rast in razvoj izolata antagonistične glive *C. minitans*. Glivo smo gojili na polovičnem PDA gojišču pri treh različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C) in 60 % relativni zračni vlagi.

V naslednjem poskusu smo preučevali tekmovalno sposobnost antagonistične glive *Coniothyrium minitans* napram izbranim fitopatogenim glivam pri treh različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C). Ugotoviti smo hoteli, ali tekmovanje za prostor in hrano vpliva na antagonistično učinkovitost te glive. Po metodi dvojnih kultur smo jo na polovičnem PDA gojišču izpostavili šestim izbranim patogenim glivam. Na eni strani petrijevke s premerom 9 cm, je bil inokuliran košček patogene glive, na drugi strani pa košček hiperparazitske glive *C. minitans*. Sedem dni stare kulture gliv (patogenih in *C. minitans*) smo nacepili 1 cm od levega in desnega roba petrijevke. Vsi inokulirani koščki gliv so bili enake velikosti, narejeni s plutovtrom premera 4 mm. Medsebojna razdalja med inokuliranimi koščki je bila v vseh ponovitvah enaka, saj so bile petrijevke postavljene na milimetrski papir z označenimi točkami za inokulacijo. Vsako obravnavanje smo izvedli v 4 ponovitvah, ravno tako kontrolno, kjer je bila na gojišče nacepljena le gliva *C. minitans*.

Vsak dan smo izmerili površino micelija glive *C. minitans* in ocenili njeno sposobnost parazitiranja micelija posameznih patogenih gliv. Deset dni zaporedoma smo dnevno označevali površino zraslega micelija. Po končanem poskusu smo petrijevke skenirali in slike obdelali s programom NIS Elements BR.

2.2 Inokulacija in ocenjevanje parazitiranja sklerocijev

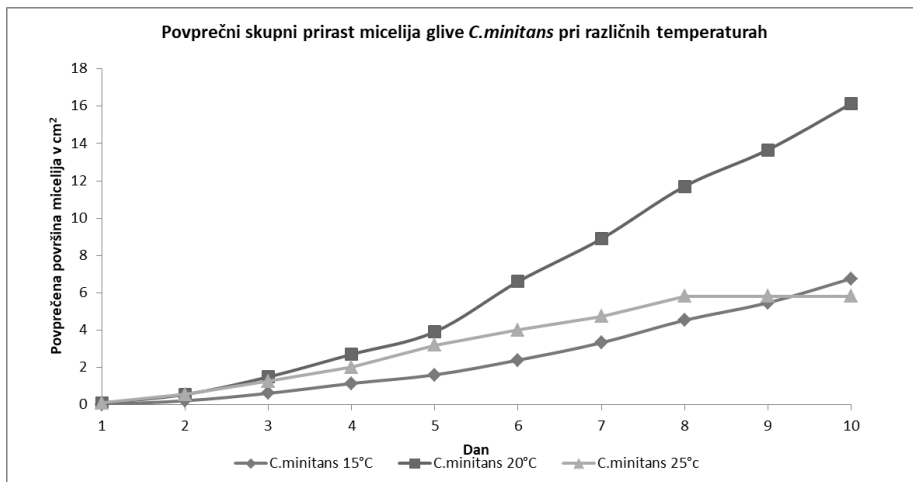
Sklerociji, ki so jih tvorili patogeni v prvem delu poskusa, so bili tretirani s suspenzijo konidijev (piknospor) glive *C. minitans*. V vsako petrijevko je bil položen listič, ki je bil prelit z 10 ml sterilne destilirane vode, na listič je bil položen vlažen zobni tampon (Tosama). Na vlažen listič je bilo v vsako petrijevko danih po 5 sklerocijev patogena in vsak sklerocij je bil prelit z 1 μ l suspenzije, ki je vsebovala spore glive *C. minitans*. Ves material, ki je bil uporabljen za postavitve poskusa je bil sterilen (lističi, tamponi, nastavki za pipete, destilirana voda itd. so bili avtoklavirani), da ne bi prišlo do morebitnih nenamernih kontaminacij. Spore parazitske glive so bile pridobljene iz okuženih sklerocijev glive *S. sclerotiorum* iz prvega dela poskusa ter bile dane v destilirano vodo. S pomočjo hemocitometra je bilo preštetno število spor v 1 μ l suspenzije. Povprečno število spor glive *C. minitans* v 1 μ l vodne suspenzije je bilo 32 ($3,2 \times 10^3$ /ml).

Za vsako patogeno glivo so bile izvedene štiri ponovitve inokulacije sklerocijev (skupaj 20 sklerocijev) pri treh različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C). Šest tednov zapored so bili sklerociji enkrat na teden pregledani. Ocenili smo znamenja okužbe oziroma parazitiranja, ki bi jih povzročila parazitska gliva *C. minitans* (preglednice 1-3). Ob pregledovanju smo poskrbeli tudi za vlažnost papirja v petrijevkah in če je bilo potrebno, smo tampone v njih dodatno navlažili. Whipps in Gerlagh (1992) sta namreč ugotovila, da je visoka vlaga velikega pomena za normalno parazitsko aktivnost glive *C. minitans*.

3 REZULTATI

505

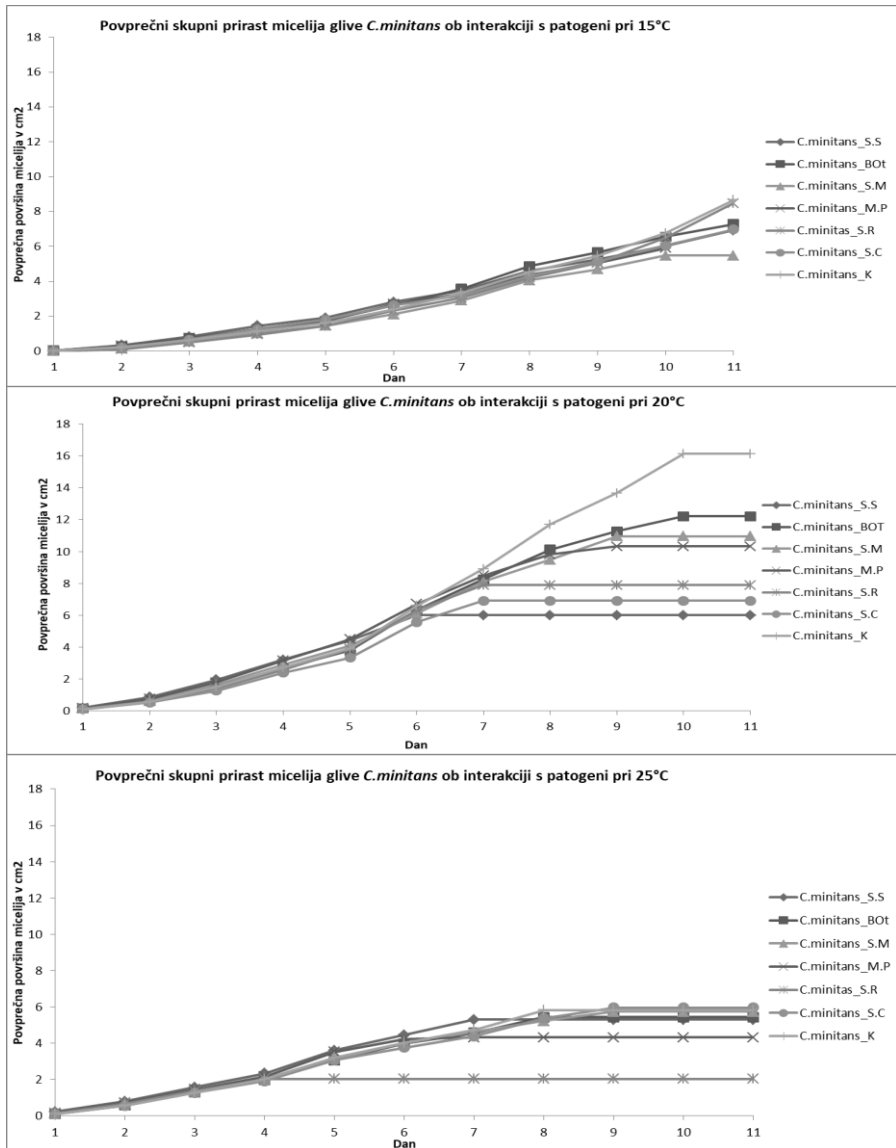
V prvem delu smo ugotavljali optimalno temperaturo za rast in razvoj antagonistične glive *C. minitans*. Gliva je najbolje rasla pri temperaturi 20 °C (slika 1).



Slika 1: Povprečni skupni prirast micelija glive *C. minitans* pri temperaturah 15, 20 in 25 °C.

V poskusu z dvojnimi kulturami, pri temperaturi 15 °C, prisotnost patogenih gliv ni imela vpliva na rast antagonistične glive *C. minitans*. V primerjavi z rastjo v

kontrolnem obravnavanju ni bilo večjih odstopanj v njeni rasti zaradi prisotnosti patogenov.



Slika 2: Povprečni skupni prirast micelija glive *C. minitans* ob interakciji s patogeni po dnevih pri 15, 20 in 25 °C. (S.S= *S. sclerotium*, BOT= *Botrytis* sp., S.M= *S. minor*, M.P= *M. phaseolina*, S.R= *S. rolfii*, S.C= *S. cepivorum*, K= kontrola).

Pri temperaturah 20 in 25 °C se je pokazal vpliv prisotnosti patogenov na čas ustavitve rasti glive *C. minitans* (slika 2). Čas, po katerem je gliva *C. minitans* prenehala rasti, je odvisen predvsem od intenzivnosti rasti posamezne vrste patogene glive, ki je rasla v dvojni kulturi z njo. Iz spodnjih grafov je to razvidno po tem, ko se rastna krivulja glive *C. minitans* popolnoma izravna.

Pri obeh temperaturah, 20 °C in 25 °C, je bila patogena gliva *S. rolfsii* tista, ki je ustavila rast glive *C. minitans* najprej, pri temperaturi 25 °C že četrti dan opazovanja (slika 2). Iz slike so vidne razlike v rasti glive *C. minitans* (kontrolno in ostala obravnavanja) glede na temperaturo inkubacije. Ponovno se je pokazalo, da je tudi v primeru dvojnih kultur optimalna temperatura za njeno rast 20 °C.

Preglednica 1: Parazitiranost sklerocijev patogenih gliv po tednih pri temperaturi 15 °C.

Patogena gliva	1.teden	2.teden	3.teden	4.teden	5.teden	6.teden
<i>S. sclerotiorum</i>	0/20	4/20	11/20	20/20	20/20	20/20
<i>S. minor</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	6/20	20/20
<i>S. rolfsii</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>S. cepivorum</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>M. phaseolina</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>Botrytis</i> sp.	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20

Preglednica 2: Parazitiranost sklerocijev patogenih gliv po tednih pri temperaturi 20 °C.

Patogena gliva	1.teden	2.teden	3.teden	4.teden	5.teden	6.teden
<i>S. sclerotiorum</i>	3/20	10/20	20/20	20/20	20/20	20/20
<i>S. minor</i>	0/20	0/20	3/20	12/20	20/20	20/20
<i>S. rolfsii</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>S. cepivorum</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	3/20
<i>M. phaseolina</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>Botrytis</i> sp.	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

Preglednica 3: Parazitiranost sklerocijev patogenih gliv po tednih pri temperaturi 25 °C.

Patogena gliva	1.teden	2.teden	3.teden	4.teden	5.teden	6.teden
<i>S. sclerotiorum</i>	0/20	5/20	14/20	20/20	20/20	20/20
<i>S. minor</i>	0/20	0/20	0/20	9/20	15/20	20/20
<i>S. rolfsii</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>S. cepivorum</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	2/20
<i>M. phaseolina</i>	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
<i>Botrytis</i> sp.	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

Obseg parazitiranja sklerocijev fitopatogenih gliv je bil vrstno specifičen, medtem ko je bila hitrost parazitiranja odvisna od temperature (preglednice 1-3). *C. minitans* v celoti parazitira sklerocije gliv *S. sclerotiorum* in *S. minor*, medtem ko sklerocije ostalih gliv samo posamično in pri določenih temperaturah (*Botrytis* sp., *S. cepivorum*) ali pa sploh ne (*A. rolfsii*, *M. phaseolina*). Optimalna temperatura za rast in parazitiranje hiperparazitske glive *C. minitans* je bila 20 °C.

4 SKLEPI

Optimalna temperatura za rast in parazitiranje sklerocijev patogenih gliv s strani hiperparazitske glive *C. minitans* je bila 20 °C. Obseg parazitiranja sklerocijev fitopatogenih gliv je bil vrstno specifičen, medtem ko je bila hitrost parazitiranja odvisna od temperature. *C. minitans* v celoti parazitira sklerocije gliv *S. sclerotiorum* in *S. minor*, medtem ko sklerocije ostalih gliv samo posamično in pri določenih temperaturah (*Botrytis* sp., *S. cepivorum*) ali pa sploh ne (*A. rolfsii*, *M. phaseolina*). Glede na rezultate laboratorijskih poskusov je hiperparazitska gliva *C. minitans* (sev NCAIM 51/2004) učinkovit biotični agens za parazitiranje in uničevanje sklerocijev gliv *Sclerotinia sclerotiorum* in *Sclerotinia minor*, medtem ko je bila učinkovitost proti sklerocijem ostali preučevanih gliv minimalna ali celo nikakršna.

5 ZAHVALA

Raziskava je opravljena v okviru programa strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin, ki ga financira MKGP, UVHVVR. Zahvaljujemo se podjetju Arbolus d.o.o za vzorec pripravka Őko-ni@-WP ter Kmetijskemu inštitutu Slovenije, Oddeleku za varstvo rastlin, za izolate fitopatogenih gliv.

6 LITERATURA

- Arbolus. 2019. <http://arbolus.si/izdelek/oko-ni-wp/> (junij, 2019)
- Campbell, W.A. 1947. A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. *Mycologia* 39, 190-195.
- Whipps J.M., Gerlagh M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological research* 96(11):897-907.
- Whipps J.M., Sreenivasaprasad S., Muthumeenakshi S., Rogers C.W., Challen M.P. 2008. Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. *European journal plant pathology*, 121:323-330.
- Zeng, W., Wang, D., Kirk W., Hao, J. 2012. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological control*, 60:225-232.