

ENTOMOPATOGENE GLIVE V SLOVENSkih TLEH

Katarina KOS¹, Jernej JAKŠE², Franci Aco CELAR³

¹⁻³Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

IZVLEČEK

V letih 2015-2017 smo na celotnem območju Slovenije vzorčili tla na zemljiščih z različno namensko rabo. Vzorčili smo na 81 lokacijah in izolirali prek 460 izolatov potencialno entomopatogenih gliv. S pomočjo molekulskih analiz smo določili 27 vrst potencialno entomopatogenih (iz rodov *Beauveria*, *Clonostachys*, *Cordyceps*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metacordyceps*, *Metarhizium*, *Ophiocordyceps*, *Pochonia*, *Simplicillium* ter *Torrubiella*), antagonističnih (iz rodov *Clonostachys*, *Mucor* in *Simplicillium*) in nematopatogenih vrst gliv (iz rodov *Cunninghamella*, *Lecanicillium*, *Metacordyceps*, *Paecilomyces*, *Pochonia* ter *Purpureocillium*).

Ključne besede: entomopatogene glive, tla, Slovenija

ABSTRACT

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN SLOVENE SOIL

In years 2015-2017 samples of the soil of different usage were taken throughout Slovenia. Samples were taken in 81 locations and over 460 isolates of potentially entomopathogenic fungi were found. Molecular analyzes showed that there are 27 species of potentially entomopathogenic (from genera *Beauveria*, *Clonostachys*, *Cordyceps*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Metacordyceps*, *Metarhizium*, *Ophiocordyceps*, *Pochonia*, *Simplicillium* and *Torrubiella*), antagonistic (*Clonostachys*, *Mucor* and *Simplicillium*) and nematopathogenic fungi (*Cunninghamella*, *Lecanicillium*, *Metacordyceps*, *Paecilomyces*, *Pochonia* and *Purpureocillium*).

Key words: entomopathogenic fungi, soil, Slovenia

1 UVOD

Tla predstavljajo pomemben rezervoar za entomopatogene glive, ki imajo pomembno vlogo pri omejevanju populacij členonožcev v tleh. Ocenjuje se, da je skoraj 90 % vrst škodljivih členonožcev v svojem razvoju vsaj delno vezanih na talni habitat (Hajek, 2010). Določene specifične vrste iz reda Hypocreales so sposobne ustvariti interakcijo s koreninskim sistemom rastlin, kar bi omogočilo preživetje teh vrst tudi brez žuželčjega gostitelja (Hu in St. Leger, 2002; Klingen in sod., 2015). Podatki o lokalnih

¹ doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000, Ljubljana, e-pošta: katarina.kos@bf.uni-lj.si

² izr. prof. dr., prav tam

³ izr. prof. dr., prav tam

izolatih entomopatogenih gliv, njihova raznovrstnost in razširjenost na določenem območju nam lahko pomagajo pri varstvu rastlin proti škodljivcem v agroekosistemih (Meyling in Eilenberg, 2006). Na svetu je znanih okoli 90 rodov in 700 vrst entomopatogenih gliv, nekje 400 le-teh ima širok nabor gostiteljev (Charnley in Collins, 2007; Oliveira in sod., 2012; Onofre in sod., 2001). Entomopatogene glive imajo velik potencial v biotičnem varstvu rastlin in v zadnjem desetletju je bilo razvitih okoli 170 formulacij na podlagi vsaj 12 vrst teh gliv oziroma njihovih sekundarnih metabolitov, večinoma iz vrst *B. bassiana* (33,9 %), *M. anisopliae* (33,9 %), *Isaria fumosorosea* in *B. brongniartii* (Faria in Wraight, 2007).

V raziskavi smo želeli določiti vrstno pestrost domorodnih entomopatogenih in drugih potencialno koristnih gliv (antagonisti in nematopatogeni), ki bi se lahko uporabljali pri biotičnem varstvu rastlin.

2 MATERIALI IN METODE

V raziskavi smo vzorčili tla na različnih pridelovalnih zemljiščih po celi Sloveniji v obdobju od leta 2015 do 2017. Odvzetih je bilo 81 vzorcev tal (14 na območju Severne Primorske in Notranjske, 11 na Štajerskem, 12 v Slovenski Istri, 12 na Gorenjskem in Osrednji Sloveniji, 12 v Prekmurju, 10 na Dolenjskem in 10 v Beli Krajini) z različno rabo tal (trajni nasadi, njive s poljščinami, njive in vrtovi z vrtninami, travniki in gozd). Vzorčenje je potekalo v aprilu in maju s pomočjo talne sonde do globine 10 cm. Vzorce smo 1–2 dni hranili na sobni temperaturi (20–25 °C), jih presejali skozi 2-milimetrsko sito, homogenizirali in jih shranili v hladilniku pri 4 °C.

481



Slika 1: Lokacije odvzema vzorcev tal v letih 2015-2017 z različno namensko rabo tal.

Po tri podvzorce po 10 g iz vsakega homogeniziranega vzorca smo dali v 100-mililitrske erlenmajerice s širokim vratom. Dodali smo 40 ml raztopine Tween 80 (0,1 % (v/v)) v vsako erlenmajerico in jih prestavili v vodno kopel na 25 °C za 30 min, nato pa še v ultrasonično kopel za 30 sekund. Po 4 agarne plošče s selektivnim gojiščem (Sauboraud – 2 % glukozni agar + antibiotiki in dodin) smo inokulirali s 50 µl pripravljene suspenzije in jo razmazali z Drigalski spatulo. Nacepljene agarne plošče smo inkubirali na 25 °C pri 60 % r.z.v., dokler kolonije niso bile vidne. Nato smo izolirali zrasle glive na posamezne agarne plošče, jih večkrat precepili, da smo dobili čiste kulture in primerjalno odbrali izolate za molekulske analize. Dobili smo 460 izolatov, od katerih smo na 193 izolatih opravili genetske analize na rRNA regijah ITS1, ITS2 in ITS4.

3 REZULTATI

Najbolj splošno razširjeni vrsti v Sloveniji sta *Tolypocladium japonicum* in *Metacordyceps chlamydosporia*, kateri smo našli v vseh regijah in v tleh z različno rabo tal (trajni nasadi, njive s poljščinami, njive z vrtninami, travniki), sledijo glive *Purpureocillium lilacinum*, *Metarhizium anisopliae* in *M. robertsii*, pogosti sta tudi vrsti *M. brunneum* ter *Clonostachys rosea*. Glede na rabo tal, so bili z entomopatogenimi glivami vrstno najbolj pestri trajni nasadi (17 vrst) in travniki (17 vrst), sledijo njive s poljščinami (12 vrst) in njive z vrtninami (9 vrst).

482

Preglednica 1: Seznam najdenih vrst gliv v tleh s potencialnim entomopatogenim/nematopatogenim/antagonističnim delovanjem.

| vrsta | potencialni | sistematika | leto vzorčenja |
|--|------------------------------|---|---------------------|
| <i>Clonostachys rosea</i> (Link) | antagonist, entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Bionectriaceae | 2015, 2017 |
| <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2015, 2017 |
| <i>Beauveria brongniartii</i> (Sacc.) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2015 |
| <i>Tolypocladium japonicum</i> = sin. <i>Cordyceps japonica</i> (Lloyd) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2015, 2016, 2017 |
| <i>Cordyceps</i> (sin. <i>Isaria</i>) <i>farinosa</i> (Holmsk.) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2017 |
| <i>Cordyceps</i> (sin. <i>Isaria</i>) <i>fumosorosea</i> (Holmsk.) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2017 |

| | | | |
|---|---------------------------------|---|---------------------|
| <i>Lecanicillium aphanocladii</i> Zare & W. Gams | antagonist, entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2017 |
| <i>Lecanicillium psalliotae</i> (Treschew) | nematopatogen, entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2017 |
| <i>Ophiocordyceps nutans</i> = <i>sin.</i> <i>Cordyceps nutans</i> (Pat.) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2017 |
| <i>Simplicillium lamellicola</i> (F.E.V. Sm.) | antagonist in entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2015 |
| <i>Torrubiella</i> sp. | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Cordycipitaceae | 2015 |
| <i>Metacordyceps brittlebanksoides</i> (Zuo Y. Liu, Z.Q. Liang, Whalley, Y.J. Yao & A.Y. Liu) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2016 |
| <i>Metacordyceps chlamydosporia</i> = <i>Pochonia chlamydosporia</i> (H.C. Evans) | nematopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2015, 2016, 2017 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2015, 2016, 2017 |
| <i>Metarhizium brunneum</i> Petch | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2016, 2017 |
| <i>Metarhizium carneum</i> = <i>Paecilomyces</i> <i>carneus</i> (Duché & R. Heim) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2017 |
| <i>Metarhizium pinghaense</i> = <i>M. anisopliae</i> * | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2017 |
| <i>Metarhizium robertsii</i> J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2015, 2016, 2017 |
| <i>Metarhizium guizhouense</i> = <i>M.</i> <i>anisopliae</i> * | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2015, 2017 |
| <i>Metarhizium</i> = <i>sin. Paecilomyces</i> <i>marquandii</i> (Masse) | nematopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2017 |
| <i>Metapochonia</i> (<i>sin. Pochonia</i>) <i>bulbillosa</i> (W. Gams & Malla) | nematopatogen, antagonist | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2015 |
| <i>Metapochonia</i> (<i>sin. Pochonia</i>) <i>suchlasporia</i> (W. Gams & Dackman) | nematopatogen, entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Clavicipitaceae | 2016 |

| | | | |
|---|---------------------------------|--|---------------------|
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> = <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) | nematopatogen, entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Ophiocordycipitaceae | 2015, 2016, 2017 |
| <i>Purpureocillium lavenderum</i> Perdomo, Dania García, Gené, Cano & Guarro | nematopatogen, entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Ophiocordycipitaceae | 2016 |
| <i>Ophiocordyceps heteropoda</i> (Kobayasi) | entomopatogen | Fungi, Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocreales, Ophiocordycipitaceae | 2016 |
| <i>Cunninghamella elegans</i> Lendn. | nematopatogen | Fungi, Zygomycota, Mucoromycetes, Mucorales, Cunninghamellaceae | 2017 |
| <i>Mucor hiemalis</i> Wehmer | antagonist | Fungi, Zygomycota, Mucoromycetes, Mucorales, Mucoraceae | 2015 |

* preimenovano v *M. anisopliae*

Največ izolatov smo dobili iz vzorcev tal na njivah s poljščinami (39 %), sledili so trajni nasadi (36 %), travniki (17 %) in njive z vrtninami (7,6 %), medtem ko smo imeli le 2 izolata iz vzorca gozda (0,4 %).

484

4 SKLEPI

Entomopatogene glive so bile zastopane praktično v vseh tleh, ne glede na rabo tal ali lokacijo. Največkrat zastopane glive v slovenskih tleh so bile vrste iz rodov *Metarhizium*, *Metacordyceps* in *Purpureocillium*, ki so se pojavljale v večini vzorcev s kmetijskih zemljišč. Zanimivo je, da se gliva *B. bassiana* ni pojavila v vzorcih iz travnikov, trajnih nasadov in vrtnin, temveč le na njivah s poljščinami.

5 ZAHVALA

Raziskava je opravljena v okviru programa strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin, ki ga financira UVHVVR.

6 VIRI

- Charnley, A. K. in Collins, S. A. 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. IV: C. P. Kubicek, & I. S. Druzhinina (Eds.), *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships (2nd edition)*. Springer. 159-187.
- Faria, M.R. in Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types. *Biological Control*, 43(3): 237-256.
- Hajek A.E., Delalibera I. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* 55 (1): 147-158.
- Hu G., St Leger R.J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microbiol.* 68(12): 6383-7.

- Klingen I., Westrum K., Meyling N.V. 2015. Effect of Norwegian entomopathogenic fungal isolates against *Otiorhynchus sulcatus* larvae at low temperatures and persistence in strawberry rhizospheres. *BioControl* 81: 1-7.
- Meyling N. V. in Eilenberg J. 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113: 336-341.
- Oliveira I., Pereira J.A., Lino-Neto T., Bento A., Baptista P. 2012. Fungal diversity associated to the olive moth, *Prays oleae* Bernard: a survey for potential entomopathogenic fungi. *Microb Ecol.* 63(4): 964-974.
- Onofre S.B., Miniuk C.M., de Barros N.M., Azevedo J.L. 2001. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am J Vet Res.* 62(9): 1478-80.