

**LABORATORIJSKO PREIZKUŠANJE UČINKOVITOSTI
ANTAGONISTIČNIH GLIV *Trichoderma* spp. NA POVZROČITELJE
VERTICILIJESKE UVELOSTI RASTLIN (*Verticillium* spp.)**

Franci Aco CELAR¹, Rok VEBER², Katarina KOS³

^{1,3} Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
² KGZS, Kmetijsko gozdarski zavod Maribor, Oddelek za varstvo rastlin

IZVLEČEK

V laboratorijskih poskusih smo s pomočjo metode dvojnih kultur ugotavljali antagonistični potencial nekaterih izolatov različnih vrst gliv *Trichoderma* spp. (*T. atroviride*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. afroharzianum*, *T. gamsii*) proti izolatom dveh vrst fitopatogenih gliv iz rodu *Verticillium* (*V. nonalfalfe* in *V. dahliae*) pri dveh temperaturah (15 in 25 °C). Pri višji temperaturi, 25 °C, je prišlo do antagonističnih interakcij dosti prej kot pri nižji. Med preučevanimi *Trichoderma* spp. je bila ugotovljena velika razlika v njihovem antagonističnem potencialu, vendar je ta odvisen tudi od *Verticillium* vrste oziroma posameznega izolata. Če ugotovitve o odmiranju micelija *Verticillium* spp. povežemo z dobljenimi rezultati inhibicije rasti micelija zaradi delovanja *Trichoderma* spp., sta imeli pri obeh temperaturah in v kombinacijah z vsemi izolati *Verticillium* spp. največji antagonistični potencial glivi *T. afroharzianum* in *T. atroviride*.

Ključne besede: antagonizem, dvojne kulture, *Trichoderma* spp., temperatura, *Verticillium* spp.,

ABSTRACT

**LABORATORY STUDY ON THE EFFICACY OF THE ANTAGONISTIC FUNGI
Trichoderma spp. ON THE PATHOGENS OF VERTICILLIUM WILT OF PLANTS
(*Verticillium* spp.)**

In laboratory experiments, the antagonistic potential of some isolates of different fungal species of *Trichoderma* spp. was determined using the double culture method. (*T. atroviride*, *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. afroharzianum*, *T. gamsii*) against isolates of two species of phytopathogenic fungi of the genus *Verticillium* (*V. nonalfalfe* and *V. dahliae*) at two temperatures (15 and 25 °C). At a higher temperature, 25 °C, antagonistic interactions occurred much earlier than at a lower temperature. Among the *Trichoderma* spp. studied, a large difference in their antagonistic potential was observed, but this also depends on the *Verticillium* species or the individual isolate. If

¹ prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-mail: franc.celar@bf.uni-lj.si

² mag. inž. agr., Vinarska ulica 14, SI-2000 Maribor

³ doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

the findings on mycelial death of *Verticillium* spp. correlate with the results of inhibition of mycelial growth by the action of *Trichoderma* spp., the fungi *T. afroharzianum* and *T. atroviride* had the greatest antagonistic potential at both temperatures and in combination with all isolates of *Verticillium* spp.

Key words: antagonism, dual culture, *Trichoderma* spp., *Verticillium* spp., temperature

1 UVOD

Fitotopagene vrste gliv iz rodu *Verticillium*, predvsem tiste, ki tvorijo mikrosklerocije, predstavljajo za kmetijske pridelovalce veliko težavo. Gre za talne glive, ki prek korenin okužujejo številne gojene in samonikle rastline ter povzročajo taheomikoze. Te se izražajo najprej v uvelosti in v končni fazi v propadu rastlin. Glive *Verticillium* spp. so omnivorni patogeni in zato okužujejo številne poljščine in vrtnine, na katerih povzročajo občutno gospodarsko škodo (Pegg in Brady, 2002; Inderbitzin in Subbarao, 2014; Kowalska, 2021). Po novi sistematiki je zdaj znanih 10 *Verticillium* vrst, ki so uvrščene v rod *Verticillium* senso stricto (Inderbitzin in sod., 2011). Zaradi številnega nabora potencialnih gostiteljev in ker gre za talne glive, ni na voljo neposrednih zatiralnih ukrepov. Med vrstami *Verticillium* spp. po povzročanju gospodarske škode in širokem naboru gostiteljev izstopa gliva *Verticillium dahliae*, medtem ko vrste *V. albo-atrum*, *V. nonalfalfe*, *V. alfalfae*, *V. longisporum*, *V. tricorpus* in *V. zaregamsianum* povzročajo uvelosti na manjšem številu gostiteljskih rastlin (Inderbitzin in Subbarao, 2014). Nekatere lahko s pomočjo mikrosklerocijev preživijo zelo neugodne okoljske razmere, zlasti čez zimo. Sklerociji so glivne preživetvene strukture, gosti kompaktni spleti hif, v notranjosti katerih so shranjene zaloge hrane. Pri nekaterih vrstah 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 kemičnimi fitofarmaceutskimi sredstvi ne moremo uničiti. Spet druge vrste se dolgotrajno ohranjajo v tleh kot saprofiti na okuženih rastlinskih ostankih (Pegg in Brady, 2002).

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 kažejo antagonistične glive iz rodu *Trichoderma* (Ordentlich in sod., 1990; Pegg in Brady, 2002; Carrero-Carrón in sod., 2016; Ogundeji in sod., 2022). Te z različnimi mehanizmi, kot so tekmovanje, antibioza in parazitizem, zmanjšujejo možnost za okužbo oz. obseg okužb pri gojenih rastlinah.

V laboratorijskih poskusih smo s pomočjo metode dvojnih kultur ugotavljali antagonistični potencial nekaterih izolatov različnih *Trichoderma* vrst proti dvema vrstama patogenih gliv iz rodu *Verticillium* (*V. dahliae* in *V. nonalfalfe*).

2 MATERIALI IN METODE

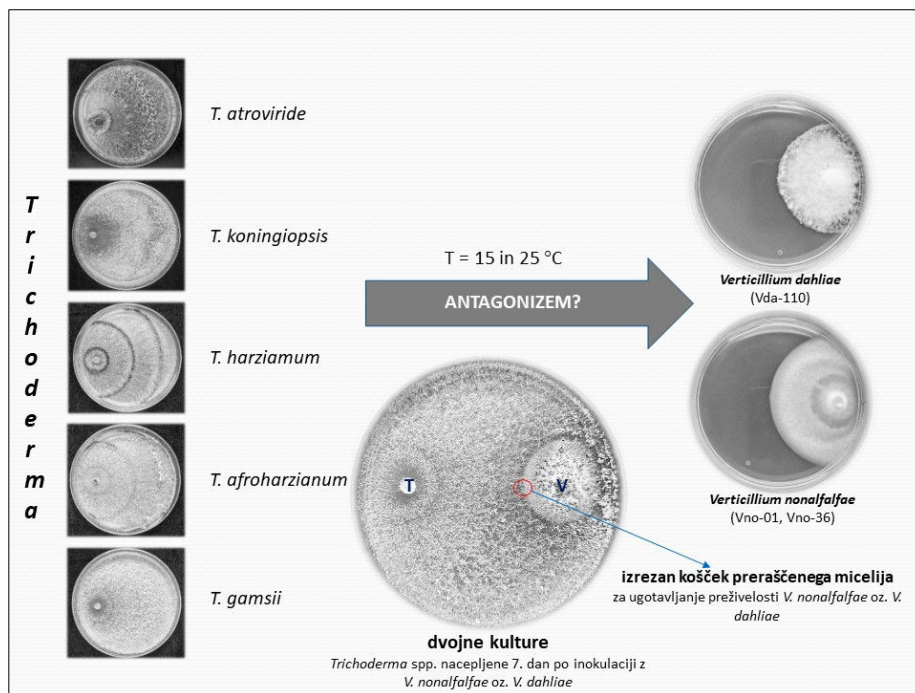
Tekmovanje, antibiozo in mikoparazitizem smo proučevali v petrijevkah s t. i. imenovano metodo dvojnih kultur (standardna metoda) v 9 cm plastičnih petrijevkah na polovičnem PDA gojišču (½ PDA + ½ tehničnega agarja) pri dveh različnih temperaturah (15 in 25 °C). Ugotavljali smo optimalno temperaturo za rast in razvoj antagonističnih gliv

Trichoderma spp. in morebitne interakcije s hifami izolatov patogenih gliv *Verticillium dahliae* in *Verticillium nonalfalfae*, kar smo ovrednotili po dveh ocenjevalnih metodah, A in B (Slika 1).

Različne kombinacije dvojnih kultur smo inkubirali pri dveh različnih temperaturah, potem pa spremljali morebitno zaviranje rasti micelija izolatov *V. dahliae* in *V. nonalfalfae* ter morebitnega parazitiranja le-teh s strani gliv *Trichoderma* spp.

Štirinajst dni po končanem opazovanju rasti, smo pregledali vse petrijevke in ugotavljali, če so glive *Trichoderma* spp. prerasle glive *Verticillium* spp., na selektivnem gojišču pa ugotavljali preživelost slednjih oz. potencialno parazitiranje le-teh s strani *Trichoderma* spp. S sterilnim plutovrtom smo izrezali najbolj roben del micelija *Verticillium* sp., ki je bil najprej prerasel s strani ene od gliv *Trichoderma* spp. in ga prenesli v nove petrijevke s selektivnim gojiščem iz krompirjevega agarja (10 g/l), streptomycin nitrata (0,1 g/l) in 96 % etanola (4,5 ml/l). Vsako obravnavanje smo ponovili v 4 ponovitvah pri temperaturi 15 in 25 °C. Po 17 dneh smo ponovno pogledali petrijevke in vizualno določili ali so v petrijevkah preživele oz. zrasle vrste *Verticillium* spp. ali pa samo antagonistične glive.

705



Slika 1: Shematski prikaz izvedbe poskusa.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V Preglednici 1 je prikazana povprečna inhibicija rasti micelija izolatov gliv *V. nonalfalfae* (Vno-01, Vno-36) in *V. dahliae* (Vda-110) v kombinacijah s posamezno

Trichoderma vrsto pri dveh temperaturah (15 in 25 °C). Inhibicija je izračunana za 14. dan po inokulaciji agarnih plošč (6 dni prej nacepljenih z glivami *Verticillium* spp.) z izolati različnih *Trichoderma* vrst (inhib. K [%]). Zaradi neuniformne rasti *Verticillium* spp. prvih šest dni (pred inokulacijo s *Trichoderma* spp.) smo izračunali tudi indekse priraščanja (Ind. 14/0) te patogene glive od dneva nič (0 – pred nacepitvijo *Trichoderma* spp.) pa do 14 dneva, ko smo zaključili poskus. V preglednicah je tudi podatek, na kateri dan je prišlo do stika med micelijami *Verticillium* spp. in *Trichoderma* spp. Za lažje razumevanje antagonističnih interakcij, ki so se vršile med glivami v dvojnih kulturah, smo v tabele dodali še dodatne razlage le-teh po dveh modificiranih metodah (A in B), ki se standardno uporabljata za laboratorijsko preučevanje antagonističnih mehanizmov med mikroorganizmi (razlaga oznak je pod Preglednico 1).

Preglednica 1: Povprečna inhibicija rasti micelij izolotov gliv *V. nonalfalae* (Vno-01, Vno-36) in *V. dahliae* (Vda-110) v kombinacijah s posamezno *Trichoderma* vrsto pri dveh temperaturah (15 in 25 °C) 14. dan po inokulaciji agarnih plošč s *Trichoderma* spp. (inhib. K [%]), indeksi priraščanja *Verticillium* spp. (Ind. 14/0) od dneva nič (pred nacepitvijo *Trichoderma* spp.) pa do 14 dneva, ko smo zaključili poskus. V preglednicah je tudi podatek, na kateri dan je prišlo do stika med micelijami *Verticillium* spp. in *Trichoderma* spp.

706

	Vda-110 X T atr		Vda-110 X T kon		Vda-110 X T har		Vda-110 X T afr		Vda-110 X T gam		Vda-110	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
inhib. K (%)	51	52	35	45	39	58	32	51	57	56	0-kontr.	0-kontr.
Ind. 14/0	3,4	1,6	4,6	1,9	5,7	2,1	4,7	1,8	3,0	1,9	9,4	4,4
Preživelost	NE	NE	DA	DA	DA	DA	NE	NE	NE	DA		
A metoda	1	1	1/2	1/2-	3	1/2-	1	1*	1/2	1/2*		
B metoda	2+	1+	2-	2-	2!	2!	2+	1*	1	1*		
dan stika	7	3	7	3	7	3	7	3	7	3		

	Vno-01 X T atr		Vno-01 X T kon		Vno-01 X T har		Vno-01 X T afr		Vno-01 X T gam		Vno-01	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
inhib. K	31	76	36	77	18	76	17	81	32	77	0-kontr.	0-kontr.
Ind. 14/0	3,46	1,99	2,82	2,06	4,49	2,09	4,59	1,79	3,74	1,89	4,94	8,51
Preživelost	NE	NE	DA	DA	DA	DA	NE	NE	DA	DA		
A metoda	1*	1*	2	1/2	3	1/2	1	1*	1/2*	1*		
B metoda	1*	1*	2	1+	2!	2+	2+	1*	1*	1*		
dan stika	7	3	7	3	7	3	7	3	7	3		

	Vno-36 X T atr		Vno-36 X T kon		Vno-36 X T har		Vno-36 X T afr		Vno-36 X T gam		Vno-36	
	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C	15 °C	25 °C
inhib. K	49	71	30	70	35	74	34	72	51	74	0-kontr.	0-kontr.
Ind. 14/0	2,47	1,60	4,11	1,80	2,96	1,64	3,62	1,70	2,30	1,67	4,79	6,19
Preživelost	NE	NE	DA	DA	NE	DA	NE	NE	NE	DA		
A metoda	1-	1*	1/2	1/2	3	1/2*	1	1*	1/2*	1/2*		
B metoda	2-	1*	2	2-	2!	1	2+	1*	1*	1*		
dan stika	7	3	7	3	7	3	7	3	7	3		

Metoda A:

- 1 Antagonist preraste patogena in ta ne raste več;
- 1/2 antagonista preraste patogena, toda ta še vedno raste;
- 2 patogen preraste antagonista in ta ne raste več,
- 3 medsebojna inhibicija je približno 2 mm;

podrazredi:

- antagonista samo malo preraste patogena (ob robovih);
- (brez oznake) antagonista preraste patogena, vendar ne popolnoma (približno polovico);

* antagonist popolnoma preraste patogen (ekstremno preraščanje).

Metoda B:

1 Antagonist popolnoma prekrije patogena in površino gojišča;

1/2 antagonist popolnoma prekrije medij, patogena pa ne;

2 antagonist prekrije vsaj 2/3 gojišča;

podrazredi:

* antagonist popolnoma prekrije patogena (ekstremno preraščanje);

- antagonist samo malo preraste patogena (ob robu),

+ antagonist preraste polovico patogena;

! antagonist ne prekrije patogena.

707

Kratek povzetek dosedanjih raziskav je naslednji. Do antagonističnih reakcij med glivami *Trichoderma* spp. in *V. nonalfalfae* (Vno-01, Vno-36) in *V. dahliae* (Vda-110) je prišlo pri temperaturi 25 °C dosti prej (3. dan) kot pri 15 °C (7. dan). To je povsem razumljivo, saj je znano, da glive *Trichoderma* spp. najbolj rastejo in se razvijajo pri temperaturah od 20 do 25 °C. Ta ugotovitev je potrjena tudi z referenčno literaturo (Di Lelio in sod., 2021; Knudsen in Bin, 1990; Wang in sod., 2022 in Carro-Huerga in sod., 2021). Posledično je, zaradi hitreje rasti *Trichoderma* spp. pri temperaturi 25 °C, tudi inhibicija rasti micelijev *Verticillium* spp. večja kot pri 15 °C. Glede na vse upoštevane kriterije, inhibicije rasti (inhb. K [%]), indeksa rasti (Ind. 14/0), vizualne ocene interakcij po metodi A in B ter preživelosti micelija gliv *Verticillium* spp., sta med vsemi proučevanimi glivami izrazito izstopala izolata antagonističnih gliv *T. afroharzianum* in *T. atroviride*. Vse ostale preučevane *Trichoderma* vrste pa pri 25 °C zelo dobro zavirajo rast micelijev *Verticillium* spp., vendar pa miceliji patogenih gliv večinoma preživijo, kljub temu da ga prerastejo antagonistične glive. Pri 15 °C sta glivi *T. harzianum* in *T. gamsii* povzročili odmrtje micelija glive *Verticillium nonalfalfae*, vendar samo pri izolatu Vno-36. Slednja ugotovitev je dejansko edina razlika v učinkovitosti različnih *Trichoderma* vrst proti dvema izolatom glive *Verticillium nonalfalfae*.

4 SKLEP

Za nadaljnje raziskave bi lahko uporabili predvsem *T. atroviride* in *T. afroharzianum*, ker je micelij vseh treh izolatov gliv *Verticillium* spp. odmlr pri obeh temperaturah, 15 in 25 °C. Glede na čas uporabe bi lahko zaradi različne hitrosti rasti micelijev antagonističnih gliv *T. atroviride* uporabili pri nižjih temperaturah, *T. afroharzianum* pa pri višjih temperaturah. *Trichoderma* vrsti bi lahko uporabili tudi hkrati in bi na ta način pokrili večji temperaturni razpon za njihovo učinkovito delovanje, seveda, če ne bi prišlo do negativnih interakcij med samima *Trichoderma* vrstama.

5 ZAHVALA

Raziskava je opravljena v okviru programa strokovnih nalog s področja zdravstvenega varstva rastlin, ki ga sofinancira MKGP, UVHVVR. Zahvaljujemo se Kmetijskemu inštitutu Slovenije, Oddeleku za varstvo rastlin, za izolate antagonističnih gliv *Trichoderma* spp. in IHPS, Oddeleku za varstvo rastlin, za izolate patogenih gliv *Verticillium* spp.

6 LITERATURA

- Carrero-Carrón, I., Trapero-Casas, J. L., Olivares-García, C., Monte, E., Hermosa, R., Jiménez-Díaz, R. M. 2016. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of Verticillium wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. Crop Protection, 88: 45–52, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.05.009>
- Carro-Huerta, G., Mayo-Prieto, S., Rodríguez-González, Á., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S., Casquero, P. A. 2021. The Influence of Temperature on the Growth, Sporulation, Colonization, and Survival of *Trichoderma* spp. in Grapevine Pruning Wounds. Agronomy, 11, 9: 1771, <https://doi.org/10.3390/agronomy11091771>
- Di Lelio, I., Coppola, M., Comite, E., Molisso, D., Lorito, M., Woo S.L., Pennacchio, F., Rao, R., Digilio, M.C. 2021. Temperature Differentially Influences the Capacity of *Trichoderma* Species to Induce Plant Defense Responses in Tomato Against Insect Pests. Frontiers in Plant Science, 12, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678830>
- Inderbitzin, P., Subbarao, K. V. 2014. *Verticillium* Systematics and Evolution: How Confusion Impedes Verticillium Wilt Management and How to Resolve It. Phytopathology, 104, 6: 564–574, <https://doi.org/10.1094/phyto-11-13-0315-ia>
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt H.W., Subbarao, K.V. 2011. Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. PLoS ONE, 6, 12: 28341, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
- Knudsen, G. R., Bin, L. 1990. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. Phytopathology, 80, 8: 724-727, <https://doi.org/10.1094/phyto-80-724>
- Kowalska, B. 2021. Management of the soil-borne fungal pathogen – *Verticillium dahliae* Kleb. causing vascular wilt diseases. J Plant Pathol 103: 1185–1194, <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00937-8>
- Ogundeji, A. O., Meng, L., Cheng, Z., Hou, J., Yin, T., Zhang, S., Liu, X., Liu, X., Li, S. 2022. Integrated crop practices management stimulates soil microbiome for *Verticillium* wilt suppression. European Journal of Agronomy, 140, <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126594>
- Orendtlich, A., Nachmias, A., Chet, I. 1990. Integrated control of *Verticillium dahliae* in potato by *Trichoderma harzianum* and captan. Crop Protection, 9(5), 363–366, [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(90\)90008-u](https://doi.org/10.1016/0261-2194(90)90008-u)
- Pegg, G. F., Brady, B. L. 2002. Verticillium Wilts. New York, CABI Publishing: 33–275, <https://doi.org/10.1079/9780851995298.0000>
- Wang, R., Tao, D., Li, J., Chen, S., Fa, J., Bi, W., Boboua S., in Zheng G. 2022. Screening and characterization of a low-temperature-resistant cellulose-degrading strain, *Trichoderma harzianum* L-8, from a primitive forest, BioResources, 17, 2: 3303-3319, <https://doi.org/10.15376/biores.17.2.3303-3319>