



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Jernej JENKO

**UPORABA ANTAGONISTIČNIH GLIV ZA ZATIRANJE
RASTLINSKIH BOLEZNI**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Jernej JENKO

**UPORABA ANTAGONISTIČNIH GLIV ZA ZATIRANJE
RASTLINSKIH BOLEZNI**

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij – 1. stopnja

**THE USE OF ANTAGONISTIC FUNGI TO CONTROL PLANT
DISEASES**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2010

Jenko J. Uporaba antagonističnih gliv za zatiranje rastlinskih bolezni.

Dipl. projekt (UN). Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2010

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Francija Aca Celarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Franci Aco Celar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Irena Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 24.9.2010

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Jernej Jenko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 632.4:632.937.1.05(043.2)
- KG biotično varstvo rastlin/ antagonistične glive/ *Trichoderma* spp./ fitopatogen/ mikoparazitizem/ kompeticija/ antibioza
- AV JENKO, Jernej
- SA CELAR, Franci Aco (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2010
- IN UPORABA ANTAGONISTIČNIH GLIV ZA ZATIRANJE RASTLINSKIH BOLEZNI
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij – 1.stopnja)
- OP V, 15 str., 1 pregl., 10 sl., 11 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Kemična fitofarmaceutvska sredstva so zaradi negativnega vpliva na okolje, drage registracije in odpornosti tarčnih organizmov na vedno slabšem glas. Številne inštitucije pospešeno razvijajo in raziskujejo možne zamenjave le teh z okolju prijaznejšimi sredstvi. Možna alternativa je tudi uporaba antagonističnih gliv za zatiranje rastlinskih bolezni. Najbolje raziskane glive z antagonističnimi lastnosti so talne saprofitske glive iz rodov *Trichoderma* in *Gliocladium*, iz katerih je več kot polovica vseh biopesticidnih pripravkov. Mehanizmi antagonizma se delijo na tekmovanje (za hranila in prostor), antibiozo (kjer gre predvsem za hlapne in nehlapne metabolite) in mikoparazitizem. Število produktov, namenjenih zatiranju rastlinskih bolezni, se močno povečuje, vendar pa mnogo teh pripravkov ni registriranih kot biopesticidi, pač pa se prodajajo kot rastlinski stimulatorji rasti, sredstva za izboljšanje tal, ipd.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 632.4:632.937.1.05(043.2)
- CX biological control/ antagonistic fungi/ *Trichoderma* spp./ phythopatogen/ mycoparasitism/ competition/ antibiosis
- AU JENKO, Jernej
- AA CELAR, Franci Aco (supervisor)
- PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2010
- TI THE USE OF ANTAGONISTIC FUNGI TO CONTROL PLANT DISEASES
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO V, 15 p., 1 tab., 10 fig., 11 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Because of the negative impact on the environment, costly registration and the resistance of target organisms, chemical plant protection is not popular among the people. Many institutions are developing and exploring the possible replacement of chemical pesticides with environmentally-friendly methods. The use of antagonistic fungi to control plant diseases is a possible alternative. The best studied fungi with antagonistic properties are soil saprophytic fungi of the genera *Trichoderma* and *Gliocladium*. More than half of the products with biopesticidal effects are containing this fungus. Mechanisms of antagonism are divided into competition (for nutrients and space), antibiosis (which refers mainly to the volatile and non-volatile metabolites) and micoparasitism. Number of products, containing antagonistic fungi are quickly increasing, but many of these preparations is not registered as a biopesticide, but are sold as plant growth stimulators, soil improvers, etc.

KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	II
Key words documentation (KWD)	III
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	V
Kazalo slik	V
1 UVOD	1
1.1 PRIPRAVKI, KI SO NA VOLJO ZA UPORABO	1
1.2 RAZLIČNI MEHANIZMI ANTAGONIZMA	5
2 TEKMOVANJE	6
2.1 HITROST IZRABE HRANIL ANTAGONISTIČNIH IN FITOPATOGENIH GLIV	6
3 ANTIBIOZA	8
3.1 INHIBICIJA RASTI FITOPATOGENIH GLIV S POMOČJO NEHLAPNIH METABOLITOV ANTAGONISTIČNIH GLIV	8
3.2 Hlapni metaboliti antagonističnih gliv	9
4 MIKOPARAZITIZEM	10
4.1 SINERGISTIČNO DELOVANJE LITIČNIH ENCIMOV IN DRUGIH ANTIGLIVIČNIH SNOVI	12
4.2 INTERAKCIJE MED HIFAMI ANTAGONISTIČNIH IN FITOPATOGENIH GLIV	12
5 INTERAKCIJE ANTAGONISTIČNIH GLIV Z VIŠJIMI RASTLINAMI	13
6 SKLEPI	13
7 VIRI	14

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Interakcije med hifami preučevanih antagonističnih in fitopatogenih gliv (Celar, 2000).....	13
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: Parazitiran kleistotecij. Skozi odprtino bruhajo konidiji glive <i>A. quisqualis</i> (Weedwn ..., 2000)	3
Slika 2: <i>Trichoderma harzianum</i> (Academic dictionaries and encyclopedias, 2006)	4
Slika 3: Prikaz hitrosti izrabe amonijske oblike dušika pri fitopatogenih in antagonističnih glivah (Celar, 2000).....	7
Slika 4: Prikaz hitrosti izrabe nitratne oblike dušika pri fitopatogenih in antagonističnih glivah (Celar, 2000).....	7
Slika 5: Prikaz hitrosti izrabe glukoze pri fitopatogenih in antagonističnih glivah (Celar, 2000).....	7
Slika 6: Ovijanje hif antagonistične glive <i>Trichoderma longibrachiatum</i> okoli hif fitopatogene glive <i>Fusarium solani</i> (foto: Celar, 2000).....	10
Slika 7: Slika 1: Hitin, polimer N-acetil-D-glukozamina (Sea Grant ..., 2010).....	10
Slika 8: Pripenjanje hife glive <i>T. harzianum</i> in vzporedna rast s hifo glive <i>R. solani</i> (foto: Celar, 2000).	11
Slika 9: Rast hif glive <i>T. longibrachiatum</i> v hifah <i>S. sclerotiorum</i> in propad le-teh (foto: Celar, 2000).	11
Slika 10: Hifa glive <i>Rhizoctonia solani</i> pod elektronskim mikroskopom, po odstranitvi antagonistične glive <i>Trichoderma</i> sp. Vidne so luknje, skozi katere je antagonistična gliva s pomočjo litičnih encimov prodrla v fitopatogena (foto: Weedwn ..., 2000)	12

1 UVOD

V sodobnem kmetijstvu je bilo v zadnjem času mnogo sprememb. Razvoj kmetijske tehnike je privedel kmetijstvo v tak položaj, da lahko relativno majhen odstotek ljudi pridelava hrano za celotno prebivalstvo. Skozi stoletja se je znanje o genskem materialu močno povečalo, kar je privedlo do velikega povečanja in izboljšanja pridelkov. Na povečanje pridelkov je v veliki meri vplivala tudi uporaba mineralnih gnojil in fitofarmaceutskih sredstev (FFS). Žal, pa je težnja po vedno večjih zasluških privedla v sejanje (saditev) genetsko uniformnih rastlin z močno občutljivostjo na glivična obolenja in ozek kolobar (ali celo monokulturo). Velika poraba FFS s širokim spektrom delovanja in visoko učinkovitostjo pa je tako kolobar kot tudi genski material še dodatno zožila. Učinkovitost FFS je postala edini kriterij, po katerem so merili njihovo uporabno (prodajno) vrednost (Celar, 2000). Vendar se je kmalu pokazalo, da so v živilski trg vpleteni tudi kupci in porabniki kmetijskih proizvodov, ki zahtevajo zdravstveno neoporečno hrano, ki ne vsebuje velikih in škodljivih ostankov FFS. V zadnjem času so se zaradi vse strožjih predpisov pri registraciji (toksikološke in ekotoksikološke zahteve) močno povečali stroški izdelave novega sredstva. Tudi odpornost nekaterih gliv na posamezne fungicide je močno zmanjšala seznam uporabnih kemičnih učinkovin. V številnih raziskovalnih centrih za varstvo rastlin so zato raziskave usmerili v to, da bi nadomestili fitofarmaceutska sredstva z drugimi, okolju prijaznejšimi načini varstva (Celar, 2000). Tak način je lahko biotično varstvo s pomočjo antagonističnih gliv. Antagonisti so v splošnem organizmi, ki s svojimi izločki in rastjo zaviralno vplivajo na določene druge organizme v istem okolju. Zatiranje rastlinskih bolezn (pa tudi škodljivcev in plevelov) na tak način je zelo zanimiva in hitro razvijajoča se disciplina, ki vključuje širok spekter znanja, kot na primer patologija, ekologija, genetika, fiziologija, masovna produkcija (komercialna izdelava), strategija aplikacije, ipd. Pri raziskovanju, razvijanju in sproščanju biotičnih pripravkov na kmetijski trg se pojavlja mnogo ovir, ki zajemajo tako pojasnjevanje osnovnih bioloških spoznanj, kot tudi družbeno – ekonomski faktor (Butt in sod., 2001). Namreč, ne samo, da je razvoj pripravkov drag in problematičen, ampak je tudi težava, ker po aplikaciji ni takojšnjega učinka (oziroma je majhen) v primerjavi s konvencionalnimi FFS. Poleg tega, da je uporaba biotičnega varstva okolju prijaznejša, pa ima obetavno prihodnost tudi v ekološkem kmetijstvu, kjer konvencionalno kemično varstvo ni dovoljeno.

1.1 PRIPRAVKI, KI SO NA VOLJO ZA UPORABO

Število pripravkov, namenjenih zatiranju rastlinskih bolezn, se močno povečuje. Leta 1998 jih je bilo že blizu 40 (Butt in sod., 2001). Vendar mnogo teh pripravkov ni registriranih kot biopesticidi, pač pa se prodajajo kot rastlinski stimulatorji rasti, sredstva za izboljšanje tal, sredstva za krepitev rastlin, sredstva za zaščito ran, ipd. Tako se pridelovalci biotičnih pripravkov izognejo dražjim in dolgotrajnejšim procesom registracije, toksikološkim raziskavam in raziskavam posledic uporabe v okolju. S tem se sproščanje antagonističnih organizmov na trg zelo pospeši, vendar pa se zaradi možnega pomanjkanja eksperimentalnega dela lahko poveča tudi tveganje za zdravje ljudi in okolja.

Oglašanje FFS, brez formalnega dovoljenja in registracije, lahko privede tudi do prepovedi prodaje in kazni.

Vsi pripravki, ki so registrirani kot biopesticidi za zatiranje rastlinskih bolezni temeljijo na uporabi devetih vrst gliv (Butt in sod., 2001). Več kot polovica pripravkov temelji na uporabi gliv iz rodu *Trichoderma* in *Gliocladium*, saj so te glive v okolju povsod prisotne, med antagonisti najbolj raziskane, relativno enostavne za rokovanje (proizvodnjo) in neškodljive za okolje. Pripravki so na voljo za zatiranje patogenov v tleh in koreninah, zatiranje foliarnih in skladiščnih bolezni.

ANTAGONISTI BOLEZNI PODZEMNIH ORGANOV

Coniothyrium minitans

Coniothyrium minitans je mikoparazit, ki parazitira sklerocije gliv *Sclerotinia sclerotiorum* in *Sclerotinia minor*. Na podlagi uporabe tega antagonista sta na voljo dva pripravka in sicer Constans WG v Nemčiji in Švici, ter KONI na Madžarskem. Oba pripravka sta v obliki granul, le da se Constans WG raztopi v vodi in se s tem poškropi tla, medtem ko se KONI neposredno vdela v tla. Pripravka se aplicira nekaj tednov pred sejanjem rastlin, da glivi zagotovimo dovolj časa, da uniči sklerocije v tleh. Uporablja se sev CON/M/91-08 (Butt in sod., 2001).

Gliocladium virens (= *Trichoderma virens*)

Tudi ta gliva se na trgu pojavlja v obliki dveh pripravkov. GlioGardTM in SoilGardTM. Pripravka sta namenjena zatiranju padavice sadik vrtnin in okrasnih rastlin, ki jih povzročijo glive *Pythium* spp. in *Rhizoctonia solani*. Uporaba pripravkov je omejena na rastlinjake in druge zaprte prostore.

Trichoderma harzianum

Pripravek je narejen iz seva 1295-22 (T-22) v podjetju BioWorks (New York). Prodaja se pod imenom T-22 Planter BoxTM. Gliva se nahaja v obliki konidijev in je namenjena aplikaciji na večjih semenih, kot so na primer koruza, soja, bombaž in fižol. Uporaba pripravka je možna tudi na semenih, pri katerih so bili že uporabljeni fungicidi. Za izboljšanje tal v rastlinjakih obstaja še pripravek RootShieldTM, ki vsebuje celotno glivo istega seva (ne le konidijev), nacepljeno na glinene delce. Naslednji izdelek te glive s komercialnim imenom RootShield je sestavljen iz konidijev in inertnih delcev. Namenjen je vodni suspenziji. Ta pripravek kolonizira koreninski sistem rastlin in jih varuje. Namenjen je zatiranju rastlinskih bolezni, ki jih povzročijo glive iz rodov *Fusarium*, *Rhizoctonia* in *Pythium* spp. Nasledni pripravek na podlagi *T. harzianum* z imenom Supresivit, ki je na voljo v republiki Češki in Nemčiji, vsebuje sev PV5736-89. Nahaja se v obliki močljivega prahu, ki vsebuje konidije. Uporablja se predvsem za zatiranje padavice sadik in koreninske gnilobe na okrasnih rastlinah in za zatiranje padavice na grahu.

Trichoderma viride

T. viride je kot biopesticid na voljo v Indiji (Hoechst Schering AgrEvo Ltd) pod imenom Ecofit. Uporablja se za zatiranje koreninske trohnobe, gnilobe na semenu, padavice sadik, gnilobo koreninskega vratu in fuzarioz na bombažu, sončnici, soji, tobaku, ameriškem lešniku (kikirikiju) in zelenjavi.

ANTAGONSTI BOLEZNI NADZEMNIH ORGANOV

Ampelomyces quisqualis

Pripravek AQ10, ki vsebuje to glivo, je razvit posebej za zatiranje pepelovk ki okužujejo liste, stebela in plodove rastlin. Uporablja se za varovanje pridelka jagod, paradižnika, grozdja, sadnega drevja in okrasnih rastlin. Za infekcijo gliva potrebuje prosto vodo in temperature med 20 in 30 stopinj celzija. Za delovanje pripravka je potrebna 3% okuženost rastlin s patogenom. Po aplikaciji se mikoparazit 7 – 10 dni širi po miceliju patogena, ne da bi ga ubil, nato pa se v 2 – 4 dneh oblikujejo piknidiji. Ob oblikovanju piknidijev začno propadati gostiteljske celice (Celar, 2010).



Slika 1: Parazitiran kleistotecij. Skozi odprtino bruhajo konidiji glive *A. quisqualis* (Weedwn in sod., 2000a)

Nekatere pepelovke so razvile odpornost na fungicide, ki temeljijo na žveplu in fungicide iz skupin inhibitorjev ergosterola. S pomočjo AQ10 lahko zaradi zmanjšane uporabe (tako časovne, kot tudi količinske) kemičnih fungicidov zmanjšamo tudi odpornost pepelovk na le te (Butt in sod., 2001).

Phlebiopsis (Peniophora) gigantea

Phlebiopsis gigantea je saprotrof, ki povzroča trohnobo lesa. Uporablja se na panjih sveže posekanih borov, kjer preprečuje kolonizacijo z glivo *Heterobasidion annosum*, ki povzroča gnitje korenin. Gliva *P. gigantea* ne vsebuje biocidnih snovi, pač pa porabi hranila, ki so potrebna, da se patogen razvije. Komerčni pripravek z imenom PG suspension vsebuje oidijske trose in je na voljo v Angliji, od podjetja Omex Environmental Ld. in na Finskem, kjer ga prodaja Kemira Agro Oy. Gliva *P. gigantea* je na voljo tudi v drugih skandinavskih državah in na Poljskem (Butt in sod., 2001).

Trichoderma harzianum

Pripravek se prodaja pod imenom TrichodexTM. Razvilo ga je podjetje Makhteshim Chemical Works in je na voljo v Evropi in Izraelu. Uporablja se v rastlinjakih za zatiranje sive plesni, ki jo povzroča gliva *Botrytis cinerea*. Priporočena je izmenična uporaba tega pripravka in kemičnih fungicidov.



Slika 2: *Trichoderma harzianum* (Academic dictionaries and encyclopedias, 2006)

Trichoderma harzianum in *Trichoderma polysporum*

Pripravek z imenom BINAB-T vsebuje seva IMI 206040 (*T. harzianum*) in IMI 206039 (*T. polysporum*). Je eden najstarejših biopesticidnih pripravkov, ki je še vedno na voljo. Izdeluje ga podjetje Bio-Innovation Efr AB v Švici in je v uporabi že več kot 30 let. V preteklosti se je uporabljal za zatiranje mnogih bolezni, sedaj pa se v Švici in Nemčiji uporablja predvsem za zatiranje sive plesni (*B. cinerea*) na jagodah.

Trichoderma harzianum in *Trichoderma viride*

V Novi Zelandiji so registrirani trije pripravki, ki vsebujejo kombinacijo gliv *T. harzianum* in *T. viride*. Uporabljajo se za zatiranje sadne listne svetlikavosti (*Stereum* spp.). Pripravek Trichodowels, Trichobject, ki se injicira v deblo in Trichoseal. Slednji se uporablja kot premaz za rane, ki jih naredimo z rezjo pri sadnem drevju.

Aureobasidium pullulans

Iz cvetov jablane sta bila izolirana dva seva glive *Aureobasidium pullulans*. Predstavljata naravna antagonista bakteriji *Erwinia amylovora* (hrušev ožig), ter s škropljenjem nanesena na cvetove varujeta drevesa jablan pred okužbo. Gliva preprečuje prodor patogena v cvet. Visoko učinkovitost pripravka lahko primerjamo z učinkovitostjo antibiotikov (streptomycin), čeprav je mehanizem delovanja povsem drugačen. Namreč gre za tekmovanje za hranila. S toksikološkimi testi se je dokazalo, da je uporaba glive varna za ljudi, živali (čebele) in okolje. Pripravek je na voljo pod imenom Blossom ProtectTM, izdeluje pa ga podjetje Bio – FERM (Ertl di, 2008).

ANTAGONISTI SKLADIŠČNIH BOLEZNI

Candida oleophila

Gliva *Candida oleophila* se nahaja v pripravku imenovanem Aspire™, ki je registriran v ZDA (Ecogen Corporation) in Izraelu. Uporablja se za zatiranje zelene in modre plesni, ki jo povzročata glivi *Penicillium digitatum* in *Penicillium italicum*. Učinkuje tudi proti kisli gnilobi, ki jo povzroča gliva *Geotrichum candidum*. Aspire™ najbolje deluje s hkratno (zmanjšano) uporabo kemičnega pripravka na podlagi tiabendazola. Taka kombinacija varstva je po zatiralnem učinku popolnoma primerljiva konvencionalnemu kemičnemu varstvu (s fungicidi: natrijev O – fenil pentan, tiabendazol, imazalil, in metalaksil) (Butt in sod., 2001).

Cryptococcus albidus

Pripravek na podlagi te glive je bil razvit predvsem za uporabo na jablani in hruški proti sivi in modri plesni, ki ju povzročata glivi *Botrytis cinerea* in *Penicillium expansum*. Pripravek se imenuje YieldPlus. Za komercialno uporabo ga je razvilo podjetje Anchor Yeast v Južni Afriki (Capetown) (de Koch, 1998, cit. po Butt, 2001).

1.2 RAZLIČNI MEHANIZMI ANTAGONIZMA

Antagonistične glive v naravnem okolju prek različnih mehanizmov zavirajo, ali celo ustavijo rast različnih gliv. Tako delujejo tudi na nekatere fitopatogene glive. To lastnost antagonistov so različni raziskovalci poskušali uporabiti v biotičnem varstvu rastlin.

Trichoderma spp. in *Gliocladium* spp., na katerih je bilo narejenih največ raziskav, so zelo pogoste talne glive, ki jih najdemo v skoraj vseh tipih tal in substratih. Različne vrste teh rodov antagonistično delujejo proti drugim, tudi patogenim vrstam. V procesu antagonističnega delovanja sodelujejo številni mehanizmi, ki se v času in prostoru med seboj prepletajo in dopolnjujejo, hkrati pa na njih vplivajo tudi dejavniki okolja (Celar, 2000). Te mehanizme v grobem ločimo na:

- **Tekmovanje (kompeticija):** največkrat glive tekmujejo za hranila (ogljik, dušik) in prostor;
- **Antibioza:** antagonistične glive oblikujejo hlapne in nehlapne metabolite, ki delujejo zaviralno na druge glive;
- **Mikoparazitizem:** antagonistične glive oblikujejo litične encime kot so proteinaze, glukanaze, celulaze in hitinaze, ki zagotovijo razkroj celičnih sten hif gostiteljskih gliv, tako da lahko izrabljajo njene hranilne snovi.

2 TEKMOVANJE

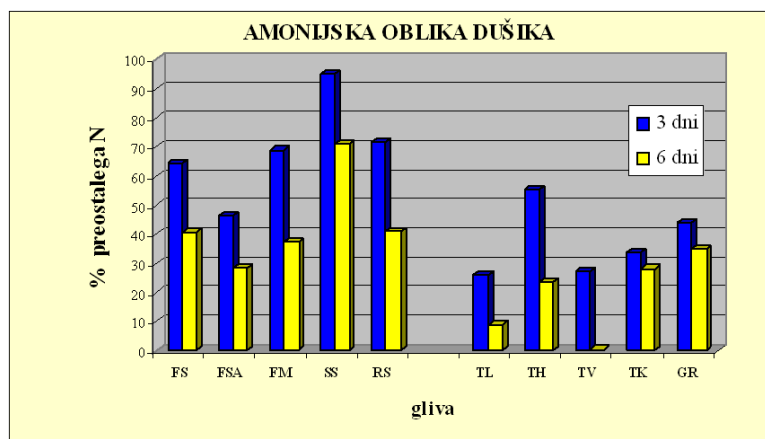
V določenem okolju je prisotnost določenih hranil, na primer enostavnih sladkorjev in aminokislin močno omejena. Zato prihaja med mikroorganizmi do kompeticije za ta hranil. Sama prisotnost hranil tudi močno vpliva na antagonistične lastnosti gliv. Če je hranila dovolj, se antagonistične lastnosti ne izrazijo tako agresivno ali pa se celo izničijo. Na rast in tekmovalnost gliv vplivajo tudi koreninski izločki, saj spodbujajo kalitev nekaterih fitopatogenih gliv, tako da na primer, če gliva *Trichoderma harzianum* zavzame prostor (in hkrati izrabi koreninske izločke), prepreči talnim fitopatogenim glivam okužbo preko koreninskih vršičkov. Na proces antagonizma vpliva tudi način aplikacije (inokulacija različnih substratov; uporaba različnih delov glive, kot na primer micelij ali konidiji) (cit. po Celar, 2000). Pri degradaciji sklerocijev in apotecijev glive *Sclerotinia sclerotiorum* se je izkazalo, da je zelo pomembna koncentracija inokuluma gliv *Trichoderma* spp. in *Gliocladium roseum*. Poskus, ki sta ga zastavila Luth in Schlosser (1993, cit. po Celar, 2000) je pokazal, da se pri nižjih koncentracijah antagonizem bolje izrazi, saj je bilo v okolju očitno premalo lahko dostopne hrane za tako velik inokulum. Tudi nekateri drugi mehanizmi antagonizma naj bi se sprožili šele tedaj, ko se dogodi prehranski stres.

2.1 HITROST IZRABE HRANIL ANTAGONISTIČNIH IN FITOPATOGENIH GLIV

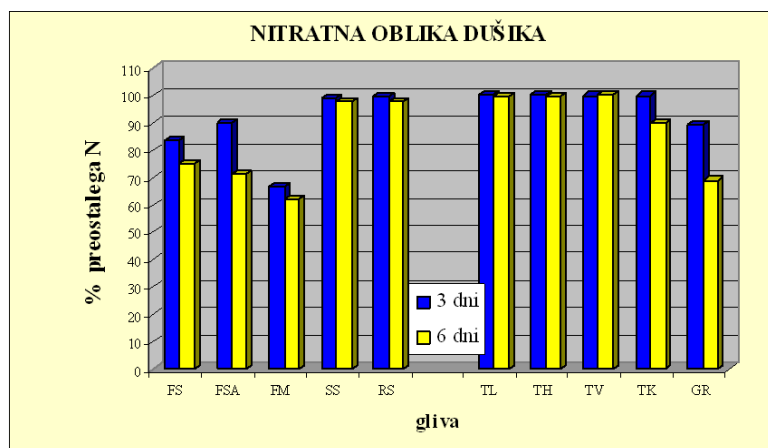
V določeno gojišče so (Celar, 2000, 2003) inokulirali različne patogene glive (*Fusarium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum* in *Rhizoctonia solani*) in antagonistične glive (*Trichoderma* spp. in *Gliocladium roseum*), vsako v svojo erlenmajerico. Po treh oziroma šestih dneh inkubacije so vzeli vzorce in določili količino neizrabljene glukoze in dušika v amonijski in nitratni obliki (slike 3, 4 in 5).

Antagonistične glive v večini primerov statistično značilno hitreje porabljajo amonijsko obliko dušika v primerjavi s fitopatogenimi glivami. Glive iz rodu *Fusarium* v primerjavi s antagonističnimi glivami hitreje izrablja nitratno obliko dušika, medtem ko med *Rhizoctonia solani* in *Sclerotinia sclerotiorum*, ter antagonističnimi glivami v večini primerov ni statistično značilnih razlik.

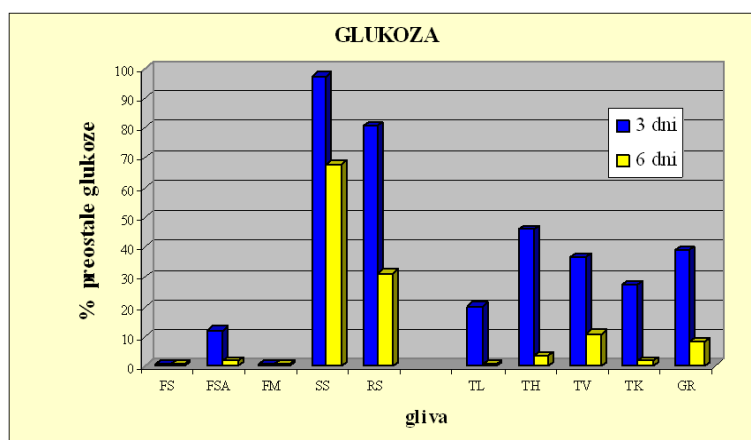
Glive iz rodu *Fusarium* zelo hitro (že po treh dneh) porabijo iz gojišča večino glukoze. Nekoliko počasneje, vendar še vseeno hitro izrabljajo glukozo vse antagonistične glive. V večini primerov je v gojišču po 6 dneh manj kot 10 % preostale glukoze (Celar, 2000). Izjema sta le *S. sclerotiorum* in *R. solani*, ki statistično značilno počasneje izrabljata glukozo kot antagonistične glive. S tem poskusom so ugotovili, da je zatiranje patogenov s pomočjo teh antagonistov glede na njihovo tekmovalno sposobnost za izrabo hranil (dušik in glukozo) bolj smiselno pri glivah *S. sclerotiorum* in *R. solani*, kot pa pri glivah iz rodu *Fusarium*.



Slika 3: Prikaz hitrosti izrabe amonijske oblike dušika pri fitopatogenih in antagonističnih glivah (Celar, 2000)



Slika 4: Prikaz hitrosti izrabe nitratne oblike dušika pri fitopatogenih in antagonističnih glivah (Celar, 2000)



Slika 5: Prikaz hitrosti izrabe glukoze pri fitopatogenih in antagonističnih glivah (Celar, 2000)

3 ANTIBIOZA

Antagonistične glive oblikujejo številne hlapne in nehlapne sekundarne metabolite, ki fungicidno in fungistatično delujejo na fitopatogene glive (Celar, 2000). Metabolite gliv iz rodu *Trichoderma* spp. lahko v grobem razdelimo v tri večje skupine:

- Hlapni metaboliti, kamor spadajo alkil pironi, večina izocianidnih spojin, alkoholi, itd.
- Lužljivi metaboliti (oktaketidi, terpenoidi, ipd.)
- Peptaiboli, ki vplivajo na prepustnost membran, in s tem na antagonistične lastnosti gliv.

Količina sproščenih antibiotičnih snovi je močno odvisna tudi od seva (izolata) in okoljskih dejavnikov (temperatura, vodni potencial, kislost, prehrana, itn.).

3.1 INHIBICIJA RASTI FITOPATOGENIH GLIV S POMOČJO NEHLAPNIH METABOLITOV ANTAGONISTIČNIH GLIV

Za preučevanje nehlapnih metabolitov se uporablja celofanski test. Celofanski test se izvede tako, da se petrijevko z določenim gojiščem prekrije z membranskim filtrom. Nato se na filter inokulira antagonistično glivo in inkubira. Po določenem času (3 dni) se glivo skupaj s filtrom odstrani in nato na gojišče inokulira fitopatogeno glivo. Za kontrolo se uporabi isto gojišče v katerem predhodno niso rasle antagonistične glive. Nato se po inkubaciji patogena (3 in 6 dni) meri velikost micelija in izračuna odstotek inhibicije (glede na kontrolo). Pomanjkljivost celofanskega testa je ta, da se poleg izločenih nehlapnih snovi zmanjša tudi vsebnost hranil v gojišču, kar tudi močno vpliva na rast patogena. Celar (2000) je ugotovil, da so v večini primerov razlike v inhibiciji rasti po 3 in 6 dneh izredno velike. Kar pa ni posledica časa, temveč predhodne izrabe hranil (od antagonističnih gliv). Ugotovil je, da vse antagonistične glive (na račun nehlapnih metabolitov) statistično značilno (različno uspešno) zavirajo rast vseh fitopatogenih gliv. Vse vrste iz rodu *Trichoderma* statistično značilno bolj zavirajo rast patogenov kot *Gliocladium roseum*.

Zaradi že omenjenih pomanjkljivosti celofanskega testa je Celar (2000) za določanje učinkovitosti nehlapnih metabolitov izvedel še test s filtrati. Na določeno tekoče gojišče so nacepili antagoniste, nato inkubirali. Po 10 dneh so gojišče z vakumsko črpalko prefiltrirali čez filter, tako da so odstranili glivo. Tak filtrat so (po dodatku 10 ml destilirane vode) skozi membranski filter sterilno dodali ohlajajočemu se trdnemu gojišču, katerega so vnesli v petrijevke in tja nacepili fitopatogene glive. Za kontrolo so uporabili isto gojišče, kamor so namesto filtrata dodali samo destilirano vodo. Dobili so podobne rezultate, le da razlike v inhibiciji rasti fitopatogenih gliv po 3 in 6 dneh v večini primerov niso bile statistično značilne.

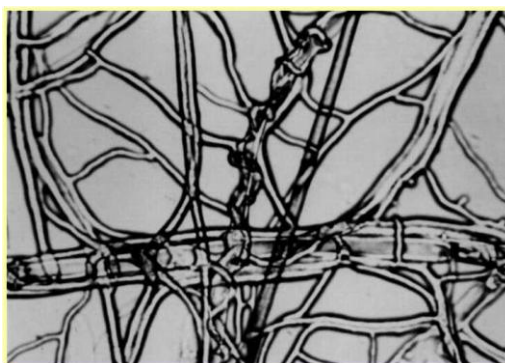
3.2 Hlapni metaboliti antagonističnih gliv

Hlapne metabolite se lahko preučuje tako, da se v petrijevke z določenim trdnim gojiščem nacepi antagonistične in fitopatogene glive. Nato se po dve petrijevki (1 z antagonistom in 1 s patogenom) v različnih kombinacijah združi. Po določenem času se izmeri in določi inhibicijo. Za kontrolo služi par petrijevk, ki nima antagonista.

Pri preučevanju hlapnih metabolitov (na zgoraj opisan način) so Celar in sod. ugotovili, da se lahko fitopatogene glive glede na to, kako hlapni metaboliti vplivajo na prirast micelija razdelijo v dve skupini. V prvi so glive iz rodu *Fusarium*, na katere imajo hlapni metaboliti antagonističnih gliv sorazmerno majhen vpliv. Inhibicija rasti micelija se giblje od 2 do 11 odstotkov (Celar, 2000). V drugi skupini se nahajata glivi *R. solani* in *S. sclerotiorum*, ki sta močno podvržena vplivu hlapnih metabolitov. Večji vpliv na te dve glivi imajo glive iz rodu *Trichoderma* (z izjemo *T. koningii*), kot pa *Gliocladium roseum*.

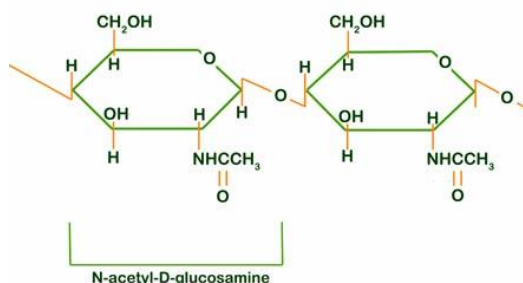
4 MIKOPARAZITIZEM

Antagonistične glive oblikujejo litične encime kot so proteinaze, glukanaze, celulaze in hitinaze, ki zagotovijo razkroj celičnih sten hif gostiteljskih gliv, tako da lahko izrabljajo njene hranilne snovi. Mikoparazitizem je zelo kompleksen proces, odvisen od številnih dejavnikov in sestavljen iz posameznih stopenj (Celar, 2000). Najprej antagonist prepozna gostitelja zaradi oddajanja določenih snovi v okolico. Nekateri menijo, da so lahko tudi rastlinske beljakovine, imenovane lektini, ki jih rastline oddajajo ob prisotnosti patogena. Te snovi kažejo protitelesom podobne reakcije z ogljikovimi hidrati (cit. po Celar, 2000).



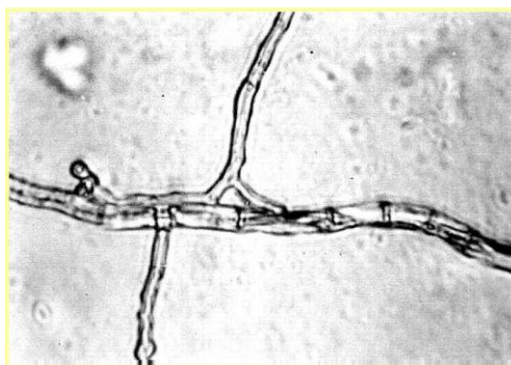
Slika 6: Ovijanje hif antagonistične glive *Trichoderma longibrachiatum* okoli hif fitopatogene glive *Fusarium solani* (foto: Celar, 2000)

Po stiku z gostiteljem se hife parazitskih gliv ovijejo okoli patogena, ali pa rastejo vzporedno in prodirajo v patogena s pomočjo nekakšnih kaveljčkov. Sledi razkroj hif patogena s pomočjo multiplega encimskega sistema. Za glive iz rodu *Trichoderma* je znano, da sintetizirajo polisaharidne liaze (hitinaze, glukanaze), proteinaze, in lipaze, torej encime, ki naj bi bili ključni za degradacijo celičnih sten. Celične stene hif so sestavljene iz polisaharidov (80 – 90 %), ki so največkrat hitin (polimer N - acetilglukozamin) ali celuloza (polimer D - glukoze). Vsebuje pa tudi 1 – 15 % beljakovin in 2 – 10 % lipidov. Razgradnja hitina poteka s pomočjo hitinolitičnih encimov. Razdelimo jih v tri skupine. In sicer β -1,4-N-acetilglukozaminidaze (razgrajuje polimer do monomerov), endohitinaze (naključno cepljenje notranje vezi po celotni dolžini hitinskih mikrofibril) in eksohitinaze (preprečijo oblikovanje mono in oligosaharidov).

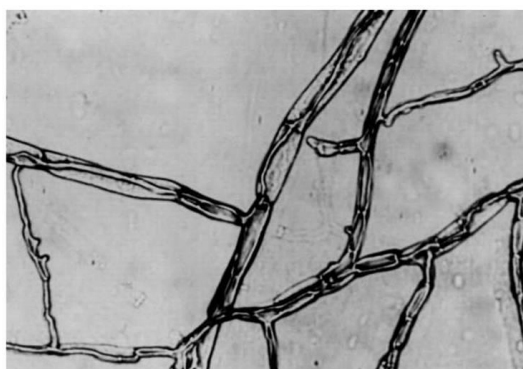


Slika 7: Slika 1: Hitin, polimer N-acetil-D-glukozamina (Sea Grant ..., 2010)

Za izboljšanja hitinolitičnega sistema so uporabili tudi biotehnoške metode, pri čemer so prenesli gen bakterije *Serratia marcescens*, ki uravnava sintezo hitinaz v glivo *Trichoderma harzianum*. Vendar pa so ugotovili, da gen zavira sintezo in sproščanje naravnih hitinaz. V celični steni najdemo tudi β -glukane, ki se povezujejo z drugimi strukturnimi elementi (največkrat s hitinom) in tako skrbijo za večjo trdnost celičnih sten. Za razgradnjo β -glukanov glive (in drugi mikroorganizmi) sproščajo encime β -glukanaze, ki se delijo na eksoglukanaze (ki cepijo glukane zaporedno, na enake dele) in endoglukanaze (naključno cepljenje glukanev, na različno velike dele – tudi do glukoze). Za razgradnjo celuloze pa se uporabljajo različni encimi, kot na primer 1,4- β -D-glukan celobiohidrolaze, endo-1,4- β -D glukanaze in 1,4- β -D glukozidaza.



Slika 8: Pripenjanje hife glive *T. harzianum* in vzporedna rast s hifo glive *R. solani* (foto: Celar, 2000)



Slika 9: Rast hif glive *T. longibrachiatum* v hifah *S. sclerotiorum* in propad le-teh (foto: Celar, 2000)

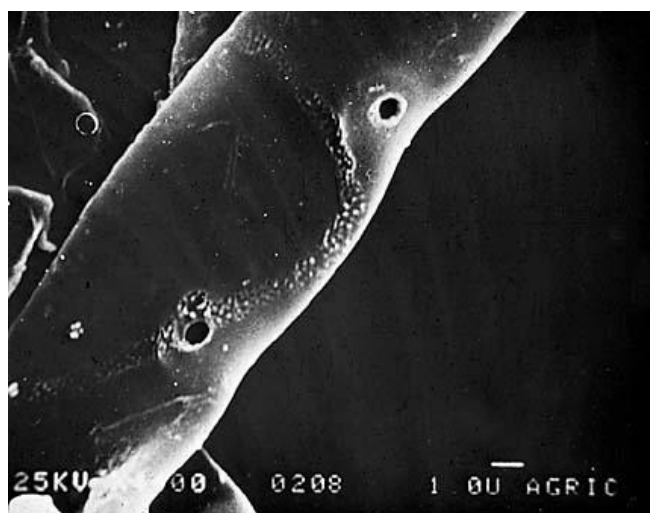
4.1 SINERGISTIČNO DELOVANJE LITIČNIH ENCIMOV IN DRUGIH ANTIGLIVIČNIH SNOVI

Pri antagonističnih procesih litični encimi nikoli ne delujejo posamično, saj je celična stena gliv zgrajena iz hitina, ki je prepleten in okrepljen z β – glukani, lipidi in proteini. Tako je za razgradnjo nujno potrebna kombinacija hitinaz, β – glukanaz (β -1,3 in β -1,6 - glukanaz), proteinaz in lipaz.

Antagonistično delovanje gliv se uspešno poveča tudi pri hkratni uporabi hidrolitičnih encimov v kombinaciji z antibiotiki. To si razlagajo s tem, da antibiotiki, zaradi dezintegracije celične stene pod vplivom hidrolitičnih encimov, lažje prodrejo do citoplazemske membrane, na katero delujejo (cit. po Celar, 2000). Sinergizem je opazen tudi pri hkratni uporabi komercialnih fungicidov in hitinolitičnega ali glukanolitičnega encima. Takšno kombinacijo bi lahko uporabili za zmanjšanje količine kemičnih sredstev za zatiranje rastlinskih bolezni.

4.2 INTERAKCIJE MED HIFAMI ANTAGONISTIČNIH IN FITOPATOGENIH GLIV

Za preučevanje interakcij med hifami so na trdno gojišče v petrijevko položili kos sterilnega celofana. Nato so na vsak konec celofana nacepili eno fitopatogeno in eno antagonistično glivo. Dva dni po kontaktu gliv so celofan skupaj z micelijem pregledali pod svetlobnim mikroskopom pri 400 kratni povečavi (Celar, 2000).



Slika 10: Hifa glive *Rhizoctonia solani* pod elektronskim mikroskopom, po odstranitvi antagonistične glive *Trichoderma* sp. Vidne so luknje, skozi katere je antagonistična gliva s pomočjo litičnih encimov prodrla v fitopatogena (foto: Weedwn in sod., 2000b)

Pri teh poskusih so ugotovili, da so interakcije gliv na s hranili bogatem gojišču v povprečju na nekoliko nižji ravni v primerjavi z revnejšim gojiščem (Celar, 2000). Torej, dokler je na razpolago dovolj hranil, se določeni antagonistični mehanizmi ne sprožijo. Mehanizmi, ki so jih opazili so pripenjanje na hife, ovijanje okoli njih, penetracija v hife

gostitelja. Pri glivah *T. koningii* in *G. roseum* je prišlo predvsem do granulacije, vakuolizacije, v nekaterih primerih pa tudi do lizije gostiteljevih hif. Samo v primeru *T. longibrachiatum* so opazili, da se je njena hifa neposredno vrasla v celice hife *S. sclerotiorum* (Celar, 2000).

Preglednica 1: Interakcije med hifami preučevanih antagonističnih in fitopatogenih gliv (Celar, 2000).

GLIVA	<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>	<i>T. koningii</i>	<i>G. roseum</i>
<i>F. solani</i>	G, L, R, V, O	G, Pr, V	V	G	G, R
<i>F. sambucinum</i>	G,	R, V	R, V	G, R	G
<i>F. moniliforme</i>	Pr, V	V	Pr, V	V	G, R
<i>R. solani</i>	O, Pr, V	G, O, Pr, V	G, O, Pr, V	G	G, R, L
<i>S. sclerotiorum</i>	L, O, P, V, Pr	G, Pr, R, V	G, L, R	G	G, L

Legenda: O – ovijanje antagonista okoli hif patogena, V – vzporedna rast hif antagonista ob hifah patogena, Pr – pripenjanje hif antagonista na hife patogena, P – penetracija hif antagonista v hife patogena, G – granulacija in vakuolizacija hif patogena, L – lizija (propad) hif patogena, R – nenormalno razvejanje in rast hif patogena (Celar, 2000)

5 INTERAKCIJE ANTAGONISTIČNIH GLIV Z VIŠJIMI RASTLINAMI

Antagonistične glive lahko s svojo rastjo in izločki pozitivno in negativno vplivajo na rast in razvoj višjih rastlin. Stimulativni učinki so lahko posledica spremenjene koreninske mikoflore, neposredni učinek rastno – stimulativnih snovi (hormoni, vitamini), pretvorba za rastline neizkoristljivih snovi v zanje uporabljive, zmanjšanje koncentracije snovi v tleh, ki zavirajo rast rastlin, itd (cit. po Celar, 2000). Največkrat se stimulativni učinki izrazijo tako, da seme rastlin nekoliko hitreje kali.

Negativni učinki se kažejo predvsem takrat, ko je količina inokuluma antagonistične glive zelo velika. Glive iz rodu *Trichoderma* lahko povzročijo delno zmanjšanje kaljivosti semen sladkorne pese in rasti korenin. Na koruzi so odkrili tudi patogene izolate gliv *Trichoderma*, gliva *Trichoderma koningii* pa izloča metabolit koninginin A, ki inhibira rast koleoptil pšenice (cit. po Celar, 2000).

6 SKLEPI

V sodobnem času je veliko povpraševanje po zdravi, neoporečno pridelani in predelani hrani. Ljudi ne zanima le kvantiteta, pač pa tudi kvaliteta. Poleg vse strožjih predpisov pri registraciji in uporabi kemičnih fitofarmaceutskih sredstev, pa predstavlja velik problem tudi odpornost nekaterih fitopatogenih gliv na le ta. Zato je postalo veliko povpraševanje po alternativnih metodah varstva. Ena izmed (trenutno) glavnih alternativnih metod je uporaba antagonističnih gliv. Prihodnost uporabe biozatravnih agensov je tako v biološkem kmetijstvu, kjer konvencionalno varstvo sploh ni dovoljeno, kot tudi v integriranem, kjer lahko zmanjšamo količino kemičnih pripravkov in s tem poskrbimo za zdravje ljudi in okolja. Ne smemo pa pozabiti, da gre pri biotičnem varstvu rastlin za žive organizme, ki za svoje delovanje potrebujejo specifične, razmere (temperatura, vlaga, ipd.),

ki se od organizma do organizma razlikujejo. Zato sta shranjevanje in aplikacija v odprtem sistemu nekoliko zahtevnejša.

7 VIRI

Academic dictionaries and encyclopedias. 2006. *Trichoderma harzianum*.

<http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/5629502> (13.7.2010)

Bellows T. S. 1999. Controlling soil – borne plant pathogens. V: Handbook of biological control. Bellows S.T., Fisher T.W. (eds.). California, Academic Press: 699 – 710

Bellows T. S. 1999. Foliar, flower and fruit Pathogens. V: Handbook of biological control. Bellows S.T., Fisher T.W. (eds.). California, Academic Press: 841 – 851

Butt T. M., Jackson C.W., Magan 2001. Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. Wallingford, CAB International: 305 str.

Celar F. 2000. Mehanizmi nasprotij med talnimi saprofitskimi in parazitskimi glivami. Dokt. dis. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 118 str.

Celar F. 2003. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological Control*, 28: 19 - 24

Celar, F. 2010. Pregled biotičnih agensov (biologija, način delovanja, pogoji za uporabo) za zatiranje rastlinskih bolezn ter entomopatogenih bakterij in entomopatogenih virusov za zatiranje rastlinskih škodljivcev, ki jih lahko uporabljajo pridelovalci živeža v Sloveniji. V: Delavnica Biotično varstvo rastlin pred škodljivimi organizmi 2010, Ljubljana, 12. maj 2010. *Izvečki predavanj*. Trdan S. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 35

Ertl di C. 2008. Blossom ProtectTM – The Effective Biological Alternative Against Fireblight. V: Zbornik referatov 2. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 31. januar – 2. februar 2008. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo: 31 – 35

Sea Grant. 2010. Chitin Research.

<http://www.ceoe.udel.edu/horseshoecrab/research/chitin.html> (13.8.2010)

Weedwn C. R., Shelton A., Hoffman M. P. 2000b. Biological control: a guide to natural enemies in North America. Geneva. Cornell University.

<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html> (6.8.2010)

Jenko J. Uporaba antagonističnih gliv za zatiranje rastlinskih bolezni.

Dipl. projekt (UN). Ljubljana. Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2010

Weedwn C. R., Shelton A., Hoffman M. P. 2000a. Biological control: a guide to natural enemies in North America. Geneva. Cornell University. Pathogens and antagonists of plant disease and post-harvest decay. *Ampelomyces quisqualis*.
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/pathintro.html> (15.8.2010)

ZAHVALA

Za strokovne nasvete, pomoč in razumevanje se zahvaljujem mentorju prof. dr. Franciju Acu Celarju in recenzentki doc. dr. Ireni Maček.

Za vsestransko pomoč in oporo tekom študija se zahvaljujem svoji družini.