

MAGYARORSZÁGON TERMESZTETT ZÖLDSÉGEK RIZOSZFÉRÁJÁBÓL SZÁRMAZÓ *TRICHODERMA* IZOLÁTUMOK *IN VITRO* ANTAGONISTA KÉPESSÉGEINEK VIZSGÁLATA

Körmöczi Péter¹ – Danilović Gordana² – Jovanović Ljubinko³ – Manczinger László¹ –
Panković Dejana² – Vágvölgyi Csaba¹ – Kredics László¹

¹ Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék, 6726
Szeged, Közép fasor 52, Magyarország, kormoczpeti@gmail.com

² Faculty of Environmental Protection, Educons University, 21208 Sremska Kamenica, Vojvode Putnika 87,
Szerbia, dejanapankovic@yahoo.co.uk

³ Faculty of Ecological Agriculture, Educons University, 21208 Sremska Kamenica, Vojvode Putnika 87,
Szerbia, jovainko@gmail.com

Bevezetés

A *Trichoderma* fonalgomba-nemzetség (*Hypocreales* rend, *Ascomycota* törzs) tartozó képviselői közül számos faj kitűnő antagonistákkal rendelkezik különféle növénypatogén gombákkal szemben, ezáltal ígéretes jelöltjei lehetnek a növénytermesztésben a gombák elleni biológiai védekezés megvalósításának. A *Trichoderma* törzsek biokontroll képességeinek alapjául szolgáló mechanizmusok közé tartozik a mikoparazitizmus, az antifungális metabolitok termelése útján megvalósuló antibiózisz, továbbá a tápanyagokért és az élőhelyért folytatott kompetíció. A *Trichoderma* törzsek képesek a növények védekező rendszerének indukálására, valamint a növények növekedésének serkentésére is (Harman és mtsai. 2004).

Munkánk során a mezőgazdasági talajok vizsgálatát helyeztük előtérbe, mely fontos információkkal szolgálhat a *Trichoderma* nemzetség biodiverzitásáról, valamint megfelelő forrása lehet a jó biokontroll képességekkel rendelkező *Trichoderma* törzsek szelektálásának.

Jelen tanulmány célja a *Trichoderma* fajok összetételének vizsgálata különböző zöldségek rizoszférájából származó mintákban, valamint az újonnan izolált és azonosított törzsek *in vitro* antagonizmusra való képességének vizsgálata.

Irodalmi áttekintés

A *Trichoderma* nemzetség fajösszetételének vizsgálatát már számos természetes ökoszisztémában elvégezték molekuláris módszerekkel, beleértve közép-európai ártéri erdőket (Wuczkowski és mtsai. 2003), Duna-menti ártéri erdőket (Friedl és mtsai. 2012), és Oroszországból, Nepálból, Észak-Indiából (Kulling és mtsai. 2000), valamint Délkelet-Ázsiából (Kubicek és mtsai. 2003), Kínából (Sun és mtsai. 2012), Észak-Afrikából (Sadfi-Zouaoui és mtsai. 2009) és Dél-Amerikából (Hoyos-Carvajal és mtsai. 2009) származó talajmintákat. Ezen tanulmányok számos új *Trichoderma* faj és genotípus leírásához vezettek. Viszonylag kevés tanulmány foglalkozott azonban mezőgazdasági művelés alá vont területekkel (Sadfi-Zouaoui és mtsai. 2009, Gherbawy és mtsai. 2004, Mulaw és mtsai. 2010, Naeimi és mtsai. 2011), pedig ezeknek az élőhelyeknek a tanulmányozása szintén fontos információkkal szolgálhat a *Trichoderma*

nemzettség biodiverzitásáról. A mezőgazdasági ökoszisztémák vizsgálata révén további lehetőség nyílt olyan *Trichoderma* törzsek izolálására, melyek jó biokontroll képességgel rendelkeznek, valamint fungicidekkel szembeni rezisztenciát is hordoznak.

Anyag és módszer

A *Trichoderma* törzsek izolálását különböző zöldségek (paprika, paradicsom, répa, saláta, spenót, tök, karalábé, petrezselyem, borsó, zeller) rizoszférájából származó talajmintákból végeztük el, melyek Magyarország különböző régióiból származtak (Szeged-Sziksós, Balástya, Szentés, Ózd, Veszprém, Hatvan). Az izolálás a zöldségek gyökerének felszínéről és a talajból történt diklorán–bengálrózsa táptalajon (King és mtsai. 1979). Az izolált törzseket a Szegedi Mikrobiológiai Gyűjteményben helyeztük el (SZMC; 1. táblázat).

Az izolátumok azonosítását és biodiverzitásuk felmérését az ITS (*internal transcribed spacer*) régió (ITS1-5.8S rDNS-ITS2) szekvenciájának elemzése útján végeztük (Naeimi és mtsai. 2011). A *Trichoderma* izolátumokat ITS-szekvenciájuk alapján az „*International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*” internetes honlapján (www.isth.info) elérhető, vonalkódokon (*barcoding*) alapuló *TrichOKEY* 2.0 (Druzhinina és mtsai. 2005) program segítségével azonosítottuk (a génbanki azonosítószámokat az 1. táblázat tartalmazza).

Az ígéretes törzsek *in vitro* antagonista képességének vizsgálatát *in vitro* agar-konfrontációs tesztek elvégzésével vizsgáltuk különféle növénypatogén gombákkal szemben, melyek között szerepeltek *Fusarium solani* (SZMC 11057F, SZMC 11064F, SZMC 11067F, SZMC 11070F) izolátumok, továbbá *F. oxysporum* (SZMC 6237J), *Alternaria alternata* (SZMC 10685), és *Phoma cucurbitacearum* (SZMC 16088) törzsek. A vizsgált *Trichoderma* törzsek esetében egy képanalízisen alapuló módszer (Szekeres és mtsai. 2006) segítségével meghatároztuk a Biokontroll Index (BCI) értékeket, ezáltal számszerűsíthetővé és egymással összevethetővé váltak a vizsgált törzsek *in vitro* antagonista képességei.

Eredmények és értékelésük

Munkánk során a különféle zöldségek rizoszférájából származó mintákból összesen 45 *Trichoderma* törzset izoláltunk sikeresen, melyek között 10 féle különböző *Trichoderma* fajt azonosítottunk. A továbbiakban 15 izolátumot választottunk ki az *in vitro* antagonizmus-vizsgálatok elvégzéséhez (1. táblázat), melyek között megtalálhatóak voltak a *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. longibrachiatum* és *T. viride* törzsek.

A képanalízisen alapuló módszer segítségével meghatározott Biokontroll Index (BCI) értékek meghatározása után elmondható, hogy a vizsgált izolátumok közül a két *T. asperellum*, valamint egy *T. atroviride* törzsnél mértük a legmagasabb BCI-értékeket a vizsgált 7 növénypatogén gombával szemben (2. táblázat). A *T. asperellum* SZMC 20866 izolátum esetében 3 növénypatogén gombával szemben mértük a legmagasabb BCI-értékeket, melyek a *F. solani* SZMC 11057F és SZMC 11064F törzsek esetében 79,76 és 75,78, míg a *P. cucurbitacearum* SZMC 16088 jelű törzsével szemben 81,35 voltak. Az *in vitro* konfrontációs vizsgálatokba bevont másik két *F. solani* izolátummal (SZMC 11067F és SZMC 11070F) szemben a *T. asperellum* SZMC 20786 jelű izolátumnál tapasztaltuk a legmagasabb BCI-értékeket (88,84 és 85,76). Ez az izolátum

volt képes továbbá a legnagyobb mértékben ránövekedni a vizsgált *A. alternata* izolátum telepére (BCI: 65,77). A *F. oxysporum* SZMC 6247J izolátummal szemben a legmagasabb BCI-értékeket a két *T. atroviride* (SZMC 20780 és SZMC 20781) esetében kaptuk (66,98 és 69,45).

1. táblázat. A vizsgált *Trichoderma* törzsek izolálásának és azonosításának adatai

Izolálás helye	Rizoszféra minta	Törzs szám	Génbanki azonosítószám	TrichOkey 2.0 eredmény	Legközelebbi NCBI BLAST találat
Szeged-Sziksósfürdő	karalábé (fehér)	SZMC 20852	JX173840	<i>T. pleuroticola</i>	
		SZMC 20853	JX173841	<i>T. harzianum</i>	
	paradicsom	SZMC 20761	JX173832	<i>T. harzianum</i>	
		SZMC 20762	JX173833	<i>T. harzianum</i>	
		SZMC 20769	JX173847	<i>T. harzianum</i>	
		SZMC 20779	JX173848	<i>T. virens</i>	
Veszprém	petrezselyem	SZMC 20866	JX173862	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>
		SZMC 20770	JX173856	<i>T. harzianum</i>	
			SZMC 20780	JX173860	azonosítatlan <i>Trichoderma</i>
	spenót	SZMC 20867	JX173863	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>H. orientalis</i>	
Szentes	paradicsom	SZMC 20783	JX173876	azonosítatlan <i>Trichoderma</i>	<i>T. gamsii</i>
Balástya	tök	SZMC 20868	JX173874	<i>T. citrinoviride</i>	
Ózd	répa	SZMC 20784	JX173868	<i>T. hamatum</i>	
	paradicsom	SZMC 20781	JX173866	<i>T. atroviride</i>	
Hatvan	fűszerpaprika	SZMC 20786	JX173869	<i>T. asperellum</i>	
	saláta	SZMC 20788	JX173872	<i>T. longibrachiatum</i>	
	zeller	SZMC 20869	JX173873	<i>T. harzianum</i>	

Table 1. Isolation data and identification details of the examined *Trichoderma* strains

(1) place of isolation, (2) rhizosphere sample (white kohlrabi, tomato, paprika, parsley, tomato, spinach, tomato, pumpkin, carrot, tomato, spice paprika, salad, celery respectively), (3) strain number, (4) GenBank accession number of ITS, (5) *TrichOkey* 2.0 diagnosis, (6) Closest valid NCBI BLAST hit

Az ígéretes biokontroll ágensként ismert *T. harzianum* (SZMC 20761, SZMC 20853, SZMC 20869, SZMC 20770, SZMC 20762), *T. virens* (SZMC 20779) és *T. gamsii* (SZMC 20783) fajok izolátumait is bevontuk az *in vitro* antagonizmus-vizsgálatokba. Az általunk meghatározott BCI-értékek alapján ezekről az izolátumokról elmondható, hogy képesek voltak ránövekedni a vizsgált növénypatogén gombákra, viszont a kapott BCI-értékek alacsonyabbak voltak, mint a *T. asperellum* és *T. atroviride* izolátumok esetében. A kísérleteink során azonosított *T. longibrachiatum* SZMC 20788 a *F. solani* SZMC 11057F törzssel szemben (60,19), míg a *T. citrinoviride* SZMC 20868 izolátum a *Phoma cucurbitacearum* törzssel szemben (61,98) mutatta a legmagasabb BCI értéket.

A gombák zöldpenészes fertőzésének okozójaként is ismert *T. pleurotica* SZMC 20852 izolátum a *F. solani* SZMC 11067F törzs kivételével a többi vizsgált növénypatogén gombával szemben 60-as BCI-érték feletti értékeket mutatott.

2. táblázat. A vizsgált *Trichoderma* törzsek Biokontroll Index (BCI) értékei

Vizsgált <i>Trichoderma</i>	Törzsszám	SZMC 11057F	SZMC 11064F	SZMC 11067F	SZMC 11070F	SZMC 6237J	SZMC 16085	SZMC 16088
<i>T. asperellum</i>	SZMC 20866	79,76	75,78	71,3	78,72	48,22	64,33	81,35
<i>T. asperellum</i>	SZMC 20786	77,76	64,45	88,84	85,76	48,66	65,77	80,63
<i>T. atroviride</i>	SZMC 20780	62,4	73,88	37,62	51,2	66,98	51,44	59,24
<i>T. atroviride</i>	SZMC 20781	63,92	55,72	39,92	48,39	69,45	54,16	56,83
<i>T. citrinoviride</i>	SZMC 20868	53,76	24,45	46,97	48,15	39,22	57,3	61,98
<i>T. gamsii</i>	SZMC 20783	60,82	50,39	39,97	59,36	59,33	49,22	60,14
<i>T. hamatum</i>	SZMC 20784	68,22	46,81	47,88	62,52	51,05	61,28	67,96
<i>T. harzianum</i>	SZMC 20761	63,08	65,83	63,37	64,92	49,82	60,78	61,2
<i>T. harzianum</i>	SZMC 20853	75,13	46,71	52,79	70,04	54,17	60,26	60,45
<i>T. harzianum</i>	SZMC 20869	42,19	42,06	37,83	38,4	45,71	18,02	14,92
<i>T. harzianum</i>	SZMC 20770	70,59	50,44	53,79	68,94	65,58	65,29	68,93
<i>T. harzianum</i>	SZMC 20762	63,69	52	47,91	59,77	60,46	59,33	57,84
<i>T. pleurotica</i>	SZMC 20852	64,54	62,84	47,1	68,06	63,43	61,01	63,88
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 20788	60,19	38,31	43	56,4	51,58	59,84	57,79
<i>T. virens</i>	SZMC 20779	40,65	35,95	53,44	49,08	41,37	25,07	35,6

Table 2. Biocontrol Index (BCI) values of the examined *Trichoderma* strains

(1) examined *Trichoderma* strains, (2) strain number, (3) examined plant pathogenic fungi

Következtetések

Az általunk elvégzett kísérletek alapján következtetésként elmondható, hogy Magyarország különböző régióiból származó zöldségrizoszféra-mintákból sikeresen izoláltunk és azonosítottunk *Trichoderma* törzseket, melyek közül 15 izolátummal *in vitro* antagonizmus tesztek végeztünk. Ez alapján elmondható, hogy az általunk izolált két *T. asperellum* (SZMC 20866, SZMC 20786) és egy *T. atroviride* (SZMC 20781) törzs rendelkezik a legmagasabb BCI-értékkal, ezáltal ígéretes jelöltjei lehetnek a növénypatogén gombákkal szembeni biológiai védekezés megvalósításának.

Összefoglalás

A klinikailag jelentős opportunistá patogén *T. longibrachiatum* és *T. citrinoviride* mellett a gombák zöldpenészes fertőzését okozó *T. pleurotica*, továbbá ígéretes biokontroll fajok (*T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. asperellum* és *T. gamsii*) hazai zöldségrizoszféra-mintákban történő előfordulását igazoltuk. Jelen tanulmány eredményei alapján megállapítható, hogy a zöldségek rizoszférája gazdag forrása lehet a potenciális biokontroll ágenseknek, melyekkel környezetbarát és ökológiailag biztonságos mezőgazdasági termelés valósítható meg. Az általunk vizsgált *T. asperellum* és *T. atroviride* törzsek jó *in vitro* antagonista képességekkel rendelkeznek

Fusarium törzsekkel, valamint egyéb növénypatogén gombákkal szemben, így ígéretesek lehetnek egy olyan gomba-alapú technológia kidolgozására, mellyel az ökológiai gazdaságokban fungicidok felhasználása nélkül is csökkenteni lehet a rizoszférában jelenlévő növénypatogén gombák mennyiségét.

Kulcsszavak: *Trichoderma*, zöltség, rizoszféra, biokontroll, *in vitro* antagonizmus

Köszönetnyilvánítás

Ez a közlemény az Európai Unió pénzügyi támogatásával valósult meg (Magyarország-Szerbia IPA Határon Átnyúló Együtműködési Program, PHANETRI projekt). A dokumentum tartalmáért teljes mértékben a Szegei Tudományegyetem, KNRET és a TTIK, Mikrobiológiai Tanszék, Magyarország valamint az Educons Egyetem, Környezettudományi Kar, Kamanc, Szerbia vállalják a felelősséget, és az semmilyen körülmények között nem tekinthető az Európai Unió és / vagy az Irányító Hatóság állásfoglalását tükröző tartalomnak.

Irodalom

- Harman, G.E., Howel, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev Microbiol* 2, 43-55.
- Wuczowski, M., Druzhinina, I., Gherbawy, Y., Klug, B., Prillinger, H. and Kubicek, C.P. (2003) Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiol Res* 158, 125-133.
- Friedl, M.A. and Druzhinina, I.S. (2012) Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology (UK)* 158, 69-83.
- Kullnig, C.M., Szakacs, G. and Kubicek, C.P. (2000) Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol Res* 104, 1117-1125.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C.M. and Szakacs, G. (2003) Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. *Fungal Genet Biol* 38, 310-319.
- Sun, R.Y., Liu, Z.C., Fu, K., Fan, L. and Chen, J. (2012) *Trichoderma* biodiversity in China. *J Appl Genet in press*, DOI: 10.1016/j.femsle.2005.08.034
- Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Rouaissi, M., Hajlaoui, M.R., Rubio, M.B., Monte, E., Boudabous, A. and Hermosa M.R. (2009) Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Can J Microbiol* 55: 154-162.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. and Bissett, J. (2009) Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet Biol* 46, 615-631.
- Gherbawy, Y., Druzhinina, I., Shaban, G.M., Wuczowsky, M., Yaser, M., El-Naghy, M.A., Prillinger, H.J. and Kubicek, C.P. (2004) *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycol Prog* 3, 211-218.
- Mulaw, T.G., Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S. (2010) The rhizosphere of *Coffea arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. *Diversity* 2, 527-549.
- Naeimi, S., Khodaparast, S.A., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi, C. and Kredics, L. (2011) Species patterns and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of Southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Res Commun* 39, 560-568.
- King, D.A. Jr., Hocking, A. D. and Pitt, J.I. (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. *J Appl Environ Microbiol*, 37, 959-964.
- Druzhinina, I., Kopychinskiy, A., Komoň, M., Bissett, J., Szakacs, G. and Kubicek, C.P. (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42, 813-828.

Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Manczinger, L. and Vágvölgyi, C. (2006) A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. J Microbiol Meth 65, 619-622.

***In vitro* antagonistic abilities of *Trichoderma* species isolated from the rhizosphere of vegetables grown in Hungarian soils**

Abstract

The species composition and *in vitro* antagonistic ability of *Trichoderma* isolates from the rhizosphere of different vegetables collected at different locations in Hungary was examined during this study. *Trichoderma* strains were isolated from the rhizosphere samples on dichloran-rose bengal medium. After purification of genomic DNA, the PCR amplification of the internal transcribed spacer (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) region and its sequence analysis were used for the identification of the isolates at the species level. Altogether, 45 *Trichoderma* isolates were identified from the examined samples. We selected 15 *Trichoderma* isolates from 9 species (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. pleuroticola*, *T. longibrachiatum* and *T. virens*) to examine their *in vitro* antagonistic abilities. *In vitro* antagonism was examined in dual culture tests against four *Fusarium solani* isolates, as well as 1-1 *F. oxysporum*, *Alternaria alternata* and *Phoma cucurbitacearum* strain. Biocontrol Index (BCI) values were determined for the particular isolates. We found the highest BCI values in the case of the two examined *T. asperellum* strains, SZMC 20866 and SZMC 20786 against the four *F. solani* (SZMC 11057F, SZMC 11064F, SZMC 11067F, SZMC 11070F) strains as well as *A. alternata* and *P. cucurbitacearum*. We also examined one *F. oxysporum* strain and our result showed that the isolate *T. atroviride* SZMC 20781 was the most effective against this plant pathogenic fungus. The results of the recent study suggest that the rhizosphere of vegetables may be a rich source of potential biocontrol agents for environment-friendly, organic agricultural production. Our *Trichoderma* isolates that are possessing good *in vitro* antagonistic activities against plant pathogenic fungi might be promising for the development of fungal-based products that are able to suppress plant pathogenic fungi in the rhizosphere of organic farmland soils.

Keywords: *Trichoderma*, vegetable, rhizosphere, bicontrol, *in vitro* antagonism