

IZVORNI ZNANSTVENI RAD

Biološki pristup suzbijanju zelene plijesni šampinjona u HrvatskojLorant Hatvani¹, Darko Vončina², Silvio Šimon³, Snježana Topolovec-Pintarić², Edyta Dermić², Laszlo Kredics¹, Miklos Tako¹, Csaba Vagvolgyi¹¹University of Szeged, Faculty of Science and Informatics, Department of Microbiology, Szeged, Kozep fasor 52, Hungary (lorant.hatvani@gmail.com)²Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za fitopatologiju, Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska³Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska**Sažetak**

Zelena plijesan, bolest koja širom svijeta uzrokuje značajne gubitke u uzgoju šampinjona (*Agaricus bisporus*), nedavno je zabilježena i u Hrvatskoj. Biološko suzbijanje predstavlja siguran i učinkovit način kontrole patogena, stoga su ciljevi ovog istraživanja bili izolacija, identifikacija i karakterizacija bakterija kao potencijalnih bioagensa u kontroli zelene plijesni šampinjona u Hrvatskoj. Soj bakterije *Bacillus subtilis*, izoliran iz komposta za uzgoj šampinjona, pokazao se učinkovit u potiskivanju rasta zelene plijesni, a bez štetnog utjecaja na domaćinsku gljivu. Ovaj soj se može smatrati potencijalnim agensom za primjenu u biološkom suzbijanju zelene plijesni šampinjona u Hrvatskoj.

Ključne riječi: *Agaricus bisporus*, zelena plijesan, *Trichoderma harzianum*, biološko suzbijanje, *Bacillus subtilis*

Uvod

Bolest zelena plijesan širom svijeta uzrokuje značajne gubitke u proizvodnji šampinjona (*Agaricus bisporus*) (Kredics i sur., 2010), a nedavno je zabilježena i u Hrvatskoj (Hatvani i sur., 2012). Uzročnici su identificirani kao *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* u Europi i kao *T. aggressivum* f. *aggressivum* u Sjevernoj Americi (Samuels i sur., 2002). Za razliku od ovih otkrića, zelenu plijesan šampinjona u Hrvatskoj je uzrokovala *T. harzianum*, što ukazuje na širenje spektra za šampinjon patogenih vrsta iz roda *Trichoderma* (Hatvani i sur., 2012). Zbog velikih gubitaka u proizvodnji suzbijanje zelene plijesni je od iznimne važnosti. Biološko suzbijanje predlaže se kao siguran i učinkovit način suzbijanja patogena. Nagy i sur. (2012) su uspješno primijenili različite vrste iz roda *Bacillus* u suzbijanju zelene plijesni uzrokovane *Trichoderma* vrstama u uzgoju bukovače (*Pleurotus ostreatus*), što bi mogao biti potencijalni način za suzbijanje uzročnika zelene plijesni i u uzgoju šampinjona. U ovoj studiji su iz uzoraka hrvatskih komposta za uzgoj šampinjona u kojima nije bilo uzročnika zelene plijesni izolirani bakterijski sojevi. Pronađen je izolat bakterije *Bacillus subtilis* za koji je utvrđeno da ima izvanredan inhibitorski učinak na rast micelija za šampinjon patogenih izolata *T. harzianum* (Hatvani i sur., 2012), a istovremeno ne utječe na razvoj šampinjona, tako da se može smatrati potencijalnim agensom za biokontrolu zelene plijesni šampinjona u Hrvatskoj.

Materijal i metode**Izolacija bakterija**

Polaganjem komadića komposta za uzgoj šampinjona u kojem nije bila prisutna zelena plijesan na površinu čvrstog YEGK medija (5 g l⁻¹ glukoze, 5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g l⁻¹ ekstrakta kvasca, 20 g l⁻¹ agara u destiliranoj vodi) u koji je prethodno dodano po 0.1 mg ml⁻¹

karbendazima i nistatina, izolirani su bakterijski izolati koji su naknadno održavani u istim uzgojnim uvjetima.

Konfrontacijski testovi

Potencijalno antagonističko djelovanje bakterija testirano je inokulacijom bakterijskih izolata na udaljenost 1 cm od ruba rastuće kolonije izolata MFBF 10389 vrste *T. harzianum* (Hatvani i sur., 2012) i kolonija vrste *Agaricus bisporus*. *A. bisporus* je ostavljen da raste na hranjivoj podlozi pet dana nakon čega je obavljena inokulacija sa bakterijskim izolatom te su rezultati očitani nakon dodatnih sedam dana, dok je u slučaju *Trichoderma* izolata inokulacija obavljena nakon jednog dana, a očitavanje rezultata dan nakon inokulacije.

Identifikacija vrste

Bakterijski izolat BAhr8 uzgojen je preko noći u 20 ml tekućeg medija YEG (2 g l⁻¹ ekstrakta kvasca, 5 g l⁻¹ glukoze u destiliranoj vodi) na 25°C u rotirajućoj tresilici (100 okretaja u minuti). Jedan mikrolitar kulture razrijeđen je u 50 µl redestilirane vode i korišten kao DNK kalup za PCR-amplifikaciju. Fragment DNK regije koji kodira za 16S ribosomske RNK umnožen je uz korištenje početnica Eub-8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i Eub-534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). Reakcijska smjesa za svaku reakciju (50 µl) sadržavala je 5 µl 10x pufera Taq s KCl i 15 mM MgCl₂, 5 µl 25 mM MgCl₂, 5 µl 2 mM mješavine dNTP (Fermentas), 1-1 µl 10 µM početnica, 33 µl redestilirane vode, 0.2 µl DreamTaq DNA polimeraze (5 U/ul, Fermentas) i 5 µl DNK kalupa. Umnožavanje je provedeno u uređaju za umnožavanje DNK Biometra T3 po protokolu kako sljedi: jedan ciklus od 2 minute na 94°C; 30 ciklusa 94°C 30 s, 51°C 45 s i 68°C 1 min.; jedan ciklus od 10 minuta na 68°C. Amplikon je sekvencioniran po protokolu opisanom od Vončina i sur. (2011). Sekvenca je podvrgnuta analizi algoritmom NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Rezultati i rasprava

Izolacija bakterija

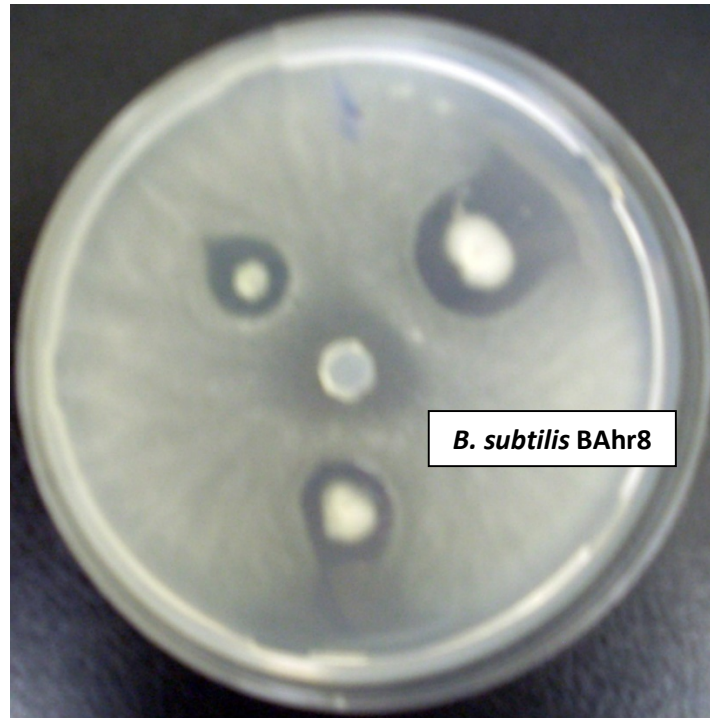
Dvadeset bakterijskih sojeva (BAhr1-20) je na temelju morfologije kolonija izolirano iz uzoraka komposta za uzgoj šampinjona bez zelene plijesni.

Konfrontacijski testovi

Izolat BAhr8 pokazao je najveće inhibitorno djelovanje (zona inhibicije: 4 mm, Slika 1) na rast micelija uzročnika zelene plijesni, bez narušavanja rasta domaćinske gljive, koja može u potpunosti prerasti koloniju bakterija.

Identifikacija vrste

Uspješan antagonist identificiran je na razini vrste kao *Bacillus subtilis*. Nagy i sur. (2012) su uspješno suzbijali zelenu plijesan uzrokovanu *Trichoderma*-vrstama u uzgoju bukovače (*Pleurotus ostreatus*) primjenom izolata *B. subtilis*, *B. licheniformis* i *B. amyloliquefaciens*. U istom istraživanju otkriveno je da je soj *B. amyloliquefaciens* povećao urod bukovače.



Slika 1. Konfrontacijski test između bakterijskog izolata i patogena šampinjona, soja MFBF 10389 vrste *Trichoderma harzianum*.

Zaključak

Izolat BAhr8 bakterije *B. subtilis* izoliran iz supstrata za uzgoj šampinjona u kojem nije bilo zelene plijesni u ovom istraživanju je iskazao najveće inhibitorno djelovanje na rast za šampinjone patogene gljive *T. harzianum* te je ocijenjen kao kandidat za biološko suzbijanje zelene plijesni u Hrvatskoj, što bi moglo biti alternativno rješenje za uspješno suzbijanje uzročnika ove značajne bolesti šampinjona.

Napomena

Projekt je realiziran uz potporu FEMS istraživačkog fonda, Europske unije i sufinanciranje Europskog socijalnog fonda (ugovor br. TAMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0012).

Literatura

- Hatvani L., Sabolić P., Kocsubé S., Kredics L., Czifra D., Vágvölgyi C., Kaliterna J., Ivić D., Đermić E., Kosalec I. (2012). The first report on mushroom green mould disease in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 63: 481-487.
- Kredics L., García Jimenez L., Naeimi S., Czifra D., Urbán P., Manczinger L., Vágvölgyi C., Hatvani L. (2010). A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Méndez-Vilas A. (ed.), 295-305. Badajoz: Spain. FORMATEX
- Nagy A., Manczinger L., Tombácz D., Hatvani L., Gyórfi J., Antal Z., Sajben E., Vágvölgyi C., Kredics L. (2012). Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. *IOBC/WPRS Bulletin*. 78: 289-293.

Samuels G. J., Dodd S. L., Gams W., Castlebury L. A., Petrini O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. 94: 146-170.

Vončina D., Šimon S., Đermić E., Cvjetković B., Pejić I., Maletić E., Karoglan Kontić J. (2011). Differential properties of *Grapevine virus B* isolates from Croatian autochthonous grapevine cultivars. *Journal of Plant Pathology*. 93: 283–289.

Biological approach for controlling *Agaricus* green mould disease in Croatia

Abstract

Green mould disease, causing huge losses in the cultivation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation, has reached Croatia as well. Biocontrol represents a safe and efficient means of plant pathogen control, thus the aims of the present study were the isolation, identification and characterization of bacteria as potential agents to control *Agaricus* green mould in Croatia. A *Bacillus subtilis* strain isolated from healthy *Agaricus* compost was found to suppress the growth of green mould without expressing harmful effect on the host mushroom. This strain might be considered as potential agent for being used in the biological control of *Agaricus* green mould disease in Croatia.

Key words: *Agaricus bisporus*, green mould, *Trichoderma harzianum*, biocontrol, *Bacillus subtilis*