

Szczepy *T. citrinoviride* i *T. simmonsii* indukujące odpowiedź pszenicy i hamujące wzrost fitopatogenicznego dla pszenicy *Fusarium culmorum*

Artur Nowak¹, Urszula Perlińska-Lenart², Zoia Pustova³, Patrycja Skalmowska², Sebastian Piłsyk², Grzegorz Janusz¹, Joanna Kruszewska², Jolanta Jaroszuk-Ściś¹

¹Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie·²Instytut Biochemii i Biofizyki PAN·³Podolski Państwowy Uniwersytet Agrarno-Techniczny

jolanta.jarozuk-scisel@mail.umcs.pl

Wstep

Grzyby należące do rodzaju *Trichoderma* bezpośrednio i pośrednio wpływają na wzrost i rozwój roślin, a zatem są wykorzystywane w biopreparatach.

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* odgrywają ważną rolę w biologicznej ochronie roślin ze względu na swoje właściwości antagonistyczne wobec patogenów, w tym grzybów z rodzaju *Fusarium*. Mykopasożytnictwo, kluczowy mechanizm działania *Trichoderma*, polega na rozpoznawaniu, ataku i niszczeniu komórek gospodarza. Proces ten rozpoczyna się od chemotaksji – ukierunkowanego wzrostu w kierunku metabolitów *Fusarium* – a następnie adhezji i oplatania strzępek patogena. *Trichoderma* spp. syntetyzują enzymy hydrolityczne, takie jak chitynazy, proteazy i glukanazy, które rozkładają ściany komórkowe *Fusarium* spp. Innym mechanizmem jest konkurencja o składniki odżywcze i przestrzeń, która dodatkowo ogranicza wzrost *Fusarium*. Zdolności mykopasożytnicze szczepów *Trichoderma* spp. sprawiają, że są one skutecznymi środkami biologicznego zwalczania, stanowiąc ekologiczną alternatywę dla chemicznych fungicydów.

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* odgrywają istotną rolę nie tylko jako czynniki biokontroli patogenów roślinnych, ale również jako induktory odporności roślin poprzez aktywację mechanizmów obronnych gospodarza. Jednym z kluczowych elementów tej stymulacji jest uruchomienie szlaków metabolicznych prowadzących do syntezy fitoaleksyn i lignin, które wzmacniają ściany komórkowe i ograniczają penetrację patogenów. Kluczowe znaczenie w tym procesie ma aktywacja enzymów takich, jak liza fenyloalaninowa (PAL, *phenylalanine ammonia-lyase*) oraz liza tyrozynowa (TAL, *tyrosine ammonia-lyase*), które inicjują fenylopropanoidowy szlak biosyntetyczny.

Materialy i Metody

Stymulacja odporności roślin zawieszoną
zarodników szczepów *Trichoderma*
spp. w stężeniu 1×10^5 cfu

Szczepy *Trichoderma*:
T. citrinoviride (OM1)
i *T. simmonsii* (PKB)

Testy biotyczne pomiędzy szczepami *Trichoderma* spp., a szczepem *F. culmorum*. Inkubacja w 28°C przez okres 7 dni. Określanie woelkoscí stefy inhibicji, stopnia otoczenia kolonii oraz redukcji wielkości kolonii fitopatogena.

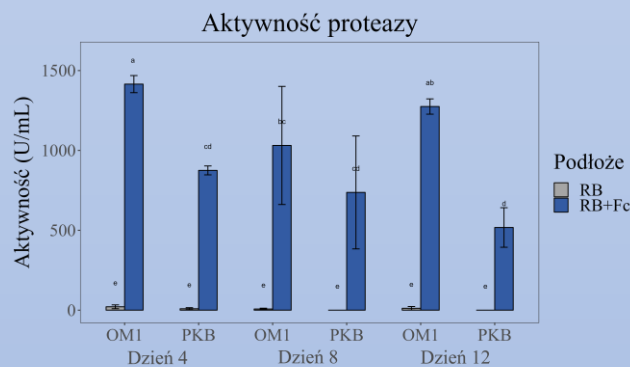
Ekstrakcja enzymów wewnątrzkomórkowych z łodyg i korzeni siewek pszenicy *Triticum aestivum* L. cv „Arkadia” po 7 dniach wzrostu za pomocą 50 mM buforu fosforanowego o pH 7.5 z dodatkami EDTA, PMSF i PVPP.

Hodowla plynna szczepów *Trichoderma* spp. na podłożu RB w dwóch wariantach: Kontrolna (K) z glukozą oraz Badana (Fc) ze zliofilizowaną ścianą komórkową szczepu *F. culmorum* w temperaturze 28°C w trzech punktach czasowych: 4, 8 i 12 dzień.

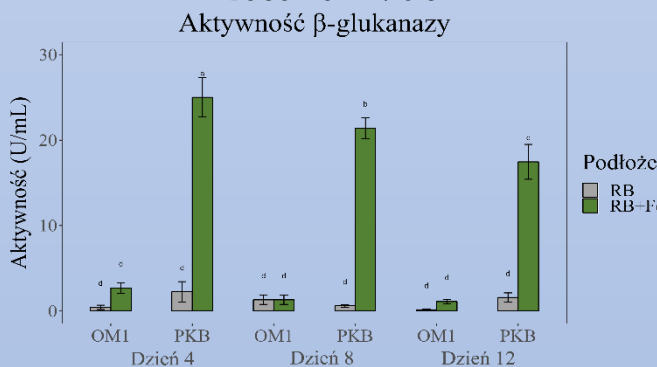
Oznaczanie aktywności enzymów zewnątrzkomórkowych w płynach pochodzących z szczepów *Trichoderma* spp. Aktywność β -glukanazy oznaczano w reakcji z laminaryną, gdzie następnie oznaczano ilość uwolnionej glukozy metodą DNS. Aktywność chitynazy oznaczano metodą z chityną koloidalną, a następnie oznaczano ilość uwolnionej N-acetylglukozaminy metodą DNS. Aktywność proteazy oznaczano w reakcji z kazeinąmianem sodu, gdzie następnie ilość uwolnionej tyrozyny metodą Folin-Ciocalteu.

Wyniki

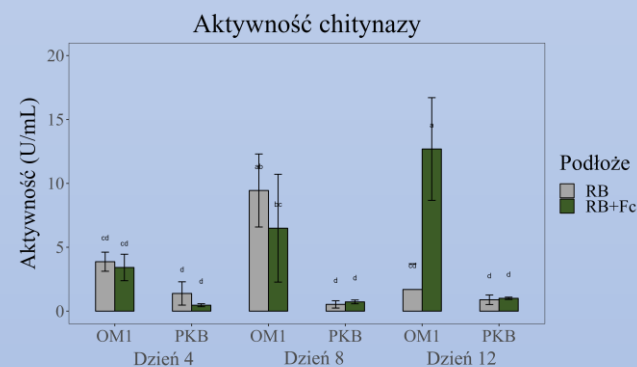
Badania *in vitro*



Rysunek 1. Aktywność proteazy uzyskanej z hodowli szczepów *Trichoderma* OM1 i PK1 na podłożu RB z glukozą oraz podłożu RB +Fc suplementowanym liofilizowaną ścianą komórkową szczepu *Fusarium*. Grupy oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (ANOVA + test Tukeya, $p < 0.05$).

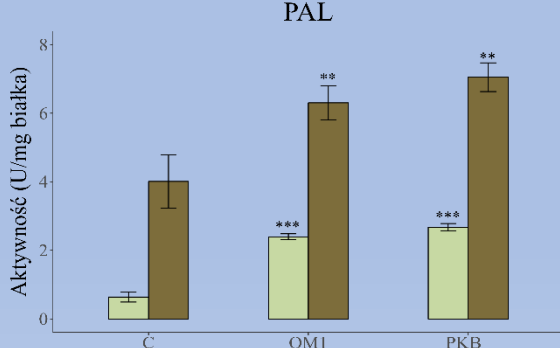


Rysunek 2. Aktywność β -glukanazy uzyskanej z hodowli szczepów *Trichoderma* OM1 i PK1 na podłożu RB z glukozą oraz podłożu RB +Fc suplementowanym liofilizowaną ścianą komórkową szczepu *Fusarium culmorum*. Grupy oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (ANOVA + test Tukeya, $p < 0.05$).

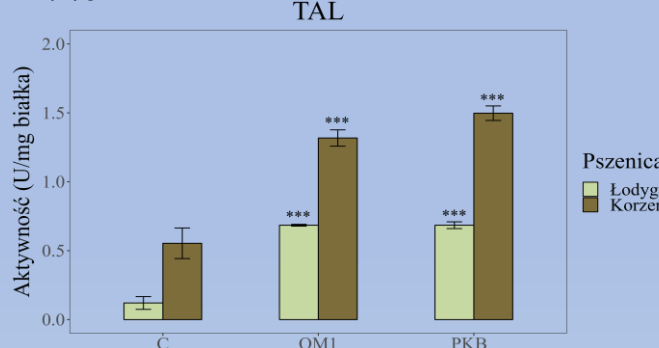


Rysunek 3. Aktywność chitynazy uzyskanej z hodowli szczepów *Trichoderma* OM1 i PK1 na podłożu RB z glukozą oraz podłożu RB +Fc suplementowanym liofilizowaną ścianą komórkową szczepu *Fusarium culmorum*. Grupy oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (ANOVA + test Tukeya, $p < 0.05$).

Badania *in vivo*



Rysunek 4. Aktywność lizy fenylalaninowej w łodygach i korzeniach pszenicy ozimej stymulowanej zarodnikami szczepów *Trichoderma* spp. OM1 i PKB po 7 dniach wzrostu w odniesieniu do pszenicy kontrolnej (C). Test Dunneta, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

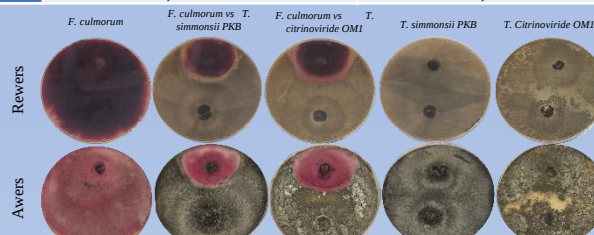


Rysunek 5. Aktywność liazy tyrozynowej w łodygach i korzeniach pszenicy ozimej stymulowanej zarodnikami szczepów *Trichoderma* spp. OM1 i PKB po 7 dniach wzrostu w odniesieniu do pszenicy kontrolnej (C). Test Dunneta, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Interakcje między szczepami

Tabela 1. Indeks Zasiadlania Niszy (NOI) wyliczony dla szczepów *Trihoderma* OM1 i PKB w odniesieniu do fitopatogenicznego szczepu *Fusarium culmorum* Fc37

Indeks Zasiedlania Niszy (NOI)		
Szczepy	Fc37-OM1	Fc37-PKB
Wartość	0,492 $\pm$ 0,009	0,612 $\pm$ 0,013



Rysunek 6. Interakcje biotyczne pomiędzy szczepami *Trichoderma* spp. OM1 i PKB oraz fitopatogenicznym szczepem *Fusarium culmorum* Fc37

Wnioski

- Szczepy *T. citrinoviride* (OM1) i *T. simmonsii* (PKB) zasiedlają inne nisze niż szczep *F. culmorum*
- Oba szczepy *Trichoderma* spp. wpływają na ograniczenie wzrostu fitopatogena poprzez wysoką aktywność enzymów z grup proteaz, glukanaz oraz chitynaz
- Wprowadzone na nasiona pszenicy szczepy *Trichoderma* spp. wpływają na wzrost aktywności szlaków lizy fenyloalaninowej i lizy tyrozynowej

Wartości wskaźnika zasiedlania niszy (NOI) obliczone na podstawie profili metabolicznych Biolog FF dla szczepów *Trichoderma*: *T. citrinoviride* (OM1) i *T. simmonsii* (PKB) oraz fitopatogenicznego *Fusarium culmorum* (Fc37) wyizolowanego z pszenicy wskazują, że zasiedlają one odmienne nisze niż fitopatogen, ale oba szczepy *Trichoderma* spp. redukują wzrost *F. culmorum* do 40%. Efekt hamujący wynikał najprawdopodobniej z oddziaływania mykopasożytniczego, gdyż oba szczepy *Trichoderma* spp. charakteryzowały się bardzo wysoką aktywnością proteazy, szczep PKB odznaczał się bardzo wysoką aktywnością β -glukanazy a szczep OM1 bardzo wysoką chitynazy. Oba szczepy *Trichoderma* (*T. citrinoviride* i *T. simmonsii*) wprowadzone w postaci zarodników na nasiona pszenicy wywoływały kilkukrotny wzrost aktywności enzymów szlaku fenylopropanoidowego liazy fenyloalaninowej (PAL) oraz liazy tyrozynowej (TAL) w korzeniach i łodygach pszenicy, co świadczy o indukcji odporności systemicznej pszenicy.

Zatem *T. citrinoviride* i *T. simmonsii* mogą chronić pszenicę przed fitopatogenicznym szczepem *F. culmorum* zarówno bezpośrednio jak i pośrednio.