

TULPINI DE TRICHODERMA CU POTENȚIAL ANTIFUNGIC ÎNALT FAȚĂ DE FITOPATOGENI

Sîrbu Tamara*, <https://orcid.org/0000-0001-7809-9870>

Moldovan Cristina, <https://orcid.org/0000-0003-1634-0344>

Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, Universitatea Tehnică a Moldovei

Chisinau, Republica Moldova

**e-mail: tamara.sirbu@imb.utm.md*

Summary. Fungal infections in agriculture lead to a significant decrease in crop yield, and their control can be carried out chemically or biologically. The biological way is more effective. In this study, the effectiveness of *in vitro* biological control against the fungal pathogens: *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* and *F. solani* was evaluated, using *Trichoderma atroviride* CNMN FD 25 and *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 strains as biological control agents. The obtained results demonstrated a high sensitivity of the metabolite solutions of *Trichoderma* strains to the tested phytopathogens, significantly reducing their growth. Therefore the strains *T. atroviride* CNMN FD 25 and *T. longibrachiatum* CNMN FD 27 can be used as biological control agents of crops.

Keywords: fungi, pathogens, zones of inhibition, biological control agents.

Introducere

Utilizarea produselor de origine chimică (pesticide, insecticide ș.a) au dus la degradarea mediului și a poluării apelor. Astfel, acum se caută metode alternative produselor chimice pentru a proteja și a stimula creșterea plantelor și a obține recolte bogate fără a dăuna mediului. O sursă inepuizabilă de obținere a produselor biologice de interes agricol sunt microorganismele, care contribuie atât la stimularea creșterii plantelor cât și ca protecție împotriva bolilor și dăunătorilor. Metodele biologice de protecție a plantelor folosind antagonismului dintre microorganismele din sol este foarte benefic, deoarece nu duce la denaturarea mediului. Antagonismul microorganismelor față de agenți patogeni constă în mai multe mecanisme, inclusiv competiția pentru spațiu și nutrienți, micoparazitismul, secreția de compuși cu activitate antifungică precum antibiotice sau toxine ucigăse, inducerea rezistenței la plante, precum și producerea de compuși volatili care pot juca un rol important în biocontrol. Utilizarea preparatelor obținute pe baza microorganismelor poate contribui nu numai la inhibarea creșterii agenților patogeni, ci și la îmbunătățirea calității culturilor și proprietățile solului, crescând astfel nivelul producției de alimente [8, 10]. Printre cele mai des utilizate microorganisme în producerea substanțelor biologice de interes agricol sunt fungii din genul *Trichoderma*. Astfel, tulpinile din genul *Trichoderma* contribuie la stimularea creșterii și modularea diferitor funcții ale plantelor, totodată asigură protecție plantelor față de diferiți fitopatogeni și dăunători [6, 7, 9]. *Trichoderma* este un gen de ciuperci ascomicete cosmopolit și oportunist, care include specii care sunt de interes pentru agricultură ca agenți de control biologic direct al fitopatogenilor. În colonizarea plantelor, pe rădăcini sau ca endofit, *Trichoderma* a dezvoltat capacitatea de a comunica cu planta și de a produce numeroase beneficii cu mai multe fațete gazdei sale [11].

Din punct de vedere aplicativ, stabilirea unor tehnologii de aplicare diversificate pentru *Trichoderma* este o direcție importantă de dezvoltare pentru rolul său în dezvoltarea durabilă a agriculturii. *Trichoderma* este genul unei ciuperci cosmopolite, comună în diferite tipuri de medii sau agroecosisteme. Are proprietăți diferite care îi conferă calități și funcții benefice, motiv pentru care i se oferă diferite utilizări, de exemplu, ca agent de biocontrol în controlul diferitelor boli

fungice și nematode ale plantelor, prin rezistență sistemică indusă sau directă, ca stimulent al creșterii plantelor, îmbunătățind absorbția apei și a nutrienților și producând fitohormoni, ca bioremediator [3, 4]

Mecanismele de acțiune a tulpinilor de *Trichoderma* asupra patogenilor sunt diferite, pot interacționa direct cu planta, promovând creșterea și oferind culturilor rezistență la fungii patogen, pot ataca ciupercile fitopatogenice. *Trichoderma* poate ucide direct agenții patogeni fungici ai plantelor prin antibioză, precum și prin strategiile de micoparazitism. moleculele produse de microorganisme, inclusiv fungii din genul *Trichoderma*, pot fi identificate pentru a imuniza plantele împotriva bolilor. la combaterea bolilor și a efectelor negative asupra mediului [5, 10]. *Trichoderma spp.* este folosită în principal pentru a controla bolile transmise de sol, precum și unele boli ale frunzelor și paniculelor diferitelor plante. *Trichoderma spp.* de asemenea, se comportă ca un agent de control biologic sigur, ieftin, eficient, ecologic pentru diferite specii de culturi [1, 2, 12, 13, 15].

Materiale și metode

În calitate de obiect de studiu au fost luate tulpinile fungice *Trichoderma atrobruneum* CNMN FD 25 și *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27, care au fost testate după proprietățile antimicrobiene față de fitopatogenii: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*. Tulpinile de fungi au fost cultivate pe mediul mal - agar. Activitatea antifungică a fost determinată după metoda difuziei metaboliților în mediul agrizat (din blocul cu *Trichoderma* în agarul infectat cu fitopatogen) [14]. Diametrul zonei de inhibiție a creșterii patogenului a fost măsurat după 4 zile de incubare la 28-30°C.

În etapa următoare tulpinile de *Trichoderma* au fost cultivate în medii lichide cu compoziția gr/l: *Trichoderma atrobruneum* CNMN FD 25 - extract de drojdii 10,0; glucoză - 30,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 1,0; NaNO₃ - 1,0; apă potabilă până la 1 litru; pH 6,0 -6,2, iar *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 - extract de porumb - 10,0; glucoză - 30,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 1,0; NaNO₃ - 1,0; CaCO₃ - 1,0 apă potabilă până la 1 litru; pH 6,0 – 6,2 la temperatura de 28-30°C, timp de 6 zile cu agitare continuă (160-180 r/min). Soluția de metaboliți a fost separată de biomasă prin filtrare. Au fost testate asupra fitopatogenilor soluțiile de metaboliți ai tulpinilor de *Trichoderma* în raport de 1:100; 1:200; 1:300; 1:400 (sol. metaboliți/apă distilată). În cutiile inoculate cu fitopatogeni au fost făcute godeuri cu diametrul de 8 mm în care au fost introduce câte 0,1ml soluție de metaboliți a tulpinilor de *Trichoderma*.

Rezultate și discuții

Tulpinile de *Trichoderma* sunt cunoscute ca antagoniste față de un spectru larg de fitopatogeni, care provoacă daune semnificative plantelor de cultură.

Testarea proprietăților antifungice a tulpinilor *Trichoderma atrobruneum* CNMN FD 25 și *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 față de fitopatogenii. *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. solani*, *F. oxysporum* a demonstrat o sensibilitate înaltă față de acestea (Fig. 1).

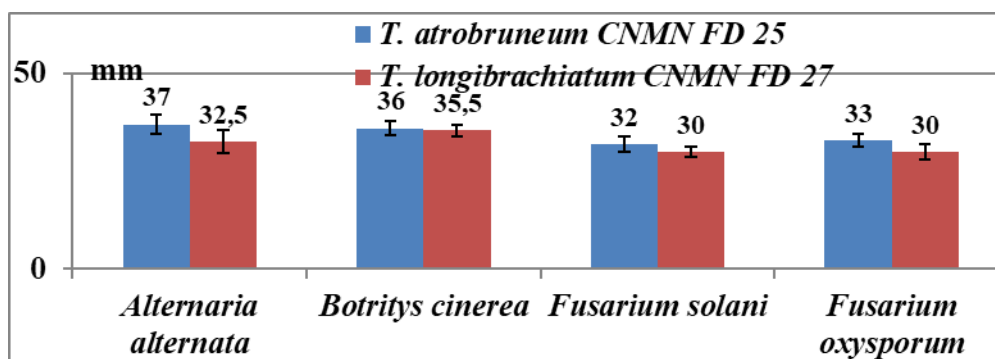


Figura 1. Zonele de inhibiție a fitopatogenilor sub acțiunea metaboliților de *Trichoderma*

Zonele de inhibiție a fitopatogenilor menționați sub acțiunea metaboliților tulpinii *Trichoderma atrovireneum* CNMN FD 25 variază în limitele 32 mm (față de *F. solani*) - 36 mm (față de *A. alternata*). Activitatea antifungică a tulpinii *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 a fost de asemenea înaltă, zonele de inhibiție a fitopatogenilor variind de la 30 mm (față de *F. solani* și *F. oxysporum*) până la 35,5 mm (față de *B. cinerea*).

În agricultură preparatele pe bază de *Trichoderma* sunt aplicate în formă solidă sau lichidă. Pentru a obține soluții de metaboliți ai tulpinilor de *Trichoderma* la următoarea etapă tulpinile *Trichoderma atrovireneum* CNMN FD 25 și *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 au fost cultivate submers în medii lichide, timp de 6 zile la temperatura 28-30°C, iar soluția de metaboliți obținută după separarea de biomasă în raport de 1:100; 1:200; 1:300; 1:400, cu apă distilată, a fost testată asupra fungilor patogeni luați în studiu. Astfel, în cutiile Petri inoculate cu fitopatogeni au fost făcute godeuri cu diametrul de 8 mm în care a fost introdus câte 0,1 ml soluție de metaboliți.

Zonele de inhibiție a fitopatogenilor testați sub acțiunea soluțiilor de metaboliți ai tulpinii *Trichoderma atrovireneum* CNMN FD 25 sunt prezentate în Tab. 1 și Fig. 2. Astfel, rezultatele prezentate demonstrează o sensibilitate înaltă a soluției de metaboliți față de fitopatogenii testați în toate concentrațiile studiate. Zonele de inhibiție a fitopatogenilor testați variind de la 28 mm (conc. 1:100) până la 17,5 (conc. 1:400), ceea ce denotă că proprietățile antifungice a tulpinii *Trichoderma atrovireneum* CNMN sunt foarte înalte. Soluția de metaboliți chiar și în concentrații mici (1:400) a demonstrat zone de inhibiție a tuturor fitopatogenilor ce variază în limitele 17,5 - 22,0 mm, deci poate fi utilizată la combaterea fitopatogenilor testați.

Tabelul 1

Activitatea antifungala a diferitor concentrații a soluției de metaboliți a tulpinii de fungi *Trichoderma atrovireneum* față de unii fungi fitopatogeni

Dilutia soluției de metaboliți	Diametrul zonelor de inhibiție a fitopatogenilor, mm			
	<i>B. cinerea</i>	<i>Alt. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
1:100	28,0 ± 2,5	28,0 ± 1,0	32,0 ± 2,0	29,0 ± 1,0
1:200	26,0 ± 1,2	26,0 ± 1,1	28,0 ± 1,5	24,0 ± 3,0
1:300	25,0 ± 2,0	22,5 ± 2,5	24,0 ± 1,0	20,0 ± 1,5
1:400	20,7 ± 2,5	17,5 ± 2,5	22,0 ± 1,0	20,0 ± 1,0

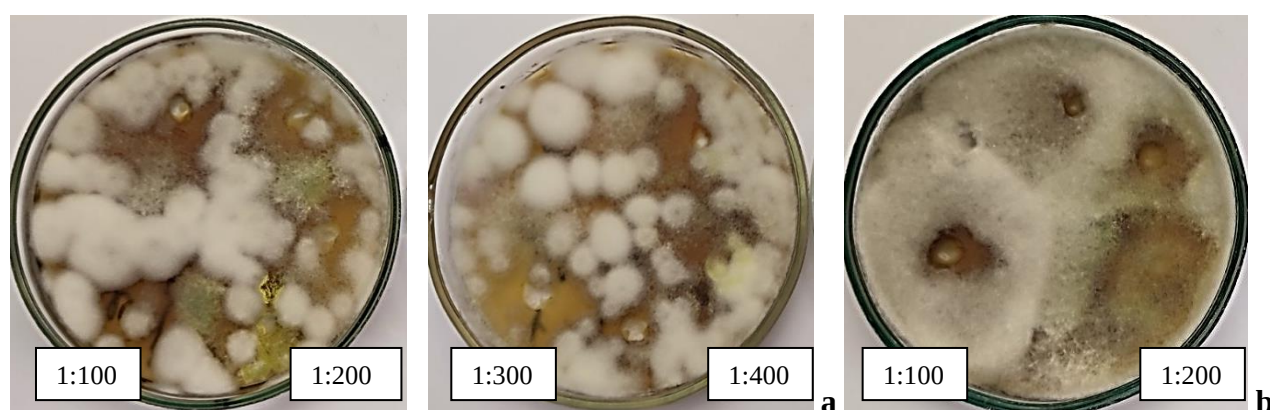


**Figura 2. Acțiunea soluție de metaboliți ai tulpinii *Trichoderma atrovireneum* CNMN FD 25 în dependență de concentrația utilizată asupra fitopatogenilor:
a – *Fusarium solani*; b – *Botrytis cinerea***

În variantele experimentale cu utilizarea soluție de metaboliți ai tulpinii *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 (Tab. 2, Fig. 3), indiferent de concentrația utilizată, a fost înregistrată o inhibiție totală a fitopatogenului *Alternaria alternata*. Zonele de inhibiție a celorlalte tulpini fitopatogene au variat în dependență de concentrația soluției de metaboliți utilizată. În variantele cu concentrația soluție de metaboliți 1:100 zonele de inhibiție au variat în limitele 26,8 mm (față de *F. solani*) și 29,0 mm (față de *A. alternata*), iar în variantele cu concentrația de 1:400 zonele de inhibiție maxime de 18,0 mm au fost înregistrate față de *F. solani* și minime de 16,0 mm față de *F. oxysporum*, iar față de *Alternaria alternata* zonele au constituit 17,5 mm.

Tabelul 2

Activitatea antifungala a soluție de metaboliți ai tulpinii *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 față de fitopatogeni

Dilutia soluției de metaboliți	Diametrul zonelor de inhibiție a fitopatogenilor, mm			
	<i>B. cinerea</i>	<i>Alt. alternata</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
1:100	Inhibat total	29,0 ± 1,0	28,0 ± 1,0	26,8 ± 2,5
1:200	Inhibat total	23,5 ± 3,0	24,2 ± 1,8	26,7 ± 2,3
1:300	Inhibat total	23,0 ± 1,5	20,5 ± 1,5	22,0 ± 1,0
1:400	Inhibat total	17,5 ± 1,5	16,0 ± 2,5	18,0 ± 2,0

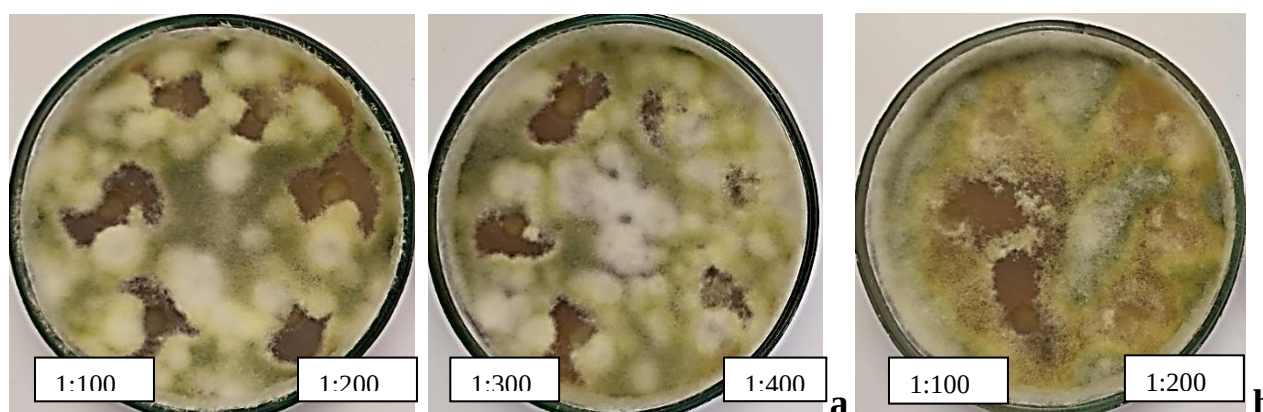


Figura 3. Acțiunea soluție de metaboliți ai tulpinii *Trichoderma longibrachiatum* SNMN FD 27 în dependență de concentrația utilizată asupra fitopatogenilor: a – *Fusarium solani*; b – *Botrytis cinerea*

Astfel, rezultatele prezentate în Tab. 2 și Fig. 3 denotă o sensibilitate înaltă a soluției de metaboliți ai tulpinii *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 față de toți fitopatogenii testați indiferent de concentrația utilizată.

Concluzii

La ora actuală, cea mai perspectivă și ecologică metodă de stimulare a creșterii plantelor de cultură și protecție față de boli și dăunători este utilizarea preparatelor microbiene obținute pe bază de microorganisme. Datorită mecanismului său de control biologic, tulpinile de *Trichoderma spp.* sunt aplicate pe larg în agricultură pentru stimularea și protecția plantelor de cultură, având totodată un rol important în stabilirea ecosistemului, dar și în promovarea agriculturii durabile

Rezultatele obținute în acest studiu au demonstrat că, tulpinile *Trichoderma atroviride* CNMN FD 25 și *Trichoderma longibrachiatum* CNMN FD 27 posedă sensibilitate înaltă față de fitopatogenii: *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* și *F. solani*, care provoacă daune mari sectorului agricol. Deci, aceste tulpini de *Trichoderma* pot fi considerate ca potențiali producători de substanțe antifungice eficiente pentru combaterea fitopatogenilor menționați.

Notă. Cercetările au fost efectuate în cadrul subprogramului 020101 InBioS – Soluții biotehnologice inovative pentru agricultură, medicină și protecția mediului.

Referințe bibliografice

1. Bastakoti S., Belbase S., Manandhar S., Arjyal C. *Trichoderma* species as biocontrol agent against soil borne fungal pathogens. In: *Nepal Journal of Biotech.* Dec. 2017, Vol. 5, No. 1, p. 39-45.
2. Gomathinayagam S., Persand S.A., Rekha M. Comparative study of biological agents *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for controlling brown spot disease in rice. In: *J. Biopest*, 5 (Supplementary), 2012, p. 28-32.
3. Gonzalez Basso Valeria, Di Barbaro Gabriela, Ribero Gustavo. *Trichoderma spp.*: characteristics and applications. In: *J. Applied Biotechnology & Bioengineering*. 2024; 11(1), p.18-22. DOI: 10.15406/jabb.2024.11.00354
4. Jang S., Kwon S.L., Lee H. et al. New Report of three unrecorded species in *Trichoderma harzianum* species complex in Korea. In: *Mycobiology*. 2018 Aug 24, 46(3), p. 177-184. Doi: 10.1080/12298093.2018.1497792.
5. Kubiak A., Wolna-Maruwka A., Agnieszka A. Pilarska, Alicja Niewiadomska and Agnieszka Piotrowska-Cyplik. Fungi of the *Trichoderma* genus: future perspectives of benefits in sustainable Agriculture. In: *Appl. Sci.* 2023, 13(11), 6434; <https://doi.org/10.3390/app13116434>
6. Martínez Y, Heeb M, Kalač T, Gholam Z, Schwarze FWMR, Nyström G, De France K. Biopolymer-based emulsions for the stabilization of *Trichoderma atroviride* conidia for biological control. In: *Appl Microbiol Biotechnol*. 2023 doi: 10.1007/s00253-023-12381-y.
7. Martinez Y, Ribera J, Schwarze FWMR, De France K. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. In: *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2023 Sep; 107(18):5595-5612. doi: 10.1007/s00253-023-12687-x.
8. Nowocień K., Sokołowska B. Use of microorganisms in plant protection against fungal diseases. In: *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, nr 603, 2020, p. 41–52. DOI 10.22630/ZPPNR.2020.603.18.
9. Ritesh Kumar, Pratik Samanta, Susanth Vijay Raj, Pratish Bera, and Mohammed Naimuddin. Potential and Prospects of *Trichoderma* in plant protection. Hindawi. In: *Advances in Agriculture*, Volume 2023, Article ID 5573662, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2023/5573662>
10. Roberto N. Silva, Valdirene Neves Monteiro, Andrei Stecca Steindorff, Eriston Vieira Gomes, Eliane Ferreira Noronha, Cirano J. Ulhoa. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal Biology*, 2019 Aug; 123(8): 565 - 583. doi:10.1016/j.funbio.2019.06.010.
11. Sheridan L. Woo, Rosa Hermosa, Matteo Lorito, Enrique Monte. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, Vol. 21, pages 312–326.
12. Yao X, Guo H, Zhang K, Zhao M, Ruan J, Chen J. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. In: *Front Microbiol*. 2023 May 3;14:1160551. doi: 10.3389/fmicb.2023.1160551.
13. Буракаева А.Д. Микофильные грибы в биотехнологии фунгицидных препаратов. In: *ВЕСТНИК ОГУ №6 (167)/июнь 2014*, с. 98-103.
14. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках. Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. М.: МГУ, Наука, 2004. 528 с.
15. Щербакова Т. Препарат глиокладин для биоконтроля белой гнили сои. // Межд. науч. конф. Микробиологическая биотехнология – наукоёмкое направление современных знаний. Кишинэу, 2011, ст. 229-230