

УПОТРЕБА ГЉИВЕ *Epicoccum nigrum* У БИОКОНТРОЛИ ПАТОГЕНА *Fusarium sambucinum*

АЛЕКСАНДАР ВЕМИЋ¹
ЗЛАТАН РАДУЛОВИЋ

Извод: Гљива *Epicoccum nigrum* је значајна врста за биоконтролу шумских патогена, која се показала значајном у сузбијању патогена из рода *Fusarium*. У раду је приказан, до сада недовољно проучен, антагонизам против комплекса врста *Fusarium sambucinum*. Резултати огледа *in vitro* су показали значајну инхибицију раста *Fusarium sambucinum* у односу на контролне културе. Утицај *Epicoccum nigrum* се огледао у спречавању раста и директном потискивању раста *Fusarium sambucinum*, иако није долазило до прерастања мицелије. Такође, врста *Epicoccum nigrum* је имала умањен раст у двојним културама, указујући да антагонистички потенцијал није апсолутан и да је за потпуно сузбијање *Fusarium sambucinum* неопходна већа примена ове гљиве. Добијени резултати омогућавају истовремено боље познавање биокологије *Epicoccum nigrum* и унапређење биолошке заштите против *Fusarium sambucinum*.

Кључне речи: *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sambucinum*, двојне културе, интеракција

THE USE OF *Epicoccum nigrum* IN THE BIOCONTROL OF *Fusarium sambucinum* PATHOGENS

Abstract: The fungus *Epicoccum nigrum* is a significant species for the biocontrol of forest pathogens, and has proven effective in suppressing pathogens from the genus *Fusarium*. This study presents the previously underexplored antagonism against the *Fusarium sambucinum* species complex. The *in vitro* experiments demonstrated significant inhibition of *Fusarium sambucinum* growth compared to control cultures. The impact of *Epicoccum nigrum* was evident in the prevention and direct suppression of *Fusarium sambucinum* growth, even though no overgrowth of the mycelium occurred. Additionally, *Epicoccum nigrum* exhibited reduced growth in dual cultures, indicating that its antagonistic potential is not absolute and that increased application may be required for the complete suppression of *Fusarium sambucinum*. The results obtained provide a better understanding of the bioecology of *Epicoccum nigrum* and contribute to the improvement of biological control against *Fusarium sambucinum*.

Keywords: *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sambucinum*, dual cultures, interaction

¹ др Александар Вемич, научни сарадник; др Златан Радуловић, виши научни сарадник
Института за шумарство Београд

1. УВОД

Биолошка контрола се дефинише као инхибиција развоја болести употребом других организама (Cook, R., Baker, K. 1983; Prospero, S. *et al.*, 2021). Биолошка контрола се сматра природном и мање штетном по животну средину у односу на хемијску контролу, и нуди прилику за побољшање мера заштите у ситуацијама када су конвенционални начини заштите ограничени (Collinge, D. *et al.*, 2022). Осим тога, тежи се развоју и примени овога начина заштите у што већој мери (Prospero, S. *et al.*, 2021), често из разлога што је хемијска контрола ограничена и оправдана само у случајевима расадника (O'Neill, T., 2020).

Савремено шумарство се сусреће са великим изазовима услед климатских или других промена које условљавају енфитоције као и ширења инвазивних болести. Потреба за применом биолошке заштите се огледа у проналажењу начина укључивања ових мера у стратегије интегралне заштите (He *et al.* 2021). У складу са тиме, истиче се потреба за упознавањем начина интеракције између различитих комбинација патогена и потенијалног агенса биолошке контроле.

Род *Fusarium* представља биљне патогене, који се појављују у различитим еколошким условима у свим деловима света (Summerell, B., 2019). У шумарству више десетина врста изазива штете, а за расаднике и подмладак шумских и украсних дрвенастих врста најзначајнији патогени овог рода су *Fusarium avenaceum*, *Fusarium blasticola*, *Fusarium herbarium*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium solani*, итд. (Караџић, Д., 2010). У новије време, истиче се значај раније недовољно проученог комплекса врста *Fusarium sambucinum*; као и потреба за што ефикаснијом и еколошки прихватљивијом контролом шумских патогена (Balla, A. *et al.*, 2021). Контрола рода *Fusarium* у новије време укључује покушаје редовне примене биолошких мера заштите, од којих се првенствено користе бактерије за поспешивање раста, гљиве рода *Trichoderma* и микоризне врсте гљива (Okorski, A. *et al.*, 2014). У томе смислу, врсте рода *Epicoccum* представљају агенсе биоконтроле многих шумских патогена, при чему посебну пажњу треба посветити *Epicoccum nigrum* Link (Taguam, J. D. *et al.*, 2021). Такође, *Epicoccum nigrum* се показао као ефикасан антагониста приликом сузбијања одређених припадника рода *Fusarium* – *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* и *Fusarium oxysporum* (Ogórek, R., Płaskowska, E. 2011; Rodrigo, S. *et al.*, 2018). Због тога, потребно је даље наставити истраживања утицаја овог агента биолошке заштите на друге припаднике рода *Fusarium* како би се постигао отпималан степен заштите против већег броја патогена, нарочито услед још увек неразјашњене таксономске ситуације унутар овога рода.

У складу са горе наведеним, циљ овога истраживања је био да се испита интеракција *Epicoccum nigrum* са припадником *Fusarium sambucinum* комплекса врста у огледу *in vitro*. Добијени резултати ће потврдити значај *Epicoccum*

nigrum и на основу начина интеракције омогућити смернице за развој практичне примене ове врсте гљиве.

2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

2.1. Лабораторијске методе

Интеракција *Epicoccum nigrum* и *Fusarium sambucinum* је испитана коришћењем метода двојних култура. Изолати *Epicoccum nigrum* и *Fusarium sambucinum* су преузети из миколошке колекције Института за шумарство, Београд и Универзитета у Београду, Шумарског факултета. Делови мицелије тестираних гљива димензија приближно 5x5 mm су постављени на око 2.5 cm од ивице петри шоље. Контролне групе су садржале чисте културе од сваке гљиве. Оглед је садржао укупно 19 култура, од чега је било 9 двојник култура, док су контроле сваке гљиве имале по 5 култура.

Мерење димензија култура је извршено после 2 недеље, када је прва култура испунила петри шољу. Мерење двојних култура је извршено у два унакрсна правца, на местима највећег пораста мицелије. Мерење контролних култура је извршено у два унакрсна правца, од центра културе. Аритметичка средина измерених вредности је коришћена као показатељ димензија.

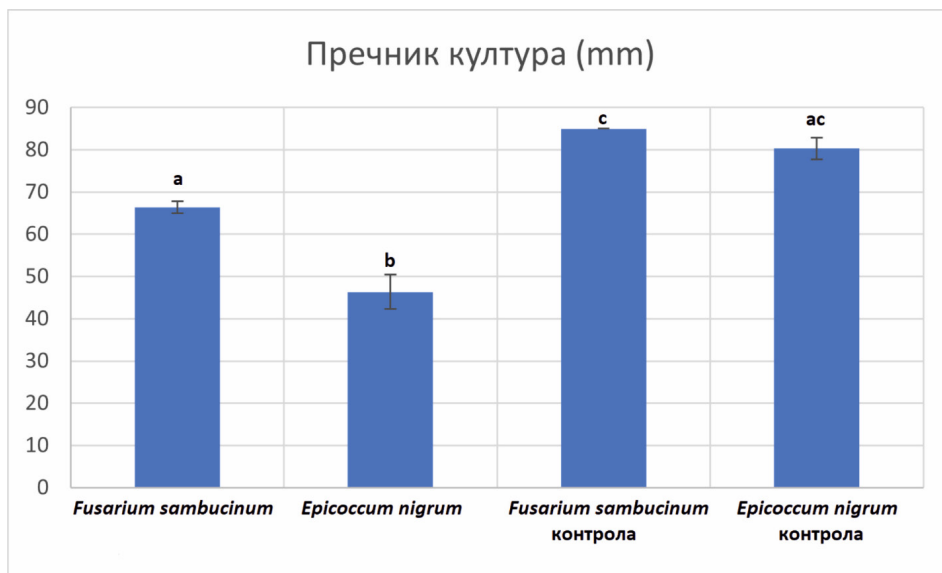
2.2. Статистичке методе

Нормалност расподеле је тестирана Колмогоров Смирновим тестом, са Лилефирсовом корекцијом. Хомогеност варијанси је тестирана Левеновим тестом. У складу са добијеним резултатима, изабрани су непараметријски тестови. Крускал Валисов тест је коришћен за поређење димензија двојних и контролних култура. Данов пост хок тест је коришћен за поређење различитих парова култура. Све статистичке анализе су извршене коришћењем софтвера SPSS 27.

3. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

Крускал Валисов тест је показао статистички значајну разлику у расту култура ($H = 25.193$, $p < 0.001$; графикон 1). Постојала је статистички значајна разлика између раста *Fusarium sambucinum* у двојним културама и контролним културама, на основу Дановог пост хок теста (графикон 1). Односно, *Fusarium sambucinum* је имао мањи раст у двојним културама, у односу на контролне културе (графикон 1). Такође, *Epicoccum nigrum* је показао статистички значајно мањи раст у двојним културама у односу на контролне културе (графикон 1).

Између контролних култура *Epicoccum nigrum* и *Fusarium sambucinum* није постојала статистички значајна разлика у расту мицелије, као ни између раста *Fusarium sambucinum* у двојним културама и *Epicoccum nigrum* у контролним културама (графикон 1).



Графикон 1. Пречник култура тестираних гљива

Напомена: Статистички значајне разлике су означене различитим словима ($p < 0.05$)

Graph 1 Diameter of cultures of tested fungi

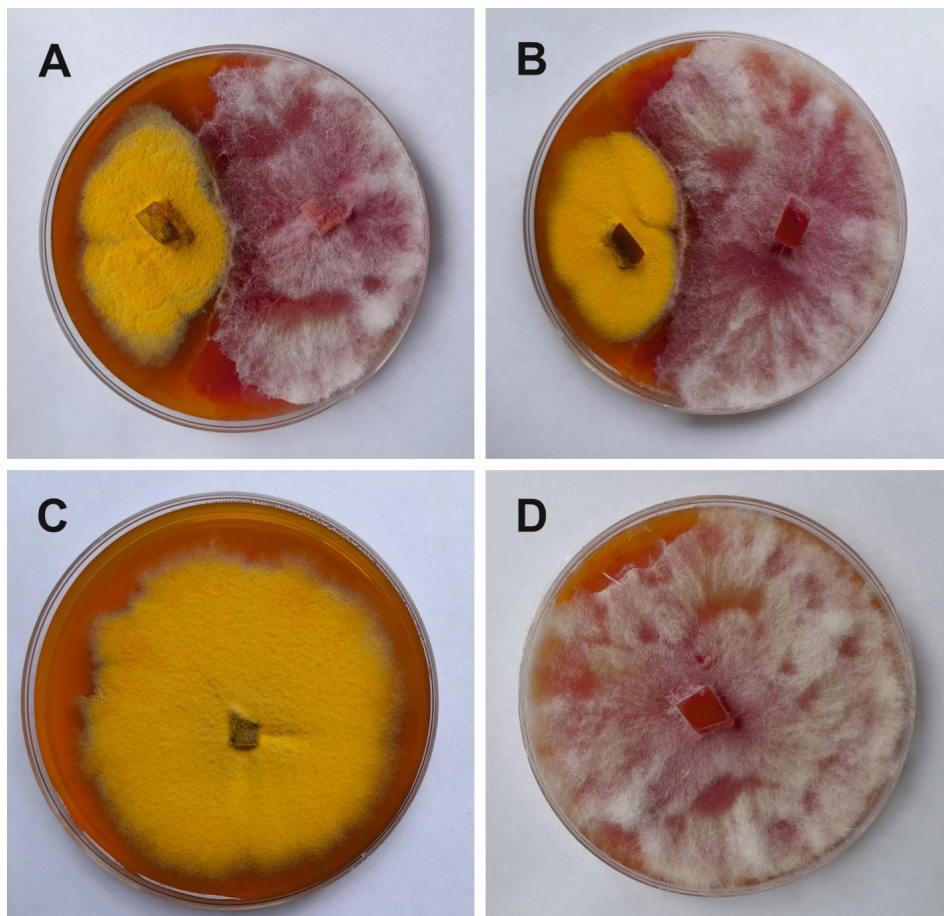
Note: Statistically significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$)

У свим двојним културама, мицелија *Fusarium sambucinum* је била ваздушна и бела, са црвеним зонама (слика 1). Такође, појава искључиво црвене мицелије *Fusarium sambucinum* је уочена и на деловима хранљиве подлоге поред ивице стандардне колоније (слика 1).

Са друге стране, мицелија *Epicoccum nigrum* је била жута, и у тренутку завршетка огледа, нису уочени обојени пигменти карактеристични за ову врсту (Слика 1). Ова појава указује да је потенцијално изостало лучење обојених пигмената, који су повезани са антифунгицим својствима ове врсте. Ипак, не треба искључити могућност појаве необојених пигмената са сличним својствима.

Антагонизам *Epicoccum nigrum* према *Fusarium sambucinum* се карактерисао на два начина: 1) заузимањем (ограничавањем) простора за раст; 2) директним потискивањем мицелије (слика 1). Ипак, директно потискивање мицелије није било присутно у свим културама, док ни у једном случају није дошло до прерастања мицелије.

Контролне културе су биле карактеристичне за ове врсте (слика 1). Културе *Epicoccum nigrum* су припадале морфотипу са жутом бојом, док су културе *Fusarium sambucinum* припадале морфотипу са белом и црвеном мицелијом. Конидије *Epicoccum nigrum* су биле одсутне, односно формиране у врло малом броју док се *Fusarium sambucinum* карактерисао обилном појавом макроконидија, које су бројне на различитим деловима културе.



Слика 1. Развој мицелије *Epicoccum nigrum* и *Fusarium sambucinum*:
 А-В – двојне културе (*Epicoccum nigrum* лево; *Fusarium sambucinum* десно),
 С – *Epicoccum nigrum* контрола; D – *Fusarium sambucinum* контрола
Figure 1 Development of *Epicoccum nigrum* and *Fusarium sambucinum*:
 А-В – dual cultures (*Epicoccum nigrum* left; *Fusarium sambucinum* right),
 С – *Epicoccum nigrum* control; D – *Fusarium sambucinum* control

Добијени резултати су показали потенцијал *Epicoccum nigrum* у биоконтроли *Fusarium sambucinum*. Постоји велика морфолошка варијабилност *Epicoccum nigrum* (Marari, S.A.S. et al., 2008; Favaro, L.C. et al., 2011; Li, T., et al. 2022). На тај начин, ова студија је показала да се коришћени морфотип може користити за биолошку контролу *Fusarium sambucinum*. Нарочито због тога, што је *Epicoccum nigrum* такође патоген на одређеним врстама дрвећа (Vemić, A. et al., 2023). Главни начин антагонизма се односио на спречавање раста кроз заузимање простора за раст и у мањој мери на потискивању ширења мицелије.

Употреба биолошких мера заштите се сусреће са изазовима који се односе на процес производње, начин и време примене, генотипа домаћина, и начина интеракције домаћина и патогена (Lahlali, R. *et al.*, 2022). У циљу препоручених метода примене биолошких препарата од истих аутора, који се односе на мешавине корисних организама и побољшања физиолошка и генетичка побољшања биолошких механизма, добијени резултати олакшавају процес практичне примене *Epicoccum nigrum* против *Fusarium sambucinum* комплекса врста.

Одређени родови и врсте патогена против којих се *Epicoccum nigrum* показао ефикасан су заступљени у различитим областима биотехнике, повремено и у више области истовремено. У циљу успешније производње и употребе пестицида на бази *Epicoccum nigrum* у наставку је приказан преглед најчешћих патогених организама у шумарству и хортикултури против којих је ова гљива показала ефикасност:

Табела 1. Преглед биоактивних својстава *Epicoccum nigrum* против патогених организама

Table 1 Overview of the bioactive characteristics of *Epicoccum nigrum* against pathogenic organisms

Патогени организам	Врста оштећења	Референца
<i>Stereum sanguinolentum</i>	Трулеж	Zimmermann, M. <i>et al.</i> (1995)
<i>Pythium debaryanum</i> <i>Pythium ultimum</i>	Полегање поника	Hashem, M., Ali, E. (2004)
<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Полегање поника Оштећења коре	Ogórek, R., Płaskowska, E. (2011)
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Пегавост листова Антрахноза	Preto, G. <i>et al.</i> (2017)
<i>Botrytis cinerea</i>	Сива буђ	Christova, P.K., Slavov, S.B. (2021)
<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Сушење јасена	Kosawang, C. <i>et al.</i> (2018) Kowalski, T., Bilański, P. (2021)

4. ЗАКЉУЧАК

У раду је приказана интеракција *Epicoccum nigrum* са *Fusarium sambucinum*, коришћењем метода двојних култура, као основа за развој биолошке контроле овога патогена. На крају је дат преглед најчешћих и најзначајнијих патогена у шумарству и хортикултури како би се биоконтрола *Fusarium sambucinum* употребом *Epicoccum nigrum* могла комбиновати са заштитом од других штетних организама.

Добијени резултати и закључци који из њих произилазе могу се приказати на следећи начин:

- постојала је значајна разлика у расту *Fusarium sambucinum* у двојним културама са *Epicoccum nigrum* у односу на контролне културе *Fusarium sambucinum*. Ова појава указује да је *Epicoccum nigrum* успешно инхибирао раст *Fusarium sambucinum*.
- раст *Epicoccum nigrum* у двојним културама је био значајно мањи у односу на контролне културе ове врсте, што указује да антагонизам против *Fusarium sambucinum* није био апсолутан и да је за ефикаснију биоконтролу потребна чешћа или већа примена ове гљиве.
- антагонизам *Epicoccum nigrum* према *Fusarium sambucinum* се није карактерисао прерастањем мицелије. Доминантна појава је била зазимање простора за раст, а у мањем обиму је констатовано директно потискивање раста *Fusarium sambucinum*.

Резултати ове студије омогућиће ефикаснији развој практичне примене *Epicoccum nigrum* као агенса биоконтроле патогених организама.

Напомена: Ово исцртавање је извршено у оквиру уговора о финансирању од стране Министарства науке, технолошкој развоја и иновација за 2024. годину број: 451-03-66/2024-03/200027.

ЛИТЕРАТУРА

- Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A.C., Moser, W.K., Nowakowska, J.A., Oszako, T., Benia, F., Belbahri, L. (2021): The Threat of Pests and Pathogens and the Potential for Biological Control in Forest Ecosystems, *Forests*, 12(11): 1579.
- Christova, P.K., Slavov, S.B. (2021): *Epicoccum nigrum* – isolation, characterization and potential for biological control of *Botrytis cinerea*, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 27 (4): 693-698.
- Collinge, D.B., Jensen, D.F., Rabiey, M., Sarrocco, S., Shaw, M.W., Shaw, R.H. (2022): Biological control of plant diseases – What has been achieved and what is the direction?, *Plant Pathology*, 71(5): 1024-1047.
- Cook, R., Baker, K. (1983): *The nature and practice of biological control of plant pathogens*, St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society.
- Fávaro, L.C., de Melo, F.L., Aguilar-Vildoso, C.I., Araújo, W.L. (2011): Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species, *PLoS One*, 6(8): e14828.
- Hashem, M., Ali, E. (2004): *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root-rot of cotton seedlings, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 37(4): 283-297.
- He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alvindia, D.G., Zhan, J. (2021): Biological Control of Plant Diseases: An Evolutionary and Eco-Economic Consideration, *Pathogens*, 10(10), 1311.
- Караџић, Д. (2010): Шумска фитопатологија, Универзитет у Београду, Шумарски факултет.
- Kosawang, C., Amby, D.B., Bussaban, B., McKinney, L.V., Xu, J., Kjør, E.D., Collinge, D.B., Nielsen, L.R. (2018): Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control, *Fungal Biology*, 122 (2-3): 110-120.

- Kowalski, T., Bilański, P. (2021): Fungi Detected in the Previous Year's Leaf Petioles of *Fraxinus excelsior* and Their Antagonistic Potential against *Hymenoscyphus fraxineus*, 12(10): 1412.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., Barka, E.A. (2022): Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective, *Microorganisms*, 10(3): 596.
- Li, T., Im J., Lee, J. (2022): Genetic Diversity of *Epicoccum nigrum* and its Effects on *Fusarium graminearum*, *Mycobiology*, 50(6): 457-466.
- Mapari, S.A.S., Meyer, A.S., Thrane, U. (2008): Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium, *Biotechnology Letters*, 30: 2183-2190.
- Ogórek, R., Płaskowska, E. (2011): *Epicoccum nigrum* for biocontrol agents in vitro of plant fungal pathogens, *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 76(4): 691-697.
- Okorski, A., Oszako, T., Nowakowska, J.A., Pszczółkowska, A. (2014): The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of *Oomycetes* and *Fusarium* fungi, *Leśne Prace Badawcze (Forest Research Papers)*, 75 (3): 301-321.
- O'Neill, T. (2020): Control of powdery mildew diseases on hardy nursery stock and herbaceous perennials, Factsheet 17/10, HNS and Herbaceous Perennials. Horticulture Development Company, Stoneleigh Park, Kenilworth, UK.
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J.A., Baptista, P. (2017): Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents, *Biological Control*, 110: 1-9.
- Prospero, S., Botella, L., Santini, A., Robin, C. (2021): Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality?, *Forest Ecology and Management*, 496: 119377.
- Rodrigo, S., Santamaria, O., García-White, T., García-Latorre, C. (2018): Antagonism *in vitro* and *in vivo* between fungal endophytes and *Fusarium moniliforme*, 10th International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses June 18-21, 2018 – Salamanca, Spain.
- Summerell, B.A. (2019): Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus, *Annual Review of Phytopathology*, 57: 323-339.
- Taguam, J.D., Evallo, E., Balendres, M.A. (2021): *Epicoccum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents, *European Journal of Plant Pathology*, 159: 713-725.
- Vemić, A., Popović, V., Janoušek, J., Radulović, Z. (2023): Destruction of *Fraxinus angustifolia* and *Fraxinus ornus* seeds under storage conditions caused by *Epicoccumnigrum*, *Forest Pathology*, 53(2): e12804.
- Zimmermann, M., Sieber, T.N., Holdenrieder, O. (1995): Preliminary evaluation of *Epicoccum purpurascens* as a biocontrol agent against wound pathogens on stems of *Picea abies*, *European Journal of Forest Pathology*, 25(3): 179-183.

THE USE OF *Epicoccum nigrum* IN THE BIOCONTROL
OF *Fusarium sambucinum* PATHOGENS

Aleksandar Vemić
Zlatan Radulović

Summary

This paper presents data on the interaction between *Epicoccum nigrum* and *Fusarium sambucinum* in dual cultures. The results showed a statistically significant reduction in the growth of *Fusarium sambucinum* in dual cultures compared to its control cultures. The antagonism of *Epicoccum nigrum* in dual cultures was characterised by occupying growth space and occasionally directly inhibiting the growth of *Fusarium sambucinum*. The colony sizes of *Epicoccum nigrum* in dual cultures were smaller than in control cultures. This phenomenon indicates that the inhibition of *Fusarium sambucinum* growth is not straightforward, and that *Epicoccum nigrum* exhibits a limited degree of antagonism. A review of the most common and important pathogens in forestry and horticulture that can be controlled with *Epicoccum nigrum* is provided. The review shows that *Epicoccum nigrum* can be used to control various diseases in forestry and horticulture, depending on the types of fungi against which it exhibits antagonism. The listed pathogens include: *Stereum sanguinolentum*, *Pythium debaryanum*, *Pythium ultimum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*, and *Hymenoscyphus fraxineus*. This data suggests that *Epicoccum nigrum* can be applied at different stages of damage to forest and ornamental plants, including during the succession of pathogenic organisms. All this knowledge should encourage the development of practical methods for using *Epicoccum nigrum* against diseases of forest and ornamental trees and shrubs.

