Odlike bakterioloških izolata iz lista jagode

Brajković, Dorotea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:256352

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

ODLIKE BAKTERIOLOŠKIH IZOLATA IZ LISTA JAGODE

DIPLOMSKI RAD

Dorotea Brajković

Zagreb, srpanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Fitomedicina

ODLIKE BAKTERIOLOŠKIH IZOLATA IZ LISTA JAGODE

DIPLOMSKI RAD

Dorotea Brajković

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Edyta Đermić

Zagreb, srpanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Dorotea Brajković**, JMBAG 0178095555, rođena dana 01. 04. 1994. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ODLIKE BAKTERIOLOŠKIH IZOLATA IZ LISTA JAGODE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Dorotee Brajković** , JMBAG 0178095555, naslova

ODLIKE BAKTERIOLOŠKIH IZOLATA IZ LISTA JAGODE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. Izv. prof. dr. sc. Edyta Đermić

   mentor _____

2. Doc. dr. sc. Darko Vončina

   član _____

3. Izv. prof. dr. sc. Martina Skendrović Babojelić

   član _____

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc Edyti Đermić koja mi je svojim idejama, savjetima, stručnim vodstvom i uvijek nasmiješenog lica, pomogla oko izrade diplomskog rada te omogućila rad u fitobakteriološkom laboratoriju Zavoda za fitopatologiju. Još jednom zahvaljujem profesorici na iskazanom strpljenju i prekrasnom mentorstvu.

Također, zahvaljujem se svojoj obitelji koja me je uvijek podržavala u mojim težnjama da postignem vlastite uspjehe. Njihova podrška uistinu mi je pomogla da prebrodim sve izazove tijekom studiranja.

SAŽETAK

Diplomskog rada studentice Dorotee Brajković, naslova

ODLIKE BAKTERIOLOŠKIH IZOLATA IZ LISTA JAGODE

Ozbiljne probleme u proizvodnji jagode čine različiti uzročnici bolesti. Najčešće i najpoznatije bolesti na jagodama uzrokuju mnogobrojne vrste fitopatogenih gljiva. Virusne i bakterijske bolesti su također prisutne i mogu dovesti do ozbiljnih ekonomskih šteta čije posljedice se lako mogu uvećati neznanjem o uzgoju jagoda. Pojedine fitopatogene bakterije nije lako otkriti. Katkada su njihovi simptomi nevidljivi. U ovom radu izvršena je izolacija svih bakterija iz simptomatičnog tkiva zaraženih listova jagode. Dobiveno je 10 različitih bakterijskih kolonija. Svakom izolatu određena je Gram reakcija i učinjen je test na fluorescenciju. Provedena je hipersenzitivna reakcija na duhanu (*Nicotiana tabacum* var. 'Samsun') i utvrđena je patogenost izolata 6 te je potom učinjen bio-test na sadnicama jagode. Nakon sedam dana od provedene inokulacije, nije potvrđeno postojanje simptoma nastalih od bakterijskih suspenzija istraživanih izolata.

Ključne riječi: *Fragaria x ananassa* Duch., patogeni, hipersenzitivna reakcija, detekcija

SUMMARY

Of the master's thesis – student Dorotea Brajković, entitled

BACTERIAL CHARACTERISTICS OF ISOLATES FROM STRAWBERRY LEAVES

Serious problems in strawberry cultivation can be caused by various plant pathogens. The most common and the most destructive diseases on the strawberries come from many types of phytopathogenic fungi. Viral and bacterial diseases are also present and can cause serious economic damage whose consequences can easily be increased by ignoring strawberry farming. Certain phytopathogenic bacteria are not easily detected. Sometimes their symptoms are invisible. This research carried out the isolation of all bacteria from the symptomatic strawberry tissue and found 10 different bacterial colonies. Each assay determined the Gram reaction and a fluorescence test was made. A hypersensitive reaction to tobacco (*Nicotiana tabacum* var. 'Samsun') was performed and the pathogenicity of isolate 6 was induced. A bio-test was carried out on strawberry seedlings. After seven days of inoculation, no symptoms of bacterial suspensions of the tested isolates were confirmed.

Key words: *Fragaria x ananassa* Duch., pathogens, hipersentitive reaction, detection

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Cilj istraživanja 1

2. PREGLED LITERATURE 2

2.1. Jagoda 2

2.1.1. Porijeklo i rasprostranjenost jagode 2

2.1.2. Proizvodnja jagode u svijetu i Hrvatskoj 3

2.1.3. Sistematika jagode 5

2.2. Morfologija jagode 6

2.3. Ekološki uvjeti za uzgoj jagode 10

2.3.1. Temperatura 10

2.3.2. Vlaga 11

2.3.3. Tlo 11

2.3.4. Položaj 12

3. BOLESTI JAGODE 12

3.1. Mikoze jagode 13

3.1.1. Obična pjegavost lista jagode 13

3.1.2. Crvena mrljavost lista jagode 14

3.1.3. Gnomonijska mrljavost lista jagode 15

3.1.4. Palež lista jagode 16

3.1.5. Siva plijesan jagode 17

3.2. Viroze jagode 18

3.2.1. Virus naboranosti jagode 20

3.2.2. Virus šarenila jagode 20

3.3. Bakterioze jagode 21

3.3.1. Bakteriozna poligonalna pjegavost jagode 22

3.3.2. Palež plodova jagode 24

3.3.3. Bolesti uzrokovane bakterijama iz roda *Pseudomonas* 25

4. ZAŠTITA JAGODE OD BOLESTI 27

5. MATERIJALI I METODE 29

5.1. Uzgoj i pročišćavanje bakterijskih izolata 29

5.2. Reakcija po Gramu 30

5.3. Stvaranje fluorescentnog pigmenta 30

5.4. Hipersenzitivna reakcija na duhanu 31

5.5. Bio-test na jagodama 32

6. REZULTATI I RASPRAVA 33

7. ZAKLJUČAK 42

8. POPIS LITERATURE 43

1. UVOD

Središnje mjesto u skupini jagodastog voća pripada jagodi čiji plod je vrlo ukusan i primamljivog izgleda. Zauzima sve veću gospodarsku važnost u proizvodnji iz razloga što plodovi rano dozrijevaju, privlačnog su izgleda i lako pronalazi mjesto na tržištu. Koristi se kao svježe voće, konzervirano ili zamrznuto. Uzgoj jagode omogućuje relativno brz povrat uloženog kapitala. Jagoda se brže i lakše razmnožava od ostalih voćnih vrsta, dobro se prilagođava različitim tipovima tala i klimatski čimbenicima. Rok berbe se može produžiti tako da se jagoda uzgaja na različitim nadmorskim visinama (Krpina i sur., 2004). Jagoda se u prošlosti uzgajala isključivo u vrtovima, ali u posljednje vrijeme njezin uzgoj je moguće vidjeti u blizini gradova i postaje sve zanimljivija kao ukrasna biljka.

Jagode koje su pretrpjele oštećenja tijekom zime i koje su izložene stresu su najpodložnije različitim bolestima. Plodovi jagode su nježni i također osjetljivi na bolesti, a kao takvi nisu pogodni za prijevoz niti za dugo čuvanje u svježem stanju. U proizvodnji jagoda veliku štetnost imaju zaraze patogenima koji se prenose sadnim materijalom, vektorima ili mehaničkim putem. Bolesti uzrokovane bakterijskom zarazom je teško otkriti, osim ako su vidljivi tipični simptomi (npr. kapljični iscjedak na biljnim organima ili plodu biljke) karakteristični samo za pojedine rodove bakterija. Zdrave biljke mogu sadržavati bakterije u svojim biljnim organima, ali one ne moraju biti patogene ili mogu činiti latentne (skrivene) simptome.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je izolacija bakterija iz simptomatičnog tkiva listova jagode i njihova biološka karakterizacija primjenom biotestova. Karakteristikama izolata u kultivaciji i rezultatima biotestova pokušat će se tumačiti bakteriološke odlike te patogenost bakterijskih izolata iz jagode.

Tijekom istraživanja, pažnja je usmjerena na simptome na listovima jagode koji su vizualno ukazivali na simptome nastale bakterijskim infekcijama.

2. PREGLED LITERATURE

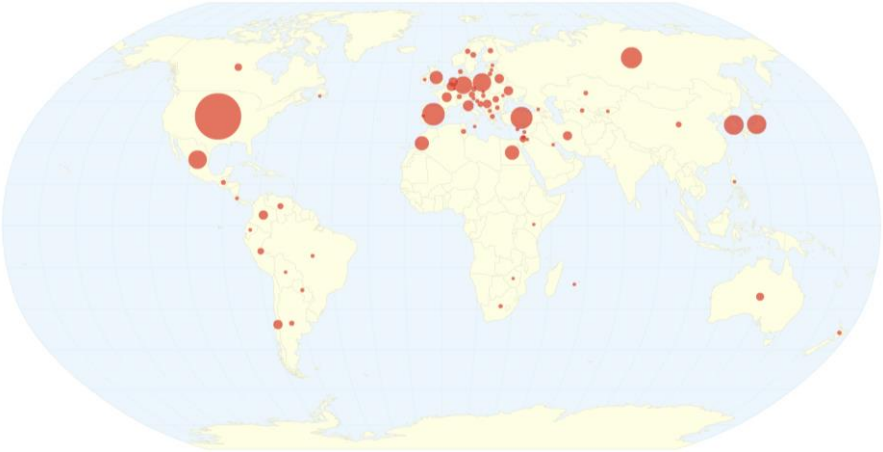
2.1. Jagoda

Jagoda (*Fragaria sp.*) je voćna vrsta koja se vrlo lako prilagođava različitim uzgojnim područjima (Šoškić, 2009). Ona je voće koje je čovjeku poželjno u prehrani od davnina. Narodna medicina pripisuje jagodi brojna ljekovita svojstva. Plodovi jagode imaju veliku hranjivu vrijednost zbog mnogobrojnih organskih i anorganskih sastojaka. Najvažniji sastojci jagode su šećer, kiseline, mineralne tvari, vitamini, pektini, tanini i drugi. Plod jagode sadrži veliku količinu vitamina C i ima malu kaloričnu vrijednost. Jagoda se koristi u svježem obliku, ali služi i za pripremu niza ukusnih prerađevina (kompota, soka, džema, …). Svježi plodovi jagode imaju kratku trajnost pa se njihova uporabna vrijednost produžuje dubokim zamrzavanjem. Danas se intenzivno radi na poboljšanju kakvoće plodova jagode i selekcionari tragaju za sortimentom koji je istovremeno najpogodniji za potrošnju u svježem stanju i za industrijsku preradu (Krpina i sur., 2004).

2.1.1. Porijeklo i rasprostranjenost jagode

Jagoda je među prvim voćem koje su ljudi počeli konzumirati. Prvi puta se spominje između 234.-149. pr.n.e. u spisima rimskog senatora Katula. U širenju uzgoja jagode i početku njenog oplemenjivanja, najveće zasluge su pripisane francuskom kralj Luju XIV. koji je sa svoga putovanja u Čile, u Francusku prenio čileansku jagodu. Engleski i francuski oplemenjivači su početkom 19. stoljeća imali najveći utjecaj u stvaranju novih sorti jagoda, a plodovi tih sorti su se odlikovali krupnoćom, lijepom bojom, aromatičnim svojstvima i dobrom kvalitetom (Šoškić, 2009).

Jagoda se može naći na području cijele Europe, u Aziji (Sibir do Viljujska, Jakutska i Nikolaevska na sjeveru; Sahalin, Japan, Kina, Tibet, Himalaji, Afganistan, Iran, pobrđe Crnog mora), u Sjevernoj i Južnoj Americi (Slika 1.1.) pokraj Tihog oceana (Volčević, 2008).



Slika 1.1. Svjetski prikaz uzgoja jagode u 2016. godini

(Izvor: http://chartsbin.com/view/43720)

2.1.2. Proizvodnja jagode u svijetu i Hrvatskoj

Glavni predstavnik jagodastih voćnih vrsta je jagoda čiji značaj se ogleda u veličini proizvodnje i prema važnosti njezinih plodova na tržištu. U prvoj polovici 18. stoljeća na području Europe nastao je hibrid *Fragaria* x *ananassa* Duch. križanjem *F. chiloensis* i *F. virginiana* te se od tada organizira prva veća proizvodnja jagoda. Od toga vremena, proizvodnja jagode se proširila na cijeli svijet i to na mjesta gdje god se nalaze povoljni uvjeti za njen rast i razvoj (Duralija, 2015). U zadnjih dvadesetak godina u svijetu se znatno povećava proizvodnja jagoda. Prema službenim podacima FAOSTAT (2017) za 2016. godinu, proizvodnja jagode u svijetu raste. Sjedinjene Američke države (SAD) su prve u proizvodnji s 1.133,703 tisuće tona jagode. Prvih 12 država u svijetu s najvećom proizvodnjom jagode vidljive su u Tablici 2.1.2.1.

Tablica 2.1.2.1. Prikaz proizvodnje jagode u tonama

Država	**Proizvodnje jagode u tonama (2016. godina)**
SAD	1.133,703
Španjolska	263,900
Turska	250,316
Rusija	230,400
Korea	203,227
Japan	193,000

Meksiko	176,396
Poljska	174,578
Njemačka	158,658
Egipat	104,000
Maroko	100,000
Ujedinjeno Kraljevstvo	87,200

(Izvor: FAOSTAT, 2017)

Uspoređujući proizvodnju jagode u Hrvatskoj, 2015. godine prema podacima FAOSTAT (2017) je proizvedeno 2,455 tona jagode, dok je 2016. godine proizvodnja dosegnula 3,118 tona. Ovi podaci ukazuju na porast proizvodnje jagode u Hrvatskoj. Uspoređujući sa susjednim zemljama, Hrvatska je među najmanjim proizvođačima jagode (Tablica 2.1.2.).

Tablica 2.1.2.2. Proizvodnja jagode u Hrvatskoj i u susjednim zemljama

Država	**Proizvodnje jagode u tonama (2016. godina)**
Italija	57,670
Srbija	33,129
Austrija	14,612
Bosna i Hercegovina	13,344
Mađarska	4,616
Hrvatska	**3,118**
Slovenija	1,762

(Izvor: FAOSTAT, 2017)

2.1.3. Sistematika jagode

Jagoda je zeljasta, grmolika i višegodišnja biljka koja pripada porodici ruža (*Rosaceae*). Unutar ove porodice nalazi se velik broj voćnih vrsta poput maline i kupine, ali jagoda je među ekonomski najznačajnijim kulturama za uzgoj.

Sistematika jagode:

Odjeljak: Spermatophyta

Pododjeljak: Magnoliophytina

Razred: Magnoliatae

Podrazred: Rosidae

Nadred: Rosanae

Red: Rosales

Porodica: Rosaceae

Podporodica: Rosoideae

Rod: *Fragaria*

Vrsta: *Fragaria* x *ananassa Duch*. (Nikolić i Milivojević 2010).

Volčević (2008) navodi kako se danas broji više od 2000 kultiviranih sorata jagode. One su nastale od 6 vrsta podijeljene u 4 grupe:

1. europska grupa - *F. vesca* L. (2n = 14) i *F. moschata* Duch. (2n = 42)
2. zapadnoamerička grupa - *F. chiloensis* Duch. (2n = 56) i *F. platypetala* Rydb.
3. istočnoamerička grupa - *F. virginiana* Duch. (2n = 56)
4. azijska grupa - *F. orientalis* Los. (2n = 38)

Najveći značaj među svim hibridima ima *F. ananassa* Duch. (2n = 56) koji je proizašao od *F. chiloensis* x *F. virginiana,* iz razloga što su od njega nastale sve današnje sorte krupnog ploda.

Prema broju kromosoma, sistematičari su do danas opisali 47 vrsta divljih jagoda i grupirali ih u četiri skupine: pet diploidnih (2n), dvije tetraploidne (4n), jedna heksaploidna (6n) i četiri oktoploidne (8n). Od većeg značaja je samo 12 vrsta samoniklih jagoda (Miloš, 1997).

2.2. Morfologija jagode

Prema Milošu (1997) jagoda je grmolika, zeljasta i višegodišnja biljka. Najkvalitetniji prirod plodova i najviše mladih sadnica jagoda ostvaruje prve godine nakon jesenske sadnje. Tijekom druge godine slabi joj vegetativni rast, prirod plodova je velik, ali slabije kvalitete. Najbolje je zasaditi novi jagodnjak nakon dvije do tri godine zbog postupnog slabljenja generativnog i vegetativnog rasta.

Na jagodi se razlikuju vegetativni organi (korijen, stabljika, list i vriježa) i generativni organi (cvijet, plod i sjeme) koji omogućuju preživljavanje vrste (Slika 2.2.1.).

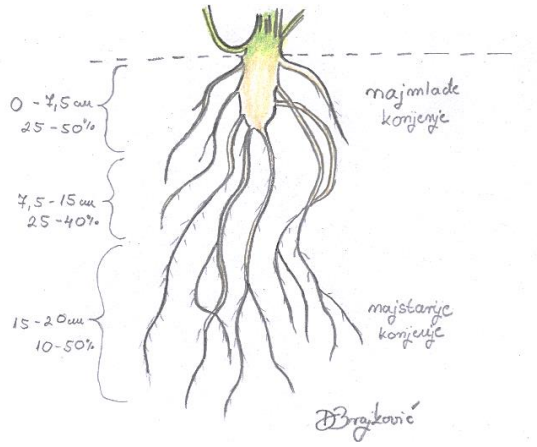
Slika 2.2.1. Jagoda

(original)

Vegetativni organi

Korijen

Korijen je podzemni vegetativni organ koji je razgranat, vlasast i žiličast. Većina korijenove mase nalazi se u tlu na dubini od 15 do 25 cm. Korijen može doprijeti do 50 cm, a na rastresitim tlima prodire i dublje. Širina korijenove mase je oko 30 do 40 cm. Korijen se sastoji od primarnih, sekundarnih i obrastajućih korijena te sitnih korijenovih dlačica (Slika 2.2.2.).



Slika 2.2.2. Prikaz korijenovog sustava jagode

(original)

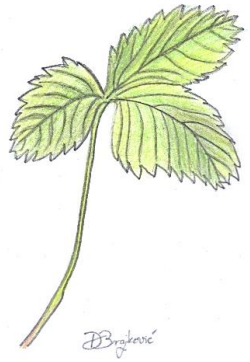
Rast korijena se odvija tijekom čitavog vegetacijskog perioda, a najintenzivniji rast se događa u jesen i proljeće. Uloga korijena je učvršćivanje biljke, usvajanje vode i mineralnih tvari iz tla te skladištenje organskih tvari. Prema građi i funkciji korijen dijeli se na više zona: zona korijenove kape, zona korijenovog rasta, zona izduživanja, zona korijenovih dlačica i zona grananja i provođenja tvari. (Miloš, 1997; Nikolić i Milivojević, 2010).

Stabljika

Stabljika je višegodišnji dio grma čija visina iznosi od 5 do 10 cm, a većim dijelom se nalazi u tlu. Uloga stabla je prijenos vode i hranjivih tvari do svakog biljnog organa jagode. Tvorna tkiva stabljike su ksilem i floem, a unutrašnjost (srž) stabla ispunjena je parenhimom (Nikolić i Milivojević, 2010).

List

Jagoda ima trodijelni list (Slika 2.2.3.). Iznimka je zimsko lišće o kojem ovisi prirod iduće godine, stoga je potrebno štititi ga od hladnoće zaštitnim materijalima (Miloš, 1997). List se sastoji od lisne osnove, lisne drške i liski. Boja lista varira od žutozelene do tamnozelene boje. Listovi jagode mogu imat različite oblike što je jedna od karakteristika različitih sortimenata i omogućavaju determinaciju sorata jagode. Životni vijek jednog lista iznosi oko 60 dana. Na jednoj biljci najčešće je prisutno od 20 do 40 listova. Unutar lista se odvijaju različiti fiziološki procesi poput fotosinteze, respiracije, transpiracije, gutacije itd. (Nikolić i Milivojević, 2010).



Slika 2.2.3. List jagode

(original)

Vriježa

Vriježa (stolon) je nadzemni puzeći izbojak koji je tanak, valjkastog oblika i duljina mu je do 1,5 m. Glavna uloga vriježe je razmnožavanje jagode (Slika 2.2.4.). Jedna biljka može proizvesti od 10 do 15 vriježa. Njihov razvoj kreće iz pupova smještenih u pazušcu novih listova (Galletta i Bringhurst, 1990). Stvaranje vriježa započinje tijekom berbe jagoda i nastavlja se uz ukorjenjivanje sadnice sve do pojave prvih mrazeva, dajući pritom nove mlade sadnice. Broj sadnica nije jednak, može ih biti od 8 do 30 po jednom grmu. Razvoj vriježa je u suprotnosti s prirodom plodova i stoga se u proizvodnim nasadima preporučuje uklanjanje vriježe, dok u matičnjacima treba odstranjivati cvjetove (Miloš, 1997).

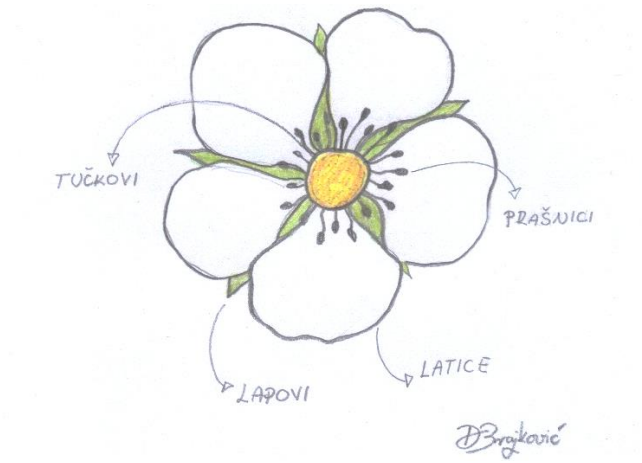
Slika 2.2.4. Prikaz vriježe

(original)

Generativni organi

Cvijet

Cvijet je generativni organ koji ima osnovnu ulogu u održavanju vrste (Slika 2.2.5.). Jagode imaju dvospolne i jednospolne cvjetove. Prema položaju cvijeta, razlikuju se oni koji se nalaze iznad, ispod ili u razini listova. Na jednoj zajedničkoj dršci može se nalaziti od 10 do 25 cvjetova. Cvijet jagode ima prosječno 5 latica, 10-16 lapova, 20-35 prašnika i 520-580 tučkova koji su pravilno raspoređeni. Cvjetovi mogu biti primarni, sekundarni, tercijarni i kvartarni (Mratinić, 2012). Kasni proljetni mrazevi mogu prouzročiti značajne štete na prvim cvjetovima jagode, jer su jagode, uslijed niskog rasta, izložene hladnom prizemnom sloju zraka. Cvijet jagode izmrzava na temperaturi od – 2 ˚C (Volčević, 2008).



Slika 2.2.5. Cvijet jagode i njegovi dijelovi

(original)

Plod

Plod jagode nastaje od većeg broja pojedinačnih jednosjemenih plodova oraščića povezanih ispupčenom i mesnatom cvjetnom ložom. Vidljivi dijelovi sastavljenog ploda jagode su odebljalo cvjetište, oraščići, čaška i peteljka (Slika 2.2.6.). Postoje različiti oblici plodova i mogu biti različite krupnoće. Ove karakteristike ploda su uvjetovane sortimentom i uvjetima uzgoja. Oblik ploda jagode varira od okruglog, spljoštenog, valjkastog, pa sve do klinastog, srcolikog, kruškastog i nepravilnog. Po krupnoći, plodovi se mogu grupirati u: vrlo krupne (čija masa je iznad 20 g), krupne (masa od 14-17 g), srednje krupne (mase koja se proteže od 11-14 g) i sitne (masa iznosi manje od 11 g) (Mratinić, 2012).

Sjeme

Sjeme jagode se razvija iz embrionalne vreće, a sastoji se od klice ili embrija, hranjivog tkiva (sekundarnog endosperma) i opne sjemenjače koja se naziva još i testa. Uloga sjemena je održavanje vrste (Nikolić i Milivojević, 2010).

Slika 2.2.6. Plod jagode

(original)

2.3. Ekološki uvjeti za uzgoj jagode

Uspješan uzgoj jagode ovisi o mnogobrojnim vanjskim čimbenicima poput klime, tla i položaja, ali velik značaj imaju i genetske karakteristike pojedinih sorata (Krpina i sur., 2004).

2.3.1. Temperatura

Krpina i suradnici (2004) navode kako je temperatura regulator svih bioloških funkcija da njezino kretanje treba biti što povoljnije, bez štetnog djelovanja na rast i razvoj jagode. Najpovoljnija temperatura za uzgoj jagode je od 18 ˚C do 22 ˚C danju i od 13 ˚C noću (Tablica 2.3.1.1.).

Isti autor dalje navodi kako niske temperature mogu nepovoljno djelovati na jagodu na način da prouzroče smrzavanje pojedinih dijelova ili cijelog grma jagode. Znatna oštećenja na jagodi mogu izazvati temperature ispod - 15 ˚C bez prisutnosti snijega dok ispod snježnog pokrivača jagoda može podnijeti i temperaturu do - 30 ˚C.

Tablica 2.3.1.1. Vrijednost temperatura u uzgoju jagoda

Optimalne temperature u aktivnoj vegetaciji	10 - 13 ˚C noć 18 - 22 ˚C dan
Kritična temperatura u aktivnoj vegetaciji	6 ˚C (biološki minimum)
Minimalna temperatura u vrijeme mirovanja	- 12 ˚C
Maksimalna temperatura u doba cvatnje	25 - 30 ˚C

(Izvor: Krpina i sur., 2004)

Neizravne štete čine visoke temperature. One tijekom vegetacije mogu negativno utjecati u periodima cvatnje jagode, za vrijeme oblikovanja plodova i u zrenju. Visoke temperature uzrokuju gubitak vlage iz biljke i tla te u konačnici imaju utjecaj na razvoj sitnih plodova lošije kvalitete, smanjenog priroda i smanjenog razvoja cijelog grma jagode. Nepovoljan utjecaj tijekom trajanja visokih temperatura je jače izražen na lošim, teškim, glinovitim ili laganim pjeskovitim tlima iz razloga što su na njima gubici vlage mnogo brži (Krpina i sur., 2004).

2.3.2. Vlaga

Jagoda se sadi vrlo gusto i ima veliku lisnu površinu koja isparava i stoga je neophodno da tlo sadrži 75 – 80% vlage. Tvorba novih listova kod jagode se događa tijekom cijelog vegetacijskog razdoblja. Za vrijeme suše formiraju se po 2 – 3 generacije lista, a ako se navodnjava, stvara 4 generacije listova. Ukoliko nedostaje vlage, cijela biljka ima manju bujnost, duljina faze cvatnje naglo opada, a plod ranije sazrijeva, sitniji je i nekvalitetan (Volčević, 2008).

2.3.3. Tlo

Najpogodnije tlo za uzgoj jagode je humusno pjeskovito – ilovasto tlo. U teškim tlima korijenje zaostaje u plitkom površinskom sloju, pa biljke trpe od suše. Iz prethodno navedenog razloga tlo s više od 60% čestica gline ili tlo s više od 70% pijeska nije pogodno za intenzivan uzgoj jagode. Također, treba paziti na korove jer oni oduzimaju hranu, vodu, stvaraju sjenu, potiču širenje bolesti i štetnika. Korove je moguće uspješno suzbiti obradom, pokrivanjem tla plastičnim folijama i upotrebom herbicida (Miloš, 1997).

2.3.4. Položaj

Najbolji položaji za uzgoj jagode su otvoreni, ravni ili blago nagnuti tereni koji su okrenuti prema jugu, jugoistoku ili jugozapadu. Loši položaji su zatvorene udoline u kojima se tijekom hladnih i vedrih noći nakuplja hladan zrak, a također i vrlo vjetroviti i previše nagnuti položaji (jako otjecanje vode, erozija i brže sušenje tla). Intenzivan uzgoj jagode zahtjeva nadmorsku visinu do 700 metara, ali za ljetnu proizvodnju jagoda mogu poslužiti i viši položaji (Krpina i sur., 2004).

3. BOLESTI JAGODE

Na jagodama je opisan veći broj bolesti, a mikoze (bolesti listova uzrokovane patogenim gljivama) su najčešće. Mikoze, u prvoj godini pojave, ne utječu u velikoj mjeri direktno na prirod jagode iz razloga što se u pojačano javljaju poslije berbe ili krajem vegetacije. Indirektno, postupno utječu na biljku u vidu njenog iscrpljivanja i smanjivanja njezine vitalnosti te smanjenog priroda u sljedećim godinama uzgoja jagode. Često se gljivične bolesti zanemaruju i ne provodi se pravilna zaštita. Bolesti poput pepelnice (*Podosphaera aphanis*), crvene mrljavosti lista (*Diplocarpon earlianum*) i obične pjegavosti lista (*Mycosphaerella fragariae*) se pojavljuju početkom vegetacije u proljeće i stoga bi suzbijanje trebalo biti obavezni dio programa zaštite jagode (Miličević, 2015). Danas su na našem tržištu dostupni prikladni fungicidi i njihova primjena u zaštiti jagode, u intenzivnim nasadima, je neizostavna. Biljni patogeni poput virusa i bakterija su odgovorni za povećane ekonomske gubitke diljem cijelog svijeta. Oni mogu prouzročiti različite simptome na biljnim organima. Bolesti biljaka uzrokovane biljnim virusima i bakterijama je teško kontrolirati zbog nedostatka učinkovitih proizvoda u svrhu njihove supresije. Iz navedenog razloga, preventivne mjere su najvažnija i glavna strategija u borbi s ovim biljnim patogenima. Unutar preventivnih mjera veliku značaj ima testiranje biljnog materijala na biljne patogene kako bi se potvrdilo da je sadni materijal zdrav i bez prisutnosti ekonomski najštetnijih patogena (Janse i sur., 2002; López i sur., 2001). Mnogi biljni virusi i bakterije su latentnog karaktera u biljnom materijalu i često dolaze u vrlo niskim koncentracijama, stoga je potrebno koristiti metode visoke osjetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti za njihovu detekciju. (López i sur., 2003).

3.1. Mikoze jagode

U našim agroekološkim uvjetima javljaju se obična pjegavost lista (*Mycosphaerella fragariae*), crvena mrljavost lista (*Diplocarpon earlianum*), gnomonijska mrljavost lista (*Gnomoniopsis comari*) i palež lista (*Phomopsis obscurans*) kao najraširenije i ekonomski najznačajnije bolesti listova jagode. Postoje i mnoge bolesti koje zahvaćaju korijen jagode i također uzrokuju velike štete. Pojava navedenih mikoza značajno ovisi o sortimentu jagode i o klimatskim čimbenicima poput temperature i vlage (Miličević, 2015).

3.1.1. Obična pjegavost lista jagode

Postoje brojni nazivi za ovu bolest: siva pjegavost lista, bijela pjegavost lista, okasta pjegavost lista, ljubičasta pjegavost lista, obična pjegavost lista i dr., što može činiti nejasnoće. Brojni nazivi su uzrokovani variranjem izgleda simptoma. Uzročnik ove bolesti je gljiva *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau koja je izraziti monofag (napada vrste roda *Fragaria*). *Ramularia tulasnei* Sacc. je naziv za njezin anamorfni (nespolni) stadij. On se javlja u obliku kratkih i snježnobijelih konidiofora s bezbojnim, višestaničnim i štapićastim konidijama koje vrše sekundarne zaraze.

Boja pjega kod ove bolesti se mijenjaj u ovisnosti o starosti zaraženog lista i o klimatskim čimbenicima u vrijeme nastanka zaraze i tijekom vegetacije. Simptomi su vidljivi u obliku smeđih pjega na mladim listovima, sivih pjega na listovima srednje starosti te potpuno bijelih pjega na starijim listovima (Slika 3.1.1.1.). Vidljiv je karakteristični ljubičasti obrub oko pjega nastao od tvorbe antocijana. Veličina pjega je 2 – 5 mm. U slučaju širenja pjega, može doći do odumiranja lista (nekroze). Simptomi su vidljivi i na lisnim peteljkama, dijelovima cvijeta te katkada i na plodovima jagode. Simptomi se uočavaju već u proljeće, a njihova se ekspresija intenzivira tijekom vegetacije.

Slika 3.1.1.1. Simptomi obične pjegavosti lista jagode

(Izvor: Miličević, 2015)

Gljiva prezimljava na inficiranom živom listu ili na otpalom listu na tri načina:

1. U vidu micelija koji stvara pseudotecije krajem zime (u navedenom slučaju je primarni inokulum askospora u proljeće)

2. Kao mikrosklerocij na otpalom lišću (u proljeće se stvaraju konidije – primarni inokulum)

3. U obliku konidija u zaraženim živim listovima na biljci (kliju u proljeće – produkcija konidija – primarni inokulum).

Moguća je pojava prezimljavanja gljive kombinacijom svih prethodno navedenih načina (Miličević, 2015).

3.1.2. Crvena mrljavost lista jagode

Uzročnik ove bolesti je gljiva *Diplocarpon earlianum* (Ell. & Ev.) Wolf koja se javlja u proljeće u vidu apotecija crne boje (na naličju lista). Anamorfni stadij naziva se *Marssonina fragariae* (Lib.) Klebahn. Ovaj stadij se javlja u formi acervula crne boje koji se stvaraju na gornjoj strani lista i njegov rast i razvoj vidljiv je u obliku pjega ili mrlja na listu. Acervuli uzrokuju sekundarne zaraze tijekom vegetacije.

Simptomi se prvo javljaju poput male tamno crvene mrlje, veličine 2 – 3 mm. Napredovanjem razvoja gljive, mrlje rastu na veličinu od 5 – 10 mm crvenkasto – smeđe boje. Kod jake zaraze, mrlje se spajaju, listovi postupno nekrotiziraju i na kraju se suše u cijelosti. Pjege i mrlje koje stvara ova gljiva nemaju bijeli središnji dio, što je glavna karakteristika ove bolesti (Slika

3.1.2.1.). Simptomi crvene mrljavosti listova mogu se pojaviti na peteljkama listova i na dijelovima cvjetova (cvjetna čaška, lapovi i cvjetna stapka).

Diplocarpon earlianum prezimljuje u obliku micelija unutar zaraženog lista, a krajem zime formira fruktifikacijske strukture (apotecije i acervule) (Miličević, 2015). Postoje tri vrste primarnog inokuluma koji ovisi o nastanku fruktifikacijskih struktura:

1. Apotecij (spolno tijelo na naličju lista) – primarni inokulum askospore

2. Formiranje acervula u proljeće na gornjoj strani lista – primrni inokulum konidije

3. Nastanak apotecija i acervula u proljeće – primarni inokulum čine askospore i konidije

Slika 3.1.2.1. Simptom crvene mrljavosti lista

(Izvor: Miličević, 2015)

3.1.3. Gnomonijska mrljavost lista jagode

Najčešći naziv koji se koristi za ovu bolest je mrljavost lista, ali se upotrebljava i naziv smeđa pjegavost lista. Ovu bolest uzrokuje *Gnomoniopsis comari* (Karst.) Songov. Navedeni stadij gljive javlja se u obliku peritecija. Oni su vidljivi golim okom i u velikom broju se pojavljuju uzduž lisne peteljke. U periteciju su smješteni askusi s askosporama. Anamorfni stadij gljive naziva se *Zythia fragariae* Laibach koji je prisutan tijekom vegetacije u obliku piknida žuto-smeđe boje. Piknidi se u najvećem broju nalaze na lisnoj peteljci i na rubovima listova. Piknospore vrše sekundarne infekcije.

Simptomi, vidljivi u obliku pjega koje nastanu u početku patogeneze, su tamnoljubičaste boje, a postupnim razvojem nekroza staničja poprimaju smeđu boju (Slika 3.1.3.1.). Oblik i veličina mrlje nisu jasno definirani. U fazi velike zahvaćenosti lisne površine, ova bolest se često može zamijeniti s crvenom mrljavosti lista ili s paleži lista. *G. comari* najviše preferira mlađe lišće i

javlja se sredinom ljeta te ove činjenice mogu pomoći u točnijoj identifikaciji gljive. Bolest zahvaća listove, lisne peteljke, dijelove cvijeta i izaziva trulež plodova koji se smatra posebnom bolesti te mu se pripisuje epitet kao ekonomski značajnijom bolesti od bolesti nastale na listovima.

Slika 3.1.3.1. Gnomonijska pjegavost lista

(Izvor: Miličević, 2015)

Gljiva *G. comari* prezimljuje u obliku micelija u zaraženom staničju, a u proljeće može doći do stvaranja piknida i peritecija. Primarna infekcija se može dogoditi putem piknospora ili askospora, dok za vrijeme vegetacije, sekundarne infekcije se najčešće vrše pomoću piknospora (Miličević, 2015).

3.1.4. Palež lista jagode

Palež lista se pretežno javlja na starijim listovima sredinom ljeta. Često uzrokuje defolijaciju kod jagoda. Uzročnik bolesti je gljiva *Phomopsis obscurans* (Ell. & Ev.) Sutton. Ova gljiva je tipični monofag, poznat i pod nazivom *Dendrophoma obscurans*.

Simptomi su vidljivi u obliku lisne paleži (nekroze) koja zahvaća područje uz glavnu žilu lista i širi se do unutrašnjosti lista prema rubovima tvoreći karakterističan oblik slova V. Najčešće se primijete tri zone različitog obojenja (Slika 3.1.4.1.).

Gljiva prezimljuje u obliku micelija unutar tkiva lista koji ostane na biljci tijekom zime. U proljeće se na inficiranom listu počinju formirati piknidi. *P. obscurans* nema teleomorfni stadij (nije poznat) stoga, primarni i sekundarni inokulum čine piknospore. Patogen vrši infekciju najprije na starijim listovima, ali može prijeći i na dijelove cvijeta i na plodove (Miličević, 2015).

Slika 3.1.4.1. Simptom paleža lista jagode

(Izvor: Miličević, 2015)

3.1.5. Siva plijesan jagode

Siva plijesan ili trulež plodova je u našim agroekološkim uvjetima najčešća i najvažnija bolest na jagodama. Uzročnik bolesti je polifagna gljiva *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., što je naziv za anamorfni ili nespolni stadij gljive, dok je teleomorfni stadij poznat pod nazivom *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel.

Gljiva *B. cinerea* na plodovima stvara karakteristične paučinaste prevlake koje su sivkasto-smeđe boje, a prevlaku čini micelij gljive koji se sastoji od vrlo razgranatih konidiofora s konidijama. Pri visokoj vlazi zraka i nižoj temperaturi micelična prevlaka se počinje širiti i preraste cijeli plod jagode koji postaje neupotrebljiv (Slika 3.1.5.1.). Simptomi su mogući i na listovima u obliku nekroza (rijetka pojava) te na cvjetovima koji se potom osuše. Simptomi vidljivi u obliku smeđih vlažnih pjega, koji se javljaju u početnoj fazi patogeneze sive plijesni, često su nalik simptomima drugih bolesti. Razlika simptoma sive plijesni od antraknoznih pjega je što kod pjega nastalih od sive plijesni nema udubljenja (uleknuća) u staničju ploda. Također, vidljiva razlika od pjega smeđe truleži plodova je izostanak sluzastih eksudata narančaste boje (tipični kod smeđe truleži plodova).

Slika 3.1.5.1. Širenje simptoma sive plijesni na plodu jagode

(Izvor: Miličević, 2015)

Ova patogena gljiva, u nasadima jagode, prezimljuje u obliku sklerocija ili dormantnog micelija u biljnim ostacima. Optimalne temperature za njezin razvoj su od 15 do 20 ˚C i relativna vlaga zraka iznad 90%. U rano proljeće počinje klijanje sklerocija u micelij na kojem nastaju konidije. Konidije se primarno naseljavaju na mrtve dijelove staničja cvijeta i kasnije predstavljaju primarni inokulum gljive, u tzv. parazitskoj fazi. Prvim zarazama su najpodložniji mladi i tek otvoreni cvjetovi koji poprime izgled kao da su spaljeni. Sljedeća faza je prelazak gljive na zametnute plodove putem receptakuluma u unutrašnjost ploda. Na inicijalnom mjestu zaraze ploda razvijaju se smeđe pjege na kojima se potom, kroz daljnji tijek patogeneze, razvijaju konidiofori s konidijama (vidljivi poput sive pepeljaste prevlake ili micelija). Sekundarne infekcije se vrše tijekom zriobe plodova i gljiva može inficirati plod direktno i putem receptakuluma. Zaraženi plodovi vrlo brzo trunu, a u slučaju sušnog vremena, nastaju mumificirani plodovi (Miličević, 2015).

3.2. Viroze jagode

Zbog učestale primjene vegetativnog načina razmnožavanja biljaka (u ovom slučaju jagoda) i činjenice da su virusi često prisutni u svim biljnim dijelovima (sistemično širenje unutar biljnih tkiva) jagode su sklone virusnim infekcijama tijekom uzgoja i njihovog razmnožavanja. Na području Hrvatske u dostupnoj literaturi nema zabilježenih podataka o učestalosti pojave virusnih infekcija niti o štetnosti virusa u nasadima jagode, stoga su informacije prikupljene u drugim proizvodnim područjima (najviše u SAD-u). Danas je poznato više od 30 različitih virusa koji mogu inficirati jagode (Tablica 3.2.1.). Najvažniji virusi, koji čine velike ekonomske štete, su oni koji se prenose lisnim ušima (Tablica 3.2.1.). Razlog tome jest prisutnost jagodine lisne uši (*Chaetosiphon fragaefolii*) koja se često nalazi na uzgojnim površinama jagode. Od ukupno sedam viroza (prenosivih lisnim ušima), koje dolaze u jagodi, najštetnije su one uzrokovane virusom naboranosti jagode (SCV), virusom blagog žućenja ruba jagode (SMYEV), virusom šarenila jagode (SMoV) i virusom prosvjetljavanja žila jagode (SVBV). (Vončina, 2015).

Tablica 3.2.1. Najčešći virusi jagode, njihovi engleski nazivi, akronimi te način prijenosa

Virus	Engleski naziv (akronim)	Način prijenosa
Virus naboranosti jagode	*Strawberry crinkle virus* (SCV)	lisne uši
Virus blagog žućenja ruba jagode	*Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV)	lisne uši
Virus šarenila jagode	*Strawberry mottle virus* (SMoV)	lisne uši
Virus prosvjetljivanja žila jagode	*Strawberry vein banding virus* (SVBV)	lisne uši
Virus klorotične mrljavosti jagode	*Strawberry chlorotic fleck virus* (SCFV)	lisne uši
Latentni C – virus jagode	*Strawberry latent C virus* (SLCV)	lisne uši
Virus lažnog blagog žućenja ruba jagode	*Strawberry pseudo mild yellow edge virus* (SPMYEV)	lisne uši
Virus povezan sa žućenjem jagode	*Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV)	štitasti moljci
Virus lažne žutice repe	*Beet pseudo-yellows* virus (BPYV)	štitasti moljci
Virus mozaika gušarke	*Arabis mosaic virus* (ArMV)	nematode, sjeme
Virus prstenaste pjegavosti maline	*Raspberry ringspot virus* (RpRSV)	nematode, sjeme
Latentni virus prstenaste pjegavosti jagode	*Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV)	nematode, sjeme
Virus crnih prstenova rajčice	*Tomato black ring virus* (TBRV)	nematode, sjeme
Virus prstenaste pjegavosti rajčice	*Tomato ringspot virus* (ToRSV)	nematode, sjeme
Virus nekroze duhana	*Tobacco necrosis virus* (TNV)	pseudogljive (*Oomycetes*)
Virus nekrotičnog šoka jagode	*Strawberry necrotic shock virus* (SNSV)	tripsi, pelud, sjeme
Latentni virus vrste *Fragaria chiloensis*	*Fragaria chiloensis latent virus* (FClLV)	pelud, sjeme
Virus mozaika jabuke	*Apple mosaic* virus (ApMV)	pelud, sjeme

(Izvor: Martin & Tzanetakis, 2006)

3.2.1. Virus naboranosti jagode

Virus naboranosti jagode (*Strawberry crinkle virus*, SCV) je jedan od najštetnijih virusa jagode. Rasprostranjenost ovog virusa se usko veže uz rasprostranjenost jagodine lisne uši. Razlog proizlazi iz toga što se prijenos virusa naboranosti jagode odvija putem lisnih uši iz roda *Chaetosiphon* perzistentnim načinom. Zabilježeno je kako su sve vrste roda *Fragaria* osjetljive na SCV virus, a zanimljivo je kako se štetnost ovog virusa povećava u prisutnosti drugih virusnih zaraza na istom domaćinu. Simptomi koji su vidljivi na osjetljivim kultivarima biljke, prilikom zaraze virusom naboranosti jagode, uočavaju se u obliku uvijanja peteljke (Slika 3.2.1.1.), deformirane plojke lista, smanjene površine lista jagode i pojave klorotičnih pjega koje su nejednake veličine (Martin i Tzanetakis, 2006). Bitno je naglasiti kako je latentni period SCV virusa, prenošenog jagodinom lisnom uši ovisan o temperaturama i trajanje mu se kreće od 10 do 19 dana. Pri nižim temperaturama uspješnost prijenosa ovog virusa se smanjuje. Ova činjenica je razloga što SCV virusa nema u hladnijim proizvodnim područjima (Krczal, 1982; Vončina, 2015).

Slika 3.2.1.1. Prikaz simptoma na jagodi uzrokovanih virusom naboranosti jagode

(Izvor: https://www.ipmimages.org/)

3.2.2. Virus šarenila jagode

Virus šarenila jagode (*Strawberry mottle virus*, SMoV) je najučestaliji virus koji se javlja u svim uzgojnim područjima jagode. Istraživani su mnogi sojevi ovog virusa i zabilježeno je kako većina sojeva ne pokazuje znakove zaraze. Kod virulentnijih sojeva SMoV virusa zabilježeno je smanjenje vigora i prinosa do 30% (Freeman i Mellor, 1962). Simptomi su vidljivi poput šarenila listova i zastoja u rastu biljke (Slika 3.2.2.1.). Infekcija može uzrokovati i potpuno sušenje jagode. Karakteristika ovog virusa je prijenos putem lisnih uši iz roda *Chaetosiphon* i

pamukovom lisnom uši (*Aphis gossypii*) na semiperzistentan način. Za uspješan prijenos virusa potrebno je nekoliko minuta ishrane lisne uši na jagodi, a infektivnost se gubi za 2-3 sata. SMoV virus se javlja i na područjima bez prisutnosti jagodine lisne uši jer pamukova lisna uš također prenosi ovaj virus. Zbog tolerantnosti većine kultivara na samostalne infekcije, opisani virus ne predstavlja veliki problem. U područjima s visokim populacijama vektorskih vrsta i s prisutnošću drugih virusa prenosivih lisnim ušima, uzgoj jagoda koji isključuje učestalu primjenu insekticida je moguć jedino ako se u uzgoju koriste tolerantni kultivari jagode (Vončina, 2015).

Slika 3.2.2.1. Simptomi na jagodi inokuliranoj virusom SMoV

(Izvor: Ward i sur., 2008)

3.3. Bakterioze jagode

Jedan od najvažnijih zdravstvenih problema koji se javljaju na jagodi su bakterijske infekcije, a naročito su značajne u kulturi njenog biljnog tkiva, kako u istraživanju tako i u komercijalnoj proizvodnji (Cassells, 1991; Leifert i Waites, 1992). Bakterijske infekcije je često teško otkriti (Debergh i Vanderschaeghe, 1988; Viss i sur., 1991). Zanimljivo je kako i zdrave biljke mogu sadržavati bakterije (Debergh i Vanderschaeghe, 1988; Leggatt i sur., 1988), a pojedini biljni eksudati mogu izgledati slično eksudatu koji potječe od patogenih bakterija (Bastiaens, 1983; Finer i sur., 1991). Katkada kod zaraženih biljaka može izostati prisutnost simptoma. Također, biljka može imati smanjen potencijal razmnožavanja, smanjen postotak ukorjenjivanja ili može odumrijeti (Leifert i sur., 1989, 1992). Fitopatogene bakterije se prenose pasivno, putem vektora, vode, aerosola, čestica tla, biljnog soka, biljnih ostataka, alata za rezidbu, raznih agrotehničkih uređaja, sjemena i sadnog materijala što predstavlja veliku opasnost za zdravstveno stanje. Nastanak bolesti, njen razvoj i nastanak epifitocije uvelike ovisi o okolišnim uvjetima, virulentnosti patogena, ali i o općem stanju biljke (Đermić, 2016).

3.3.1. Bakteriozna poligonalna pjegavost jagode

Poligonalna pjegavost jagode, uzrokovana bakterijom *Xanthomonas fragariae* Kennedy *et* King otkrivena je u Minnesoti 1960. godine (Kennedy i sur., 1962). Ovaj patogen pronađen je u mnogim regijama proizvodnje jagode diljem svijeta. Poligonalna pjegavost jagode širi se transportom zaraženih biljaka (Roberts i sur., 1997). Otpornost prema ovom patogenu pokazuje jedino *Fragaria moschata* (Kennedy, 1965). *Xanthomonas fragariae* je poznata u svijetu pod engleskim nazivom „*angular leaf spot of strawberry*“ (ALF). Svrstana je na EU listu II/A2 i EPPO listu A2 (Trkulja i sur., 2012).

Prisutna je u EPPO regiji: Belgija, Francuska, Njemačka, Italija, Nizozemska, Portugal, Rumunjska, Španjolska, Švicarska i Ukrajina; u Aziji: u Tajvanu; u Africi: u Etiopiji; u S. Americi: u Kanadi i SAD-u; u J. Americi: u Argentini, Brazilu, Paragvaju, Urugvaju i Venecueli (OEPP/EPPO, 2006).

Bakterija *Xanthomonas fragariae* uzrokuje smanjenje prinosa, ali bolest nije destruktivna. Veće štete i gubici nastaju prilikom čestog navodnjavanja jagode. Početni simptomi na listovima se vide kao sitne, uglaste, sjajne i vodenaste pjege nepravilnog oblika (Slika 3.3.1.1. b). U ranoj fazi, pjege su zamjetne samo na donjoj strani lista, a prozirne su promatrane ispod osvjetljenja (Slika 3.3.1.1. a). Pjege se postupno povećavaju kako se zaraza širi, spajaju se i nakon otprilike 2 tjedna se uočavaju na licu lista u obliku vodenastih, uglastih pjega koje postaju crvenkastosmeđe (Slika 3.3.1.2.). Često je prisutan bakterijski eksudat na simptomatičnom dijelu lista jagode koji sušenjem postane taman i gumenast. Pjege se spajaju duž primarnih i sekundarnih žila (Slika 3.3.1.2.). Mrtvo tkivo puca i ispada te oboljeli list poprima mozaičan izgled. Bakterija zahvaća i cvjetove, ali ne inficira plodove jagode (Trkulja i sur., 2012).

a) b)

Slika 3.3.1.1. Početni simptomi poligonalne pjegavosti lista jagode (prikaz a) i simptomi vidljivi na naličju lista (prikaz b)

(Izvor: Janse i sur., 2001)

Slika 3.3.1.2. Simptomi poligonalne pjegavosti na naličju lista jagode

(Izvor: https://www.ipmimages.org/)

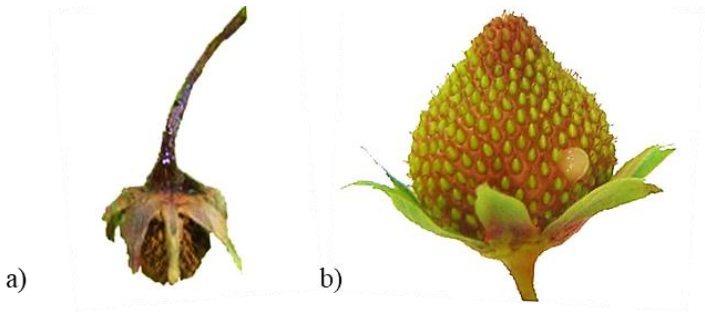
Izvor inokuluma predstavljaju ostaci zaraženog lista u tlu ili na površini tla. Vijabilnost bakterija, unutar zaraženih suhih listova, u laboratoriju održane su najmanje 2,5 godina. Širenje zaraze se može odvijati i putem eksudata kojeg vjetar ili kapljice kiše mogu prenositi na susjedne biljke u nasadu jagoda. Patogen ulazi u biljku kroz puči listova, a infekcija krune se ostvaruje kroz rane ili putem inficiranog lista. Tijekom vegetacijske sezone bakterija *X. fragariae* može uzrokovati ciklus od nekoliko sekundarnih infekcija. Najpogodniji uvjeti za razvoj zaraze su umjerene do hladne dnevne temperature (oko 20 ˚C), niske noćne temperature i visoka vlažnost (Maas, 1984).

Preporuke za provođenje fitosanitarnih mjera, prema EPPO-u (1990), uključuju korištenje (uvoz) sadnog materijala koji mora potjecati od matičnih biljaka bez utvrđene prisutnost *X. fragariae*, a navedeno se odnosi na zemlje u kojima je zabilježen ovaj patogen. Isto vrijedi i za proizvodna područja na kojima bolest nije utvrđena tijekom posljednjih pet vegetacijskih sezona. Preporučuje se i vizualna kontrola u vrijeme mirovanja (pregled na poligonalne pjege kod starijih listova). U Hrvatskoj još uvijek nije potvrđena prisutnost bakterije *X. fragariae*, ali potrebno je provoditi kontrole. Poznato je da je u pojedinim susjednim zemljama (primjerice Italiji) prisutan ovaj patogen, stoga je jedina moguća mjera zaštite sprječavanje njegovog unosa u našu zemlju.

3.3.2. Palež plodova jagode

Fitopatogene bakterije iz roda *Erwinia* uzrokuju bolesti pojedinih značajnih kultiviranih biljaka. Poznata je reakcija biljaka na bakterijske infekcije koja se iskazuje u vidu niza kemijskih reakcija i izlučivanju signalnih molekula, a sve kako bi se biljka pokušala osloboditi od patogena (Thekkiniat i sur., 2016). U Hrvatskoj je iz ovog roda najpoznatija vrsta *Erwinia amylovora* koja uzrokuje bakteriozni palež jabuka i krušaka.

Patogen *Erwinia pyrifoliae* prvi je put opisan 1999. godine u Koreji (Kim i sur., 1999, 2001). *E. pyrifoliae* uzrokuje palež na azijskim ili Nashi kruškama (*Pyrus pyrifolia*) i smatralo se kako je njegova rasprostranjenost ograničena na području istočne Azije (Koreja i Japan). Istraživanjem, koje je provedeno u proljeće 2013. godine u Nizozemskoj, pronađene su jagode na nekoliko lokacija koje su pokazivale intenzivno crnjenje njihovih nedozrelih plodova i stabljike (Slika 3.3.2.1. a). Primijećeno je kako se na površini mladih plodova i njihovih stabljika razvija kapljični iscjedak (Slika 3.3.2.1. b). Na listovima nije bilo simptoma. Analizom zaraženih plodova jagode, utvrđene su bakterijske kolonije slične onima kod roda *Erwinia*. Daljnjom analizom, izolati su identificirani kao *E. pyrifoliae* pomoću provedenog PCR testa u stvarnom vremenu (*Real-time* PCR; Wensing i sur., 2012). Provedena je inokulacija cvjetova jagoda koja je rezultirala nekrozom bez stvaranja kapljičnog iscjetka (Thekkiniath i sur., 2016). Za sada ova zaraza nije zamijećena šire od navedenih lokacija.



Slika 3.3.2.1. Prikaz simptoma zarazom bakterijom *Erwinia pyrifoliae*

(Izvor: Thekkiniath i sur., 2016)

3.3.3. Bolesti uzrokovane bakterijama iz roda *Pseudomonas*

Predstavnici ovog roda su vrlo rasprostranjeni i mogu prouzročiti velike štete. Zaražavaju razne biljne vrste. Jagode se danas koriste u uzgojne i ukrasne svrhe te postoji veći rizik od širenja različitih patogena kao i za njihovo održavanje u mnogim arealima koji su udaljeni od intenzivnih nasada jagode.

Bakterije ovog roda su usko specijalizirane, a pojedine imaju izražen polifagni karakter i parazitiraju zeljaste i drvenaste biljke. Napadaju uglavnom parenhimsko tkivo uzrokujući različite simptome bolesti poput nekroza (pjegavosti), plamenjače, rak-rana, tumora, uvelosti i truleži biljaka. Zarazu vrše prodiranjem u biljke kroz puči, lisne ožiljke i oštećenja nastala od biotičkih i abiotičkih čimbenika (Arsenijević, 1988).

Prema Young i sur. (1978) bakterije roda *Pseudomonas* (*Ps*.) svrstavaju se u tri grupe:

1. fluorescentne
2. nefluorescentne bakterije kod kojih većina može stvoriti polibetahidroksibutirat
3. atipične bakterije roda *Pseudomonas*.

Na hranjivim podlogama bakterije roda *Pseudmonas* tvore sluzave kolonije bijele boje i stvaraju plavičasti odsjaj prilikom promatranja izolirane kolonije (na agaru) pri propusnoj svijetlosti. Bakterije ovog roda su većinom aerobne, štapićastog oblika, asporogene i Gram-negativne.

Bakterije ovog roda potječu od saprofitne vrste *Ps. fluorescens* koja je prisutna u sastavu zemljišne mikroflore. Antigena struktura ovih patogena je vrlo slična, a njihovi su bakteriofagi dosta polifagni. Oba navedena svojstva otežavaju njihovu identifikaciju (Arsenijević, 1988).

Palež cvijeta jagode

Godine 2003. zapaženi su neuobičajeni simptomi na komercijalnim jagodama (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), koje su uzgajane u više regija u Watsonvilleu (SAD, CA). Simptomi su bili u vidu smeđih lezija na donjim dijelovima lapova jagoda. Lezije su se raširile i na gornje dijelove lapova te na druge dijelove biljke, ali nisu zapaženi simptomi na listovima. Izolacijom, na King B agaru, dobivena je Gram-negativna, plavo-zelena fluorescentna bakterija iz roda *Pseudomonas*.

Izolati su uzrokovali truljenje kriški krumpira, ali nisu izazvali reakciju preosjetljivosti na duhanu (*Nicotiana tabacum* L. var. 'Samsun'), što ukazuje na pripadanje bakterija Lelliotovoj

LOPAT grupi IVa, *P. marginalis*. Izolati iz jagode uspoređeni su sa patotipovima sojeva *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *P. marginalis* pv. *alfalfae* i *P. marginalis* pv. *pastinaceae*. 16S rDNA sekvenca soja vrste *P. marginalis* (Z76663) bila je 97 do 99% slična sa četiri sekvence izolirane jagode (GQ845121). Patogenost izdvojenih izolata je potvrđena u pokusu na jagodi (sorta 'Albion'). Nakon 7 dana, unutar staklenika (visoka vlaga zraka, temperatura oko 25 °C) otprilike polovica cvjetova, inokuliranih s izolatima, imala je simptome na lapovima koji su bili identični simptomima uočenima na uzgojnoj površini u Watsonvilleu. Nadalje, inokulirani cvjetovi su bili identični onima koji su korišteni za inokulaciju biljaka, što je potvrđeno reakcijama LOPAT-a i rep-PCR-om, čime su u navedenom istraživanju kompletirani Kochovi postulati. Cvjetovi, umočeni u fosfatni pufer ili u tekuću kulturu sojeva patotipa *P. marginalis*, nisu razvili simptome i nisu mogli biti ponovno izolirani. Ovo je prvo izvješće o paležu cvijeta jagode koji je uzrokovala *P. marginalis* i prvo izvješće o *P. marginalis* na jagodama u Kaliforniji. *P. marginalis* uzrokuje propadanje pupova jagoda u Japanu. Potrebno je provođenje daljnjih testiranja u svrhu utvrđivanja da li dobiveni izolati pripadaju novom ili već prethodno opisanom patovaru *P. marginalis* (Bull i sur., 2009).

4. ZAŠTITA JAGODE OD BOLESTI

Suvremena fitomedicina se bazira na ekološki prihvatljivom načinu suzbijanju biljnih bolesti i štetnika. Stremi prema smanjivanju upotrebe kemijskih sredstava u što većoj mogućoj mjeri. Ovakav pristup zaštiti bilja integrira sve načine suzbijanja štetočinja i smanjivanje njihove masovnije pojave uz implementaciju bioloških mjera suzbijanja (biološki agensi ili biopesticidi). Sve više se posvećuje pažnja istraživanju i otkrivanju novih bioloških mjera zaštite, ali one još uvijek u intenzivnim proizvodnjama ne mogu postati mjera koja bi zamijenila primjenu klasične kemijske zaštite. Međutim, biološke mjere zaštite sastavni su dio integrirane poljoprivrede (Miličević i sur., 2006). Za sve bolesti potrebno je provoditi preventivne agrotehničke mjere koje uključuju pravilan izbor terena, rotaciju usjeva (plodored), upotreba bezvirusnog sadnog materijala, uklanjanje lišća i korova. Također, potrebno je koristiti i direktne mjere zaštite u svrhu suzbijanja ekonomski najznačajnijih bolesti, korova i štetnika (Nikolić, 2011).

Za mikoze jagode, u Hrvatskoj (2018. godina), registrirano je 7 trgovačkih pripravaka: COSAVET DF, DITHANE DG NEOTEC, DITHIANE M-45, NORDOX, QUADRIX, RIDOMIL GOLD MZ PEPITE i SCORE 250 EC. Djelatne tvari koje su prisutne u tim formulacijama redom su: sumpor, mankozeb, mankozeb, bakarni oksid, azoksistrobin, metalaksil-M u kombinaciji s mankozebom i difenkonazol. Navedene djelatne tvari dozvoljene su, prema njihovoj registraciji, za suzbijanje pepelnice, trulež korijena i korijenovog vrata, antraknoze, gnomonijske mrljavosti lista, crvene pjegavosti lista, ali one mogu pokazati i djelovanje na neke druge bolesti za koje nisu registrirani (difenkonazol suzbija pepelnicu, ali ima i djelovanje na palež lista) (FIS, 2018). Osim bolesti koje zahvaćaju nadzemni dio jagode, postoje i one bolesti koje se razvijaju na korijenu. Mjere zaštite se baziraju na korištenju zdravog sadnog materijala, izbor odgovarajućeg tla, sterilizacija tla fumigantima i uzgoj rezistentnih kultivara. Prije sadnje potrebno je provesti dezinfekciju prostora (ako se uzgaja u zaštićenom prostoru). Postoji mogućnost kemijskog suzbijanja u smislu potapanja korijena biljaka prije same sadnje ili zalijevanja biljaka nakon sadnje dozvoljenim fungicidima. Dozvolu za 2018. godinu ima fungicid trgovačkog naziva RIDOMIL GOLD MZ PEPITE (aktivne tvari metalaksil-M i mankozeb) u svrhu zalijevanja jagoda nakon sadnje (FIS, 2018).

U proizvodni jagode, virusne bolesti su iznimno opasne. Uzrokuju degeneraciju, kržljavost i slabljenje biljaka jagode uključujući i izravan utjecaj na smanjenje prinosa (25 – 75%) te slabiju kvalitetu plodova. Suzbijanje virusa nije moguće kemijskim metodama. Mjere suzbijanja

oslanjaju se na upotrebu bezvirusnog sadnog materijala, brzo uklanjanje zaraženih biljaka i suzbijanje vektora virusa. Najučinkovitiju zaštitu od šteta uzrokovanih virusima predstavljaju rezistentni (otporni) ili tolerantni kultivari (Nikolić, 2011). Martin i Tzanetakis (2006) upućuju na pojavu rezistentnosti vektora na insekticide, koji predstavljaju problem u kontroli virusnih bolesti, i kao glavno oružje u suzbijanju navode proizvodnju „*virus – free*“ sadnog materijala kroz certifikacijske sheme te selekcija na otpornost. Također, isti autori navode kako se u nekim zemljama sve više uvodi jednogodišnje korištenje sadnica čime se znatno umanjuje štetnost viroza.

Bakterioze na jagodama se može uspješno kontrolirati koristeći certificirani sadni materijal kojim se minimalizira mogućnost unosa i razmnožavanja bakterija na uzgojnoj površini. U slučaju pojave poligonalne pjegavosti lista jagode, pojedinim mjerama se može umanjiti utjecaj ove bolesti. Jednom kada se *Xanthomonas fragariae* etablira, nemoguće ju je eradicirati. Potrebno je paziti na pravilnu gnojidbu u vlažnim i sušnim periodima jer pretjerana fertilizacija pogoduje razmnožavanju bakterija. Potrebno je uklanjati korove kako bi se održala prozračnost u nasadu i omogućilo brže sušenje mokrih listova jagode. Preporučuje se smanjenje korištenja oruđa kao i obavljanje djelatnosti radnika u polju u vrijeme kada su listovi jagoda vlažni. Definiranje areala bolesti u nasadu, promatranje simptoma bolesti i uklanjanje biljnog otpada će smanjiti (reducirati) količinu prezimljujućeg inokuluma patogena. U Hrvatskoj dozvolu za zaštitu jagode od bakterioza ima pripravak NORDOX 75 WG, čija aktivna tvar je bakarni oksid (FIS, 2018).

5. MATERIJALI I METODE

U proljeće 2018. godine, na području Gradskog vrta u Mandlovoj ulici u Zagrebu i na području uzgojnih površina jagode u Donjoj Lomnici, prikupljeni su uzorci listova jagode s vidljivim simptomima koji podsjećaju na simptome bakterioza (Slika 5.1.). Provedena je izolacija prisutne bakterijske flore koja se nalazila u tkivu prikupljenih uzoraka.

Slika 5.1. Prikupljeni uzorci listova jagode koji su korišteni za izolaciju bakterijske flore (original)

5.1. Uzgoj i pročišćavanje bakterijskih izolata

Izolacija je započeta pripremom bakteriološkog hranjivog agara (engl. *nutrient agar*, NA). Ova hranjiva podloga pogodna je za uzgoj većine fitopatogenih bakterijskih vrsta. Nakon inokulacije bakterija na svježi hranjivi medij NA, ploče su inkubirane pri temperaturi od 28 ˚C i pohranjene u termostat na 48 h, nakon čega su pregledane. Inkubacija je omogućila optimalne uvijete za razvoj širokog spektra bakterija.

Izolirana mješovita bakterijska kultura, iz listova jagode pokazala je različite morfološke karakteristike na hranjivom agaru NA u Petrijevim zdjelicama promjera 10 cm.

Nakon dobivenih mnogobrojnih bakterijskih kolonija, odabrane su sve morfoliški različite, pojedinačne kolonije i ukupno ih je izdvojeno 10. Odabrane kolonije se nisu međusobno dodirivale i svaka je bila udaljena od ostalih bakterijskih kolonija. Bakteriološkom iglom su bakterije iz svake odabrane kolonije prenijete na zasebne ploče (petrijevke) s hranjivom krutom podlogom NA standardnom metodom razmaza, po površini hranjivih podloga, u svrhu dobivanja čistih kolonija. Prilikom razmaza bakterija po hranjivom mediju, bilo je nužno spaljivati ezu na Busenovom plameniku unutar laminara (komora za sterilne uvjete rada) čime se omogućilo razrjeđivanje bakterija tijekom razmaza. Također, prilikom svakog razmaza,

rotirana je Petrijeva ploča što omogućava zasađivanje sve manjeg i manjeg broja bakterija na pojedinim regijama hranjivog agara, kako bi se u konačnici dobile odvojene bakterijske kolonije tj. čisti bakterijski izolati. Nakon provedenog postupka izolacije, Petrijeve ploče su inkubirane u termostatu na temperaturi od 28 ˚C u razdoblju od dva dana (48 sati). Nakon inkubacije, dobivene su bakterijske kolonije različitih boja, mukoznosti i veličina.

Također, za uzgoj izolata korištena je i poluselektivna podloga King B (KB) na kojoj različiti izolati mogu razviti drugačija morfološka obilježja u odnosu na ona koja pokazuju na hranjivoj podlozi NA. Nakon učinjenog testa određivanja reakcije po Gramu (KOH test; Suslow i sur., 1982), izolati koji su bili Gram-negativni presađeni su na KB hranjivu podlogu, uz iznimku za izolat 6 koji je bio Gram-pozitivan, ali je pokazao vidljivu fluorescenciju pod ultraljubičastom svjetlošću. Izolati, koji su presađeni na KB podlogu i koji su uspješno rasli na njoj, su korišteni za testiranje patogenosti na duhanu i jagodama. Daljnjem istraživanju pridodan je i izolat E 17, prikupljen 2017. godine u plasteničkoj proizvodnji jagoda, za kojeg se pretpostavilo da je fitopatogen. Na KB hranjivoj podlozi izolati razvijaju drugačija morfološka obilježja uspoređujući njihov uzgoj na NA hranjivoj podlozi.

5.2. Reakcija po Gramu

Određena je reakcija po Gramu za sve dobivene izolate pomoću KOH-testa. Prilikom provođenja ovog testa, kod Gram-negativnih bakterija se, uz upotrebu 3%-tne vodene otopine KOH, razgrađuje njihova stanična stijenka i oslobađa stanična DNA (Suslow i sur., 1982). Test se provodi na predmetnom stakalcu na način da se prikupe bakterije uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi pomoću sterilne čačkalice i potom suspendiraju u otopini KOH. Nastanak niti, koja se pruža od bakterijske suspenzije do vrha podignute čačkalice, odgovara Gram-negativnoj reakciji izolata. Izostanak niti smatra se Gram-pozitivnom reakcijom testiranog izolata.

5.3. Stvaranje fluorescentnog pigmenta

Sposobnost proizvodnje specifičnih pigmenata je karakteristika koja je vrlo korisna u determinaciji bakterija aerobnih vrsta roda *Pseudomonas*. Međutim, sinteza dvaju najčešćih tipova pigmenata, koji se nalaze u tim bakterijama (fluorescentni pigmenti topivi u vodi i fenazin pigmenti), značajno ovisi o sastavu medija (hranjive podloge) i stoga se ne očituju u svim uvjetima rasta. King, Ward i Raney (1954) razvili su dvije hranjive podloge s različitim

mineralnim dodacima (nazvane King A i King B) koje su vrlo korisni u otkrivanju fluorescentnog pigmenta i fenazin pigmenta. King B omogućava i potiče proizvodnju fluorescentnog pigmenta, a u većini slučajeva potpuno potiskuje proizvodnju fenazin pigmenata (Meyer i Abdallah, 1978). Izlaganje izolata, koji se nalaze na KB mediju, ultraljubičastom svijetlu, omogućava prikaz fluorescencije bakterija iz roda *Pseudomonas*.

5.4. Hipersenzitivna reakcija na duhanu

Proveden je test hipersenzitivne reakcije na duhanu (*Nicotiana tabacum* var. 'Samsun') u svrhu provjere patogenosti 6 odabranih bakterijskih izolata prema standardnoj metodi razvijenoj od strane Klementa i Goodmana (1967). Svih 6 izolata je prethodno uzgojeno na krutoj hranjivoj podlozi KB, inkubacijom na 28 °C u termostatu. Nakon 48 sati, prikupljene su ploče s izolatima koji su aktivno rasli na njima, potom su napravljene bakterijske suspenzije u čistoj sterilnoj vodi, sa svakim izolatom pojedinačno, u ukupnom volumenu od 2 mL s koncentracijom od oko 10^8 cfu/mL (eng. *colony forming units*).

Bakterijske suspenzije su premještene u sterilne šprice s hipodermalnim iglama i injektirane u mezofil lista duhana i/ili su injektirani samo pomoću šprice pritisnute na list (Slika 5.4.1.). Test je proveden na način da se suspenzija svakog pojedinačnog izolata unijela u mezofil samo jednog lista koji je označen brojem injektiranog izolata i provedeno je injektiranje negativne kontrole (sterilna destilirana voda). Biljke duhana su u ovom testu, u trenutku injektiranja, imale 8 – 10 razvijenih listova. Prvi rezultati testa očitani su nakon 24 h, a potom su se očitanja izvršila 3. i 7. dan nakon provedenog testa. Isti postupak se proveo na mladim biljkama duhana koje su imale 3 – 4 lista u vrijeme injektiranja (Slika 5.4.1., zadnji prikaz). Ako su izolati, korišteni u ovom istraživanju, saprofitskog karaktera, nije očekivan razvoj vidljivih, nekrotičnih simptoma na listovima duhana.

Slika 5.4.1. Načini unosa bakterijskih suspenzija istraživanih izolata u mezofil lista duhana prilikom testiranja hipersenzitivnosti

(original)

5.5. Bio-test na jagodama

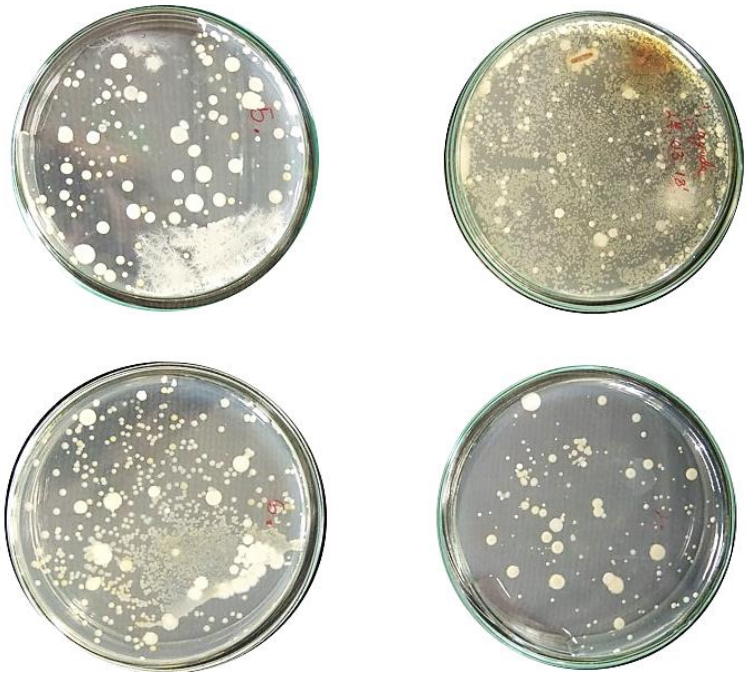
U svrhu potvrđivanja patogenosti izolata na jagodi bilo je nužno provesti bio-test. Testiranje svih 6 izolata je provedeno obzirom da su bile prisutne brojne reakcije na mladim biljkama duhana. Izolat 6 je pokazao najintenzivnije reakcije na listu velikog i malog duhana. Test je proveden na 4 sadnice jagode mjesečarke. Odabrane jagode su istog sortimenta kao i jagode od kojih su prikupljeni uzorci zaraženih listova. Jedna sadnica je bila kontrolna (provedena negativna kontrola injektiranjem čiste sterilne vode) i njezina svrha je bila usporedba zdrave biljke sa zaraženom. Za potrebe bio-testa korištene su iste bakterijske suspenzije pripremljene za hipersenzitivnu reakciju na duhanu. Korištene su sterilne šprice i hipodermalne igle za unos suspenzije u mezofil lista. Jagoda ima tvrđi list i unos je bio otežan, stoga je injektiranje obavljeno snažnim pritiskom na klip šprice u kojoj se nalazila bakterijska suspenzija, a koja je naslonjena na površinu lista jagode (Slika 5.5.1.). Sadnice jagoda su svakodnevno provjeravane, a pojave simptoma bilježene nakon 24 sata od infekcije te nakon 3. i 7. dana od inokulacije bakterijske suspenzije u listove jagoda.

Slika 5.5.1. Unos bakterijske suspenzije izolata u mezofil lista jagode

(original)

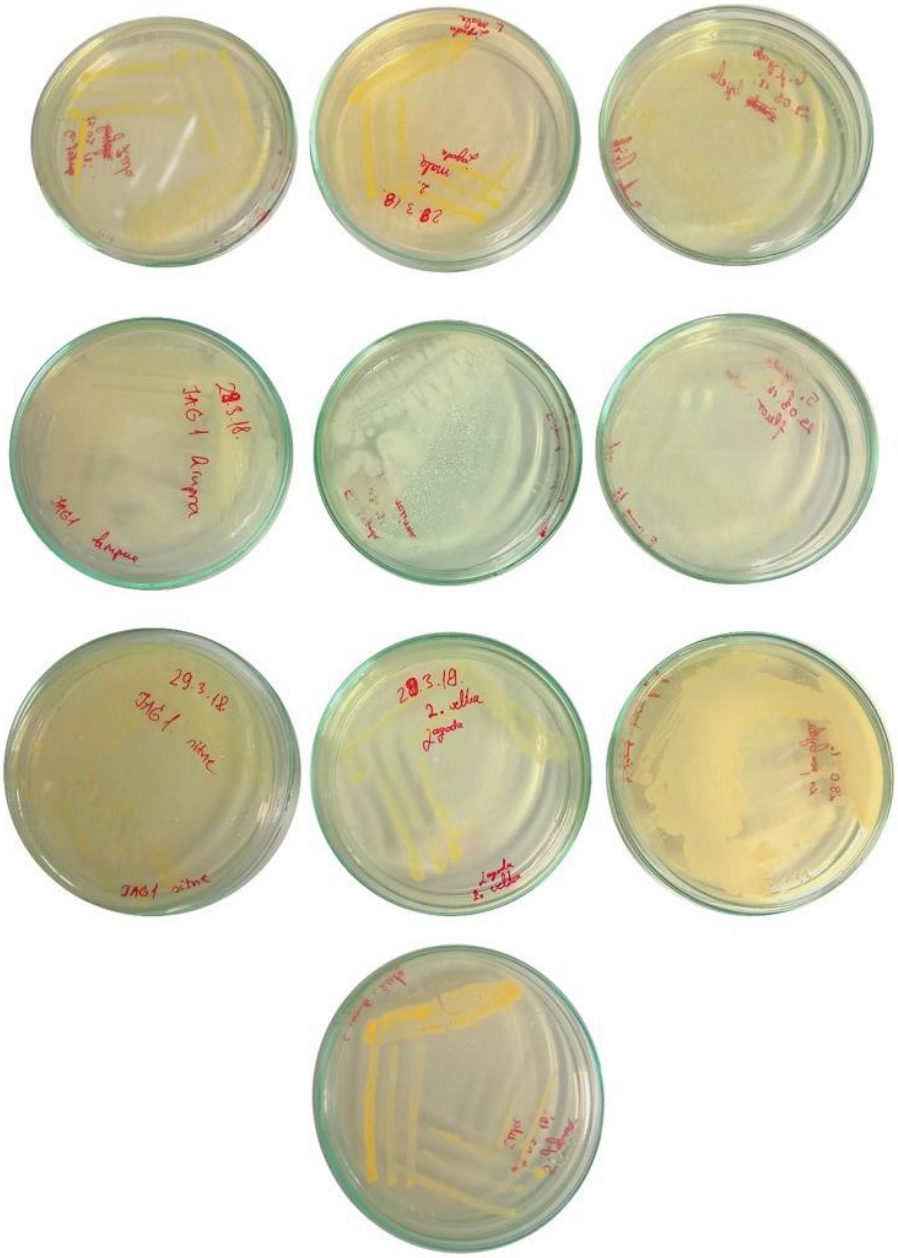
6. REZULTATI I RASPRAVA

Izolacija fitopatogenih bakterija iz listova jagode na hranjivoj NA podlozi prikupljenih na području Gradskog vrta u Mandlovoj ulici u Zagrebu i na području uzgojnih površina jagode u Donjoj Lomnici, uz dvodnevnu inkubaciju, rezultirala je razvojem brojnih raznovrsnih bakterijskih kolonija (Slika 6. 1.).



Slika 6.1. Izolirane mješovite bakterijske kulture iz prikupljenih uzoraka lista jagode (original)

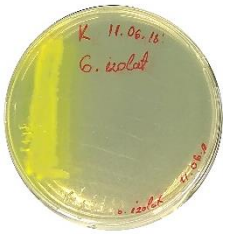
Iz dobivenih mješovitih kultura, serijom subkultivacija i razmaza ezom na pripremljenim hranjivim podlogama NA te uz odabir svih morfološki različitih bakterijskih kolonija, pročišćeno je 10 bakterijskih izolata (dobivene su čiste linije odnosno klonovi) (Slika 6.2.; Tablica 6.1.).



Slika 6.2. Prikaz 10 različitih bakterijskih izolata izoliranih iz simptomatičnih listova jagode na hranjivoj NA podlozi

(original)

Tablica 6.1. Karakteristike izolata na KB hranjivoj podlozi

Oznaka izolata	Morfološka obilježja	Fluorescencija	Slika izolata
1	Bjelkaste kolonije obilnog rasta, slabe mukoznosti	-	
2	Žute kolonije obilnog rasta, mukozne	-	
4	Prozirno – bijele kolonije	+	
5	Žutonarančaste kolonije, tekuće i obilnog rasta	-	
6	Žute kolonije	+	
E 17	Žutonarančaste kolonije sporog rasta	-	

(original)

Provedena je reakcija po Gramu za svih 10 izolata kroz KOH test (Tablica 6.2.). Za testiranje patogenosti dobivenih izolata, odabrani su oni koji su pokazali Gram-negativnu reakciju, ali njima su pridodani i izolati 6 te izolat E 17 (prikupljen 2017. godine na listu jagode uzgojene u plasteniku).

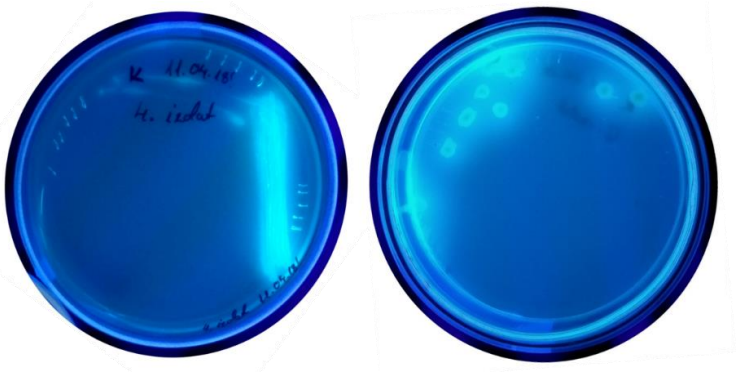
Tablica 6.2. Reakcija po Gramu za 10 različitih izolata

Oznaka izolata	Gram reakcija
1	negativna
2	negativna
3	negativna
4	negativna
5	negativna
6	prijelazna (negativna/pozitivna)
7	pozitivna
8	pozitivna
9	pozitivna
10	pozitivna

(original)

Kod izolata 6 nađena je prijelazna (negativna/pozitivna) Gram-reakcija tj. nije nastala čvrsta viskozna nit kakva se očekuje kod Gram-negativnih bakterijskih izolata, ipak razlog njegovog odabira za ulazak u nastavak testiranja bila je njegova produkcija vidljivog plavo – zelenog pigmenta na hranjivoj podlozi KB (karakteristika vrste roda *Pseudomonas*).

Prethodno odabrani izolati su presađeni na poluselektivnu KB podlogu i inkubirani u termostatu 48 sati na 28 °C. Nakon provedene inkubacije, izolati su izloženi ultraljubičastom svijetlu u tamnoj komori kako bi se provjerila mogućnost fluorescencije (Slika 6.3.).



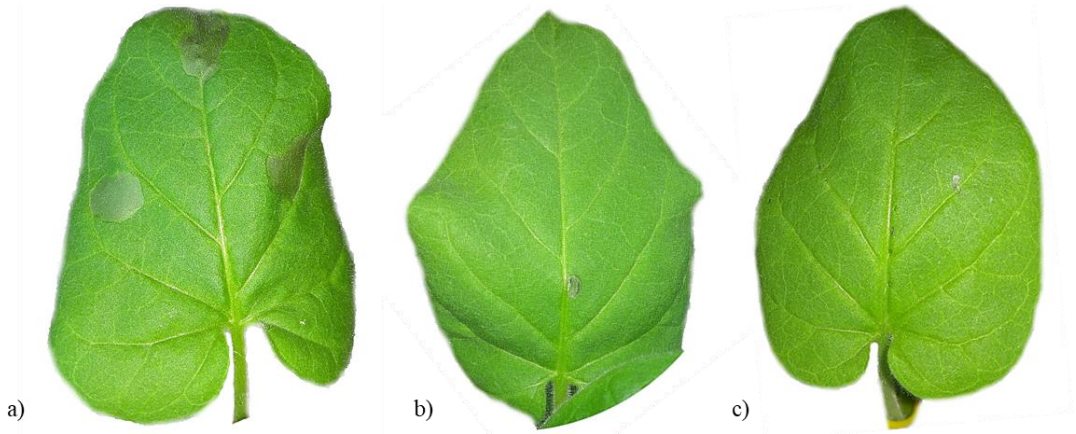
Slika 6.3. Prikaz fluorescencije izolata 4 i izolata 6 pod ultraljubičastim svijetlom

(original)

Izolat 4 i izolat 6 su pokazali intenzivnu fluorescenciju prilikom testiranja iz čega se zaključuje da se radi o skupini fluorescirajućih vrsta iz roda *Pseudomonas* sukladno King i sur. (1954). Svi odabrani izolati (ukupno njih 6) korišteni su hipersenzitivnoj reakciji na duhanu kao i u bio-testu na jagodama.

Provedbom testa hipersenzitivne reakcije na duhanu *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' utvrđena je patogenost izolata 6 prvog dana nakon unosa bakterijske suspenzije navedenog izolata u parenhim lista (vidljive nekroze lista, Slika 6.4. a) uz malu točkastu nekrozu na drugom listu duhana nastale od izolata 2 (Slika 6.4. b). Izolat 4 uzrokovao je malu točkastu nekrozu lista duhana uz sporednu žilu lista (Slika 6.4. c). Drugi testirani izolati (uključujući i negativnu kontrolu) nisu pokazali vidljive promjene na listovima nakon prvog dana od provedene inokulacije (Tablica 6.3.).

Nakon trećeg dana od provedene inokulacije, iskazani simptomi su bili nepromijenjeni, a novih reakcija na druge izolate nije bilo.



Slika 6.4. Rezultati hipersenzitivne reakcije na duhanu - nekroze uzrokovane izolatom 6 (prikaz a), izolatom 2 (prikaz b) i izolatom 4 (prikaz c) na duhanu (*Nicotiana tabacum* var. 'Samsun')

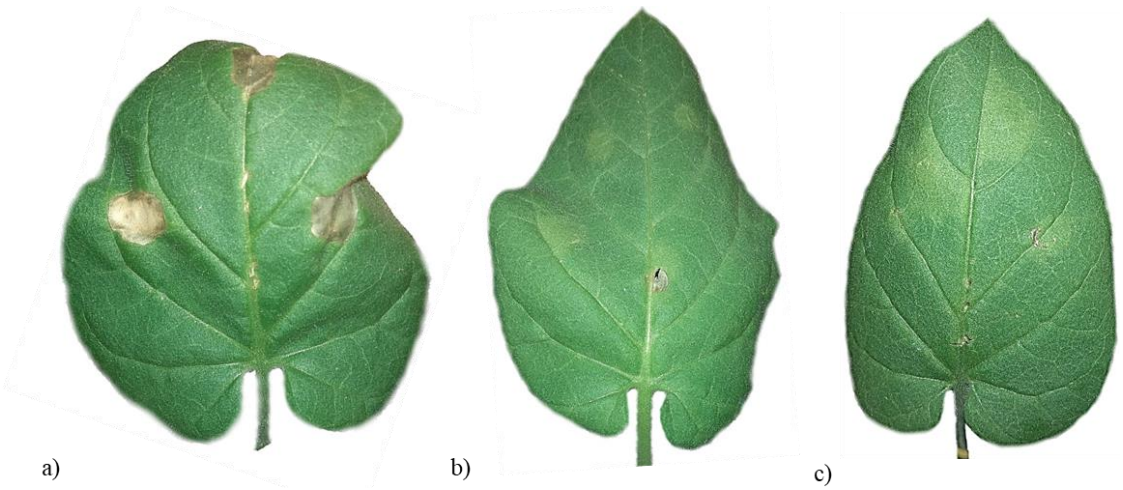
(original)

Tablica 6.3. Rezultati provjere reakcije listova duhana prvog dana nakon provedene inokulacije s bakterijskim izolatima

	Broj izolata	**Vidljive promjene**	
D U H A N	Izolat 1	Nema vidljivih promjena	**P R V I D A N**
	Izolat 2	Točkasta nekroza uz glavnu žilu lista	
	Izolat 4	Točkasta nekroza uz sporednu žilu lista duhana	
	Izolat 5	Nema vidljivih promjena	
	Izolat 6	Vidljive velike nekroze na listu	
	Izolat E 17	Nema vidljivih promjena	

(original)

Pregledom listova duhana sedmog dana nakon inokulacije, zabilježene su promjene od ranije prisutnih simptoma na listovima duhana u obliku žućenja nekroza (Slika 6.5.).

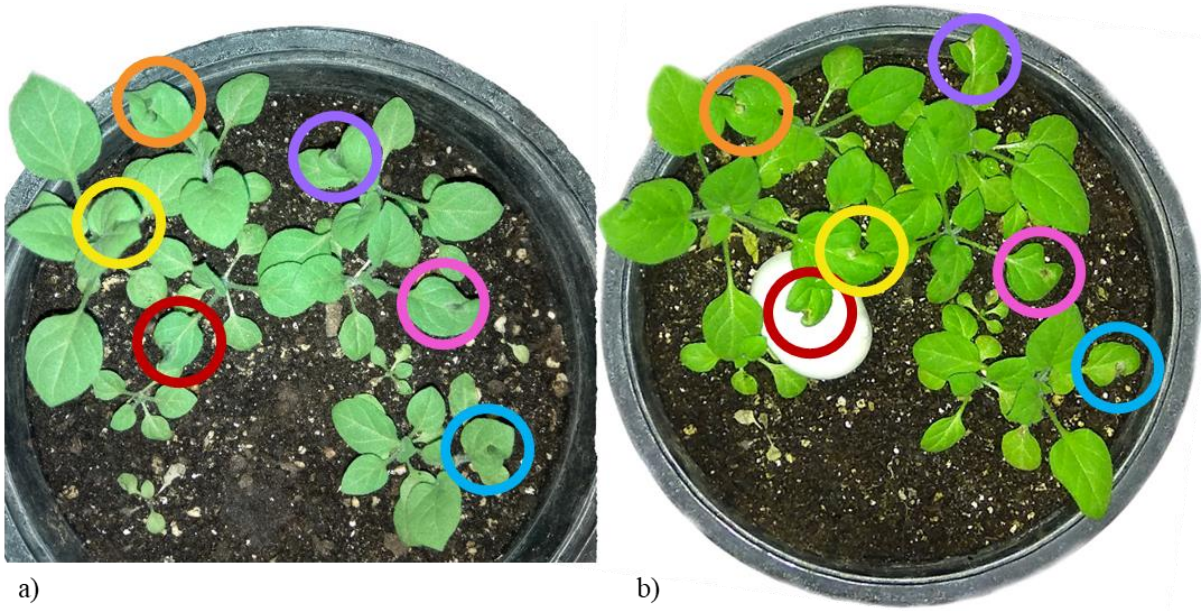


Slika 6.5. Nekroze lista duhana uzrokovane izolatom 6 (prikaz a), izolatom 2 (prikaz b) i izolatom 4 (prikaz c) na duhanu 7 dana nakon provedene inokulacije

(original)

Učinjen je test hipersenzitivnosti i na mladim biljkama duhana s istim izolatima. Mlade biljke su osjetljivije na sve vrste patogena, a dobiveni rezultati sukladni su tome. Inokulacija je

provedena s bakterijskim suspenzijama prislanjanjem šprice o mekani list duhana. Svaka biljčica je predviđena za jedan izolat. Nakon prvog dana od inokulacije vidljiva su oštećenja na plojkama lista (Slika 6.6. a), a nakon sedam dana od provedene inokulacije, vidljivi su i simptomi na listovima dolazi do smeđe nekroze i izrazitijeg uvijanja vrha plojke listova inokuliranih izolatima 1, 2, 6 i E 17 (Slika 6.6. b). Može se zaključiti kako izolat 6 ima patogena svojstva.



a) b)

Slika 6.6. Oštećenja na plojkama mladog duhana nakon prvog dana od inokulacije (prikaz a); Nakon sedam dana vidljivi su izrazitiji simptomi u vidu nekroza i uvijanja plojki (prikaz b)

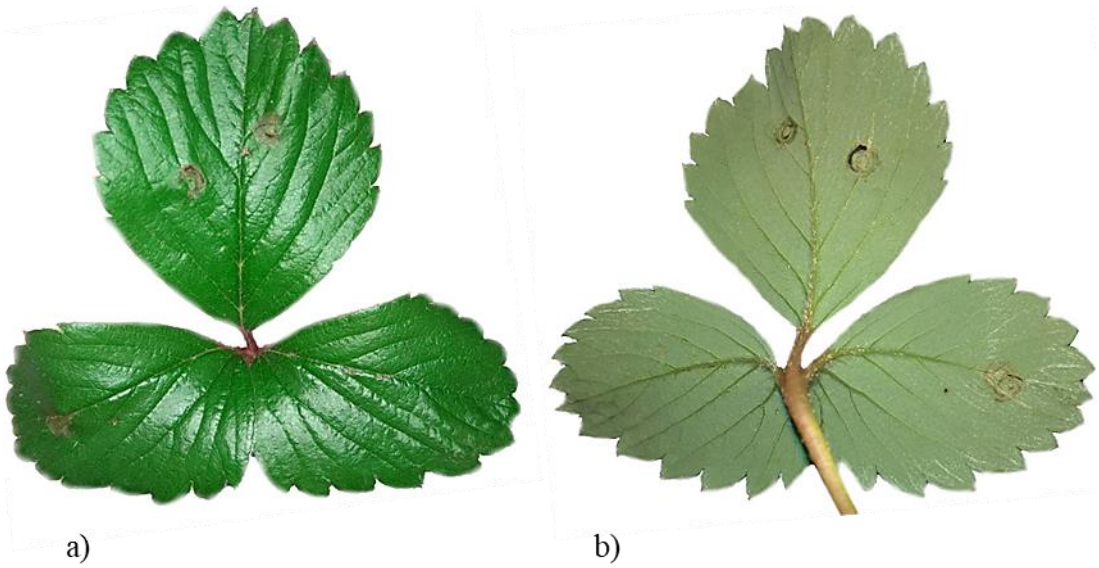
Legenda: izolat 1; izolat 2; izolat 4; izolat 5; izolat 6; izolat E 17.

(original)

Bio-test na jagodama učinjen je sa svih 6 izolata. Korištene su 4 sadnice jagode mjesečarke. Pripremljene bakterijske suspenzije unesene u parenhim plojke listova jagode. Svaka plojka je obilježena oznakom izolata koji je prethodno inokuliran u njih. Redovito se pratila pojava i razvoj simptoma. Bitno je napomenuti kako su listovi jagode dosta tvrdi (kožasti) i prilikom unosa bakterijske suspenzije u mezofil lista, dogodila su se oštećenja na plojkama. Također, sadnice jagoda su uzgajane u optimalnim uvjetima potrebnim za njihov rast i razvoj te nisu bile izložene okolišnim čimbenicima koji bi mogli negativno utjecali na njih. Prvog dana, nakon provedene umjetne zaraze listova jagode, nisu uočene vidljive promjene koje bi ukazivale na simptome uzrokovane od unosa bakterijskih suspenzija u mezofil lista jagode. Nakon trećeg dana, jasno su vidljiva oštećenja na svim listovima koji su bili inokulirani (točnije propadanje

tkiva na mjestima inokulacije. Obzirom na oblik lezija, moguće je da se radilo o reakciji na mehanička oštećenja nastala prilikom unosa bakterijske suspenzije u parenhim lista.

Sedmi dan obilježen je gotovo istim reakcijama biljaka na sve ispitivane izolate. Uspoređujući simptome nastale inokulacijom izolata 6 sa simptomima nastalima od drugih testiranih izolata (izolati 1, 2, 4, 5, i E 17 i uključujući negativnu kontrolu) međusobno ne pokazuju nikakvu različitost. Primjer simptoma vidljivi su na Slici 6.7. a i b koja prikazuje lice i naličje inokuliranog lista jagode izolatom 6.



Slika 6.7. Vidljivi simptomi nastali inokulacijom izolatom 6 na gornjoj strani lista jagode (prikaz a) i na naličju lista jagode (prikaz b)

(original)

Simptomi mogu varirati s obzirom na utjecaj mnogih činitelja kao što je fotoperiod, biljna raznovrsnost, temperatura i vlaga te infektivnost suspenzije. U nekim slučajevima, simptomi se mogu povući tj. nestati ili postati beznačajni s daljnjim rastom biljke. Na primjer, vidljivi simptomi uzrokovani bakterijom *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* na kukuruzu su zabilježeni na početku toplog i suhog vremena (Vidaver i Lambrecht, 2004).

Hipersenzitivna reakcija (HR) je zapravo obrambeni mehanizam izazvan prisustvom patogena u ne-domaćinskom tkivu. Tkivo postaje senzibilizirano na patogena, što rezultira brzim odumiranjem lokalnih biljnih stanica i zarobljavanjem zone u kojoj se nalazi patogen. Duhan se često koristi u HR testovima jer se njegovi veliki listovi pogodni za inokulaciju, a tkivo mu

je sklono preosjetljivosti prema većini fitopatogenih bakterija. Odumiranje tkiva domaćina u području infiltracije bakterijskih stanica, unutar 48 sati, ukazuje kako je bakterija vjerojatno fitopatogena. Potvrda da patogen uzrokuje simptome bolesti zahtijeva testiranje patogenosti na biljci koja je izvorni domaćin. Realizacija ovog testa može zahtijevati mnogo vremena (dani, tjedni ili mjeseci), a naročito kod testiranja bakterijskih izolata iz voćnih vrsta. Moguće je da će se simptomi iskazati kroz izvjesno vrijeme. Međutim, varijacija koja se može dogoditi s različitim sojevima može zahtijevati naprednija testiranja kao što su molekularne analize genoma (Vidaver i Lambrecht, 2004).

Također, izolat 6, koji je pokazao patogenu reakciju na duhanima, ne uzrokuje zarazu na listovima jagode. U obzir treba uzeti i dobru kondiciju uzgajanih biljaka koja uvelike utječe na uspješnost provedenih inokulacija kao i primijenjen način inokulacije (postoje razne metode i načini prikladni za pojedine patogene). Temeljem navedenih rezultata ovog istraživanja bilo bi potrebno provesti daljnja istraživanja u ovom radu izoliranih izolata koja uključuju i ELISA-test s ciljem determinacije različitih bakterijskih patogena koji zaražavaju jagodu, a kojim bi se utvrdila vrsta svih nađenih izolata. Na taj način bi se mogla dovršiti determinacija izoliranih bakterija. Dobiveni rezultat bio-testa se može tumačiti i na način da jagoda može biti i izvor inokuluma, odnosno domaćin koji omogućava preživljavanje brojnih bakterijskih vrsta koje mogu biti patogene za druge biljke (ne nužno i za samu jagodu). Ova teza bi se mogla gledati i kao paralela s otkrićem sposobnosti bakterije *Erwinia amylovora* (uzročnika bakterioznog paleža jabuke i kruške) da se replicira na cvjetovima nekoliko biljaka koje nisu domaćini (jagoda, trešnja, nektarina, borovnica, tratinčica,…) (Weißhaupt i sur., 2015).

Postoji mogućnost kako simptomi koji su bili prisutni na listovima jagode, prikupljenima za provođenje ovog istraživanja, nisu nastali isključivo kao odgovor na infekciju bakterijskom populacijom. Slični simptomi mogu nastati i kao reakcija nedostatak pojedinih elementa u tlu, stres biljke koji je nastao od hladnoće (postupno propadanje lista) te virusnih ili gljivičnih infekcija.

Brojne rizosferne bakterije, kao pojedine filosferne, primjerice iz roda *Pseudomonas*, su vrlo učinkovite u inhibiranju razvoja pojedinih mikoza i bakterioza te se njihovim daljnjim proučavanjem otvaraju nove mogućnosti za pronalazak alternativnih učinkovitih i prihvatljivih načina zaštite bilja od patogena.

7. ZAKLJUČAK

1. Iz simptomatičnog tkiva listova jagode izdvojeno je i pročišćeno 10 bakterijskih čistih linija koje su se međusobno razlikovale prema morfološkim karakteristikama.
2. Testirane bakterijske linije su rezultirale različitim Gram reakcijama. Za potrebe daljnjeg istraživanja korišteni su Gram-negativni izolati i izolat oznake 6, koji je imao prijelaznu (negativna/pozitivna) reakciju.
3. Bakterijski izolati oznake 4 i 6 proizveli su fluorescentni pigment na hranjivoj podlozi KB, iz čega se zaključuje da se radi o skupini fluorescirajućih vrsta iz roda *Pseudomonas*.
4. Testom hipersenzitivnosti na duhanu (*Nicotiana tabacum* var. 'Samsun'), potvrđena je patogenost bakterijskog izolata oznake 6.
5. Nakon sedam dana od provedbe bio-testa na sadnicama jagode mjesečarke, zbog nemogućnosti razlikovanja posljedica mehaničkih ozljeda (nastalih inokulacijom) od simptoma inokuliranih patogenih bakterija, nije bilo moguće procijeniti uspješnost navedenog testa.
6. Iako je u hipersenzitivnoj reakciji na duhanu izolat 6 pokazao simptome karakteristične za infekcije uzrokovane patogenim bakterijama, potrebno je provesti dodatne laboratorijske analize (npr. ELISA ili PCR) u svrhu potvrđivanja njegove pripadnosti rodu *Pseudomonas*.

8. POPIS LITERATURE

1. Arsenijević, M. (1988). Bakterioze biljaka. Beograd : Naučna knjiga, 123-126.

2. Bastiaens, L. (1983). Endogenous bacteria in plants and their implications in tissue culture-a review. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 48:1-11.

3. Bull, C. T., Huerta, A. I., Koike, S. T. (2009). First report of blossom blight of strawberry (Fragaria × ananassa) caused by Pseudomonas marginalis. Plant Disease, 93(12), 1350-1350.

4. Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. In: Debergh, P. C.; Zimmerman, R. H., ed. Micropropagation technology and application. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers:31-44.

5. Debergh, P. C. i Vanderschaeghe, A. M. (1988). Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminants in plant tissue culture. Acta Hort. 255:77-81.

6. Duralija, B. (2015). Tehnologija proizvodnje jagoda. Glasilo biljne zaštite, 15(5), 311-314.

7. Đermić, E. (2016). Interna predavanja: Modul Fitobakteriologija i fitovirologija, Agronomski fakultet Zagreb.

8. FAOSTAT. (2017). Crops. (http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC); Pristupljeno: 15. svibnja. 2018.

9. Finer, J. J., Saxton, R. W., Norris, B. L., Steele, J. A., Rahnema, S. (1991). Growth and disinfestation of 6 different bacteria in embryogenic suspension cultures of cotton. Plant Cell Rep. 10:380-383.

10. FIS (Fitosanitarni informacijski sustav Ministarstva poljoprivrede). (2018). Internet stranica: https://fis.mps.hr/trazilicaszb/; Pristupljeno 06. lipnja 2018.

11. Galletta, G.J. i Bringhurst, R.S. (1990). Strawberry management. Prentice Hall, NJ, SAD.

12. Gligić, V. (1953). Etimološki botanički rečnik. Sarajevo: Veselin Masleša.

13. Gospodarski list. (2009). Zaštita jagoda od bolesti i štetnika. Novinsko nakladničko i trgovačko d.d.

14. Janse, J.D. i Wenneker, M. (2002). Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or -treated planting material. Plant Pathol 51:523–536.

15. Kennedy, B. W., i King, T. H. (1962). Angular leaf spot of strawberry caused by Xanthomonas fragariae sp. nov. Phytopathology 52:873-875.

16. Kennedy, B.W. 1965. Infection of Potentilla by Xanthomonas fragariae. Plant Disease Reporter, 49: 491-492.

17. Kim, W. S., Hildebrand, M., Jock, S., i Geider, K. (2001). Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen Erwinia amylovora. Microbiology, 147(11), 2951-2959.

18. King, E . O., Ward, M . K., Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J . Lab. din. Med. 44, 301.

19. Klement, Z. i Goodman, R. N. (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Rewiev of Plant Pathology 5, 17-44.

20. Krczal, H. (1982). Investigations on the biology of the strawberry aphid (Chaetosiphon fragaefolii), the most important vector of strawberry viruses in west Germany. In III International Symposium on Small Fruit Virus Diseases 129 (pp. 63-68).

21. Krpina, I., Vrbanek, J., Asić, A., Ljubičić, M., Ivković, F., Ćosić, T., Zeman, I. (2004). Voćarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb.

22. Lantz, W., Swartz, H., Demchak, K., i Frick, S. (2010). Season-long strawberry production with everbearers for northeastern producers. University Of Marryland Extension, 11.

23. Leggatt, I. V., Waites, W. M., Leifert, C., Nicholas, J. (1987). Characterization of microorganisms isolated from plants during micropropagation. Acta Hort. 255:93-102.

24. Leifert, C., Waites, W. M. (1992). Bacterial growth in plant tissue culture media.

25. Leifert, C., Waites W. M. i Nicholas, J. R. (1989). Bacterial contamination of micropropagated plant tissue cultures. J. Appl. Bact. 67:353-361.

26. López, M. M., Bertolini, E., Olmos, A., Caruso, P., Gorris, M. T., Llop, P. i Cambra, M. (2003). Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. International Microbiology, 6(4), 233-243.

27. López, M.M., Llop, P., Cubero, J., Pen˜alver, R., Caruso, P., Bertolini, E., Gorris, M.T. i Cambra, M. (2001). Strategies for improving serological and molecular detection of plant pathogenic bacteria. In: de Boer SH (ed) Plant pathogenic bacteria.

28. Maas, J.L. (1984) Compendium of strawberry diseases. American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota, USA.

29. Martin, R. R., i Tzanetakis, I. E. (2006). Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. Plant Disease, 90(4), 384-396.

30. Meyer, J. A., i Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthesis, purification and physicochemical properties. Microbiology, 107(2), 319-328.

31. Miličević, T. (2015). Bolesti lišća jagode. Glasilo biljne zaštite, 15(5), 343-353.

32. Miličević, T., Pagliarini, N., i Cvjetković, B. (2006). Integrirana Zaštita Jagode od Bolesti i Štetnika. In 50. Seminar Biljne Zaštite.

33. Mratinić, E. (2012). Jagoda. Partenon, Beograd.

34. Nikolić, M. i Milivojević J. (2010). Jagodaste voćke, tehnologija gajenja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.

35. Nikolić, M. (2011). Priručnik za proizvodnju šumske jagode.

36. Nikolić, M., Milivojević, J. (2015). Jagodaste voćke, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

37. OEPP/EPPO. (1990). Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008. Panagopoulos, C.G.; Psallidas, P.G.; Alivizatos, A.S. (1978). A bacterial leaf spot of strawberry in Greece caused by Xanthomonas fragariae. Phytopathologische Zeitschrift 91, 33-38.

38. OEPP/EPPO. (2006). Bulletin 36, 135–144. 135.

39. Roberts, P. D., Berger, R. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., i Stall, R. E. (1997). Disease progress, yield loss, and control of Xanthomonas fragariae on strawberry plants. Plant disease, 81(8), 917-921.

40. Rudolph, K., Roy, MA., Sasser, M., Stead, DE., Davis, M., Swings, J. i Gossele, F. (1990). Isolation of bacteria. pp 3-20. In: Methods in phytobacteriology. (Klement Z, Rudolph K, Sands DC eds). Akadémiai Kiadó & Nyomd Vàllalat, Budapest.

41. Slika 1.1. Svjetski prikaz uzgoja jagode u 2016. godini, <http://chartsbin.com/view/43720>. Pristupljeno 15. svibnja 2018.

42. Slika 3.2.1.1. Prikaz simptoma na jagodi uzrokovanih virusom naboranosti jagode, <https://www.ipmimages.org/>. Pristupljeno 19. svibnja 2018.

43. Slika 3.3.1.2. Simptomi poligonalne pjegavosti na naličju lista jagode, <https://www.ipmimages.org/>. Pristupljeno 20. lipnja 2018.

44. Suslow, T.V., Schroth, M.N. i Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophitic bacteria without staining. Phytopathology 72, 917-918.

45. Šoškić, M. (2009). Jagoda. Partenon, Beograd

46. Tanprasert, P. i Reed, B. M. (1997). Detection and identification of bacterial contaminants from strawberry runner explants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 33(3), 221-226.

47. Thekkiniath, J., Ravirala, R., i San Francisco, M. (2016). Multidrug Efflux Pumps in the Genus Erwinia: Physiology and Regulation of Efflux Pump Gene Expression. In Progress in molecular biology and translational science (Vol. 142, 131-149). Academic Press.

48. Trkulja, V., Karić, N., Ostojić, I., Treštić, T., Dutbašić, M. i Mujezinović, O. (2012). Atlas karantenskih štetnih organizama. Sarajevo: Ministarstvo vanjske trgovine i ekonomskih odnosa: Uprava Bosne i Hercegovine za zaštitu zdravlja bilja.

49. Vidaver, A. K., i Lambrecht, P. A. (2004). Bacteria as plant pathogens. The plant health Instructor, 1-11.

50. Viss, P. R., Brooks, E. M. i Driver, J. A. A. (1991). Simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Bioi. 27P:42.

51. Volčević, B. (2008). Jagodičasto voće. Bjelovar: Neron.

52. Vončina, D. (2015). Virusne bolesti jagode. Glasilo biljne zaštite, 15(5), 376-381.

53. Weißhaupt, S., Köhl, L., Kunz, S., Hinze, M., Ernst, M., Schmid, A., & Voegele, R. T. (2015). "Alternative inoculum sources for fire blight: the potential role of fruit mummies and non-host plants." Plant Pathology.

54. Wensing, A., Gernold, M., i Geider, K. (2012). Detection of Erwinia species from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR primers. Journal of applied microbiology, 112(1), 147-158.

55. Young, J. M., Dye, D. W. i Wilkie, J. P. 1978. Genus. VII. Pseudomonas Migula 1894. N. Z. J. Agric. Res. 21:158-161.

ŽIVOTOPIS

Autorica je rođena u Zagrebu 01. travnja 1994. godine. Osnovnu školu i XI. gimnaziju završava u Zagrebu. Zbog velike ljubavi prema prirodi i prirodnim znanostima upisuje smjer Zaštita bilja na Agronomskom fakultetu Zagreb. Godine 2016. upisuje diplomski studij Fitomedicina na istom fakultetu. Na Agronomskom fakultetu je sudjelovala u programu studenti tutori i u izvannastavnoj aktivnosti „Entomološka grupa“ unutar koje je volontirala u Gradskim vrtovima Zagreb. Dobitnica je Rektorove nagrade u kategoriji za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici. Godine 2018. pohađa tečaj za fitoterapeuta u Učilištu terapijskih vještina i stječe zvanje fitoterapeuta. Posjeduje B2 diplomu znanja engleskog jezika. Pohađala je tečajeve u Sveučilišnom računskom centru (Srce) za Microsoft Office pakete i GIMP (program za fotošop). Uspješno završava tečaj crtanja/slikanja 2018. godine pod stručnim vodstvom Ivana Markovića, mag. slikarstva u Centru za likovni odgoj u Zagrebu i postaje članica likovne udruge s kojom aktivno sudjeluje u brojnim likovnim kolonijama.