INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENIH GLJIVA VRSTA Fusarium culmorum, Phytium irregulare, Chalara elegans DJELOVANJEM CELOMSKE TEKUĆINE TRIJU VRSTA GUJAVICA

Žulj, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:710246

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Martina Žulj

Inhibicija rasta fitopatogenih gljiva vrsta *Fusarium culmorum*, *Phytium irregulare*, *Chalara elegans* djelovanjem celomske tekućine triju vrsta gujavica

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENIH GLJIVA VRSTA *Fusarium culmorum*, *Phytium irregulare*, *Chalara elegans* DJELOVANJEM CELOMSKE TEKUĆINE TRIJU VRSTA GUJAVICA

Martina Žulj

Rad je izrađen na: Odjel za biologiju, Osijek
Mentor: dr. sc. Mirna Velki, docent
Komentor: dr. sc. Sandra Ečimović, docent

Kratak sadržaj:

Gujavice svojom aktivnošću povećavaju mikrobiološku aktivnost u tlu, a stupaju i u niz interakcija s drugim organizmima kao što su mikroorganizmi te mikroflora i fauna tla. Gujavice izlučuju celomsku tekućinu koja uz celomocite sadrži aktivne molekule kao što su fetidin, lumbricin I, lizenin, CCF-1 te protein „Eiseniapore“ koji služe za imunološku obranu gujavica od patogena te imaju dokazana antibakterijska i antifungalna svojstva. Fitopatogene gljive uzrokuju bolesti usjeva, uglavnom na žitaricama i tako stvaraju ogromne štete u poljoprivredi. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li inhibitorni učinak ekstrakta celomske tekućine gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta*, *Allolobophora chlorotica*) na rast fitopatogenih gljiva (*Fusarium culmorum*, *Phytium irregulare*, *Chalara elegans*), te koja od vrsta uzrokuje najveći postotak inhibicije. Rezultatima ovog istraživanja dokazan je inhibitorni učinak celomske tekućine sve tri vrste gujavica na rast svake od triju vrsta fitopatogenih gljiva. Najveći postotak inhibicije zabilježen je kod vrste *Chalara elegans* djelovanjem celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta*.

Broj stranica: 36
Broj slika: 19
Broj tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 67
Jezik izvornika: hrvatski jezik
Ključne riječi: gujavice, celomska tekućina, celomociti, fitopatogene gljive, inhibicija rasta,

Datum obrane: 30. svibnja 2019. godine

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. dr. sc. Zorana Katanić, docent, predsjednik
2. dr. sc. Mirna Velki, docent, mentor i član
3. dr. sc. Rosemary Vuković, docent, član
4. dr. sc. Senka Blažetić, docent, zamjena člana.

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Master thesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

GROWTH INHIBITION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI SPECIES *Fusarium culmorum, Phytium irregulare, Chalara elegans* BY IMPLEMENTING EARTHWORM COELOMIC FLUID

Martina Žulj

Thesis performed at: Department of Biology
Supervisor: Mirna Velki, PhD, Assistant Professor
Cosupervisor: Sandra Ečimović, PhD, Assistant Professor

Short abstract:

Through their activity, earthwoms increase microbiological soil activity and enter into a series of interactions with other orgnisams such as soil microorganisms, microflora and fauna. Earthworms secrete colemoic fluid that contains active compounds like fetidin, lumbricin I, lysenin, CCF-1 and Eiseniapore protein which serve as characters of immune defense against pathogens and also have antibacterial and antifungal properties. Phytopathogenic fungi cause crop diseases, mainly on cereals and thus cause enormous outage in agriculture. The aim of this study was to determine whether there is an inhibitory effect of earthworm colemic fluid extract (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta*, *Allolobophora chlorotica*) on growth of phytopathogenic fungi (*Fusarium culmorum*, *Phytium irregulare*, *Chalara elegans*), and also which of the species causes the highest percentage of inhibition. The results of this study have shown and confirmed the inhibitory effect of coleomic fluid of all three earthworm species on growth off all tested fungi species. The highest percentage of inhibition was observed in the growth of *Chalara elegans* by implementing colemic fluid of species *Dendrobaena veneta*.

Number of pages: 36
Number of figures: 19
Number of tables: 3
Number of references: 67
Original in: Croatian
Key words: earthworms, coelomic fluid, coelomocytes, phytopathogenic fungi, growth inhibition

Date of the thesis defence: 30th May 2019

Reviewers:
1. Zorana Katanić, PhD, assistant professor, chair
2. Mirna Velki, PhD, assistant professor, member
3. Rosemary Vuković, PhD, assistant professor, member
4. Senka Blažetić, PhD, assistant professor, member

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Mirni Velki, na pomoći, strpljenju, motivaciji i svom prenesenom znanju tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Hvala Vam za sve.

Također, zahvaljujem se komentorici doc. dr. sc. Sandri Ečimović na pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala svim članovima Zavoda za zaštitu bilja na Fakultetu za agrobiotehničke znanosti u Osijeku, posebice prof. dr. sc. Karolini Vrandečić i gospođi Rajki Latković, za sve savjete i pomoć pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojim prijateljicama koje su mi uljepšavale studentske dane. Hvala vam na svoj podršci.

Najveće hvala mojoj obitelji i Antunu bez čije bezuvjetne ljubavi i razumijevanja ovo ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Biologija i ekologija gujavica 1
1.2. Gujavice kao „inženjeri“ ekoloških sustava 2
1.3. Celomociti - posrednici imunološkog sustava gujavica 4
1.4. Fitopatogene gljive - uzročnici biljnih bolesti 5
1.5. Karakteristike fitopatogenih gljiva korištenih u istraživanju 7
1.6. Cilj istraživanja 10
2. MATERIJALI I METODE 11
2.1. Priprema ekstrakta celomske tekućine i tretiranje gujavica 11
2.2. Priprema inokulata i tretiranje gljiva 14
2.3. Mjerenje rasta gljiva 16
2.4. Statistička obrada podataka 16
3. REZULTATI 17
3.1. Inhibicija rasta micelija gljive *Fusarium culmorum* 17
3.2. Inhibicija rasta micelija gljive *Phytium irregulare* 19
3.3. Inhibicija rasta micelija gljive *Chalara elegans* 22
3.4. Inhibicija rasta micelija gljiva izražena u postocima 24
4. RASPRAVA 27
5. ZAKLJUČAK 30
6. LITERATURA 31

1. UVOD

1.1. Biologija i ekologija gujavica

Gujavice su metamerno segmentirani maločetinaši koji pripadaju koljenu Annelida i razredu Oligochaeta koji broji više od 8000 vrsta. Negativno su fototaksični, mekog tijela te imaju sekundarnu tjelesnu šupljinu nazvanu celom. Tijelo im je građeno od prstenastih segmenata tzv. anula koji imaju lokomotornu funkciju. Oni su saprofitski organizmi poljoprivrednih ekoloških sustava i bitna sastavnica makrofaune živih organizama u tlu (Patil i Biradar, 2017). Gujavice su prisutne u cijelom svijetu te nastanjuju gotovo sva područja osim onih u kojima prevladavaju ekstremni klimatski uvjeti kao što su pustinje i područja prekrivena ledom i snijegom. Aktivnosti gujavica razlikuju se ovisno o sezoni, a vrhunac aktivnosti postižu u proljeće i jesen. Tijekom zime gujavice ulaze dublje u tlo gdje su znatno zaštićenije od nepovoljnih zimskih uvjeta. Tijekom sušnih ljetnih perioda također se zakopavaju dublje u tlo i grade zidove prekrivene sluzi u koju se umotavaju tijekom procesa estivacije te ostaju sve dok okolišni čimbenici ne postanu povoljni (Edwards, 2004).

Iako sve vrste gujavica pridonose raspadu organske tvari biljnog podrijetla, bitno se razlikuju u načinu njegovog razlaganja. Prema tome, najčešće ih svrstavamo u tri morfo-ekološke kategorije: epigejne, endogejne i anecične gujavice. Epigejne vrste su većinom ograničene na sloj lisnog pokrova na površini tla i razlaganje organske tvari te rijetko ulaze dublje u tlo. Pronalazimo ih ispod listinaca, trulih panjeva, u površinskim dijelovima tla te na mjestima s povećanom količinom organske tvari, a najčešće su svijetlo crvene do smeđe boje (primjerice vrste *Eisenia andrei* i *Dendrobaena veneta*). Glavna uloga ovih vrsta je usitnjavanje organske tvari na finije čestice, što olakšava mikrobnu aktivnost. Endogejne vrste žive neposredno ispod površine tla većinu godine, osim kada su prisutne ekstremno hladne temperature ili suša, ne grade trajne hodnike u tlu te konzumiraju i organsku i anorgansku tvar. Ove vrste u tlu proizvode organski bogate tvari, koje onda odlažu ili nasumično u površinskim slojevima tla ili kao vidljive nakupine na samoj površini tla. Pripadnici ove skupine su većinom nepigmentirani ili blijedih boja (primjerice vrsta *Allolobophora chlorotica).* Anecične vrste, one koje stvarno nastanjuju tlo te grade trajne vertikalne hodnike koji ulaze u dublje slojeve tla, hrane se primarno organskom tvari, ali također konzumiraju i znatne količine anorganskih tvari i miješaju ih temeljito kroz profil tla pa su iz tog razloga od primarne važnosti u procesu pedogeneze. Najpoznatiji predstavnik je vrsta *Lumbricus terrestris*. Epigejne i anecične vrste se uglavnom hrane na površini lisnim pokrovom, dok endogejne vrste konzumiraju velike

količine tla i povezanih organskih ostataka. Istraživanja povezana s izborom hrane pokazala su da se gujavice ne hrane nasumice. Štoviše, zabilježene su značajne razlike u odabiru lisnog pokrova, pokazujući tako opću naklonost listovima s većim sadržajem dušika i nižim razinama sekundarnih metabolita (Bonkowski i sur., 2000; Hendriksen, 1990). Sve vrste gujavica ovise o konzumaciji organske tvari i imaju važnu ulogu u završnim fazama njegove razgradnje, odnosno humifikaciji, stvarajući komplekse amorfnih koloida koji sadrže fenole, unaprjeđujući tako ukupnu mikrobnu aktivnost u tlu (Edwards, 2004).

1.2. Gujavice kao „inženjeri“ ekoloških sustava

Gujavice su nedvojbeno najvažnija komponenta faune tla prvenstveno zbog njihovog utjecaja na formiranje i održavanje strukture i plodnosti tla. Iako nisu najbrojnije, zbog veličine tijela, gujavice uvelike pridonose biomasi beskralježnjaka u tlu. Njihove aktivnosti važne su za održavanje plodnosti tla u šumama, travnjacima i poljoprivrednim ekološkim sustavima. Gujavice imaju iznimnu važnost u formiranju tla, primarno kroz aktivnosti unosa organske tvari, njegove fragmentacije i pripojenja tlu pa se stoga nazivaju i „inženjerima“ ekoloških sustava. Kao što je Darwin uočio, gujavice prenose velike količine tla iz dubljih slojeva do površine, a svojom aktivnošću značajno pridonose aeraciji tla kopajući tunele. Ovakve aktivnosti od velikog su značaja kod gustih i zbijenijih tala jer omogućuju prolazak zraka kroz dublje slojeve tla minimalizirajući tako pojavu anaerobnih slojeva (Edwards, 2004). Štoviše, gujavice poboljšavaju i potiču mikrobiološku aktivnost u dubljim slojevima tla tako da iznose „sirovo tlo“ na površinu, a unose organsku tvar dublje u tlo. Aktivnosti gujavica poput kopanja i probavljanja organske tvari pozitivno utječu na poroznost i stabilnost tla, raspodjelu agregatnih čestica te hidrauličku provodljivost (Milleret i Le-Bayon, 2009).

Poznato je da biotičke interakcije organizama u tlu utječu na plodnost tla i rast biljaka na način da mijenjaju cirkulaciju nutrijenata i fizičku okolinu tla (Wardle, 2002). Gujavice mogu utjecati na rast biljaka mijenjajući dostupnost esencijalnih nutrijenata, posebice fosfora, dušika i ugljika koji su često njihov ograničavajući faktor (Le Bayon i Binet, 2006).

Aktivnost gujavica utječe na karakteristike tla i produktivnost biljaka na razne načine (Brown i sur., 2004). Utjecaj gujavica na rast biljaka primarno se ostvaruje putem korijena koji se može opisati kao senzor okoline tla čiji signali prvobitno kontroliraju rast i razvoj biljke na način da pružaju biljci esencijalne nutrijente i vodu (Aiken i Smucker, 1996). Gujavice kopajući duboke vertikalne hodnike potpomažu rast i prodiranje korijena biljke dublje u tlo u potrazi za

nutrijentima. Nadalje, gujavice mogu raspršiti spore endomikoriznih gljiva, gljiva koje stvaraju simbiontske odnose s višim biljkama u tlu, putem probave ili transportiranjem prenoseći ih na svome tijelu. Štoviše, prilikom kopanja gujavice mogu utjecati na razvoj micelija i time prekinuti kontakt vanjskih hifa gljiva s korijenjem biljaka, narušavajući tako izmjenu hranjivih tvari. Direktno probavljanje endomikoriznih gljiva može biti ili štetno tako da se smanji ukupna biomasa gljiva ili povoljno zbog povećane mineralizacije organske tvari aktivnošću faune koja rezultira stimulacijom rasta gljiva (Ortiz-Ceballos i sur., 2007).

Osim utjecaja na strukturu tla i rast biljaka, gujavice stupaju u niz interakcija s mikroorganizmima. Mikroorganizmi su ključna hranidbena komponenta podzemne faune beskralježnjaka koja o njima ovisi kao izvoru esencijalnih aminokiselina. Gujavice mogu direktno utjecati na mikrobnu populaciju konzumirajući velike količine tla i dovodeći mikroorganizme u doticaj s dotad nedostupnim izvorima hrane. Probavni sustav gujavice pruža idealnu okolinu za aktivnost mikroorganizama gdje može doći do povećanja produktivnosti i ukupnog broja mikroogranizama, dok s druge strane aktivnosti pojedinih mikroorganizama mogu biti smanjene (Brown i sur., 2000). Populacije mikroorganizama česte su u probavnom traktu, izmetu gujavica i drilosferi (Byzov i sur., 2007). Drilosfera je dinamična zona aktivnosti gujavica koja se konstantno mijenja u prostoru i vremenu kako gujavice unose i probavljaju tlo, kopaju tunele te stvaraju kompost različitom brzinom i na različitim mjestima u tlu (Edwards, 2004). Neka istraživanja pokazala su supresivni učinak tekućine probavnog trakta gujavica (engl. *gut fluid*) na germinaciju spora i vijabilnost cilijata (Moody i sur., 1996; Piearce i sur., 1980). Mehanizam ovog učinka nije u potpunosti razjašnjen, no dokazano je da se radi o neproteinskoj komponenti jer tekućina nije izgubila supresivnu aktivnost pri povećanju temperature do 98 °C (Byzov i sur., 2007).

Dok su mikrooorganizmi zaslužni za biokemijsku degradaciju organske tvari u procesu vermikompostiranja (stvaranja organskog komposta ili supstrata), gujavice imaju ulogu u stvaranju supstrata i poboljšavanju mikrobne aktivnosti u tlu. Gujavice su tzv. „mehaničke mješalice“ koji usitnjavaju organsku tvar, povećavaju površinu izloženu mikroorganizmima te miješaju fragmente tla i bakterijama bogat izmet homogenizirajući tako organsku tvar (Dominguez i sur., 2003).

Osim utjecaja na mikrobnu aktivnost gujavice mogu direktno ili indirektno utjecati na populacije mikroflore i faune u tlu. Rezultati istraživanja Domínguеza i sur. (2003) ukazuju na to da gujavice imaju snažan utjecaj na gustoću populacije i trofičku strukturu nematoda. U ranijim istraživanjima interakcija gujavica zabilježeno je smanjenje ukupne populacije

slobodno živućih nematoda za 66% te biljnih parazita za 64% (Dash i sur., 1980; Yeates, 1981). Smanjenje broja nematoda u prisutnosti gujavica ukazuje na izravnu ispašu ili u slučaju fungivornih nematoda kompeticiju za gljivama. U istraživanju Hyvönen i sur. (1994) dokazano je da vrsta *Dendrobaena octaedra* smanjuje broj nematoda, ali kao rezultat predacije, a ne kompeticije za hranom. Gujavice svojom aktivnošću poput kopanja mogu utjecati i na vertikalnu distribuciju i brojnost drugih organizama u tlu, primjerice skokuna (Collembola), dok oni mogu negativno utjecati na rast i razvoj gujavica. Uzroci ovakvih interakcija kriju se u kompeticiji za istim izvorom hrane bogate dušikom (Scheu i sur., 1999).

Na populacije gujavica u velikoj mjeri utječu mnoge od glavnih poljoprivrednih aktivnosti kao što su kultivacija, organska i anorganska gnojiva, pesticidi (insekticidi, herbicidi, fungicidi i nematocidi) te primjenjivanje plodoreda (Edwards, 2004). Sve veća upotreba pesticida u poljoprivredi ima značajan negativan utjecaj na gujavice. S obzirom da su gujavice jedne od najvažnijih komponenti faune tla takav utjecaj može dovesti do narušavanja ekološke ravnoteže tla pa je od iznimne važnosti proširiti istraživanja o pozitivnim učincima ovih organizama.

1.3. Celomociti - posrednici imunološkog sustava gujavica

Gujavice nemaju prava antitijela pa tako ni mogućnost stečenog imunološkog odgovora. Umjesto toga imaju učinkovit urođeni imunološki sustav za obranu od ulaska stranih tijela i patogena (Kathireswari i sur., 2014). Istraživanja su potvrdila da su gujavice razvile i humoralni i stanični imunološki odgovor u borbi protiv patogenih mikroorganizama (Beschin i sur., 1998; Bilej i sur., 2001; Field i sur., 2004). Ključnu ulogu u stvaranju imunološkog sustava gujavica imaju različite vrste celomocita (leukocita) koji se nalaze u celomskoj šupljini. Celomska šupljina ispunjena je celomskom tekućinom koja se sastoji od vodenastog matriksa, plazme i velikog broja celomocita deriviranih iz mezenhima, a u njoj se nalazi i značajan broj imunološki (atimikrobnih) aktivnih molekula (Patil i Biradar, 2017). Žuta boja celomske tekućine dolazi od riboflavina, koji se djelomično nalazi u samoj tekućini, a djelomično je povezan s velikim brojem celomocita koji se oslobađaju (Rochfort i sur., 2017). Celomska tekućina gujavica sadrži preko 40 proteina i ispoljava različite biološke funkcije uključujući bakteriostatske, proteolitičke, citolotičke, antimikrobne i mitogene aktivnosti (Cooper i sur., 2002, Cooper i Roch, 2003). Neke od aktivnih komponenti celomske tekućine za koje je dokazano da posjeduju antibakterijska i antifungalna svojstva su fetidin, lizenin, lumbricin I, CCF-1 (celomski citolitički faktor) te protein „Eiseniapore (38, kDa)“ (Kobayashi i sur., 2003, Engelmann i sur.,

2004, Mine i Kovacs-Nolan, 2004.). Gujavice obično izlučuju celomsku tekućinu za održavanje vlage tijela što im pomaže kod nekih fizioloških aktivnosti kao što je respiracija te kod kopanja tunela (Kathireswari i sur., 2014; Patil i Biradar, 2017). Celomsku tekućinu izbacuju kroz dorzalne pore kada su izložene stresu kao odgovor na mehaničke i kemijske podražaje (Patil i Biradar, 2017; Rochfort i sur., 2017).

Transport celomske tekućine između susjednih segmenata tijela gujavice osiguran je kanalima koji sadrže sfinktere, a svaki od segmenata otvora se prema okolini s parom nefridija i s jednom dorzalnom porom koja služi za izbacivanje tekućine. (Bilej i sur., 2000; Weidong i sur., 2003).

Celomociti su diferencirani u četiri različita tipa imunoloških stanica: amebocite, mukocite, kružne i kloragogene stanice od kojih su sve različitih oblika, veličina te širokih raspona funkcija. Amebociti su velike sferične stanice i pojavljuju se u znatnoj količini. Funkcija ovih stanica je uklanjanje štetnih bakterija iz organizma gujavica. U literaturi ih možemo pronaći i pod nazivima granulociti ili fagociti. Mukociti su produžene stanice s jezgrom na uskom kraju. Ove stanice izlučuju sluz kako bi koža gujavice uvijek bila vlažna za respiraciju ili neke druge fiziološke funkcije. Kloragogene stanice funkcionalno su opisane kao trofociti koji imaju nutritivnu ulogu te prenose proteine, lipide i glikogen do različitih stanica i organa cirkulacijom kroz celomsku tekućinu. Kružne stanice imaju jezgru u središtu čija je funkcija još uvijek nepoznata (Patil i Biradar, 2017).

1.4. Fitopatogene gljive - uzročnici biljnih bolesti

U proteklih nekoliko desetljeća sve je učestalije primjenjivanje konzervacijske obrade tla kao održive mjere za zaštitu od erozije i zbijanja tla, s ciljem održavanja vlage i smanjivanja troškova proizvodnje (Holland, 2004; Kassam i sur., 2009; Uri i sur., 1999). Koristeći organske tehnike upravljanja tlom poput zaštitnog pokrova za biljke, konzervacijska obrada tla poboljšava biološku raznolikost tla te povećava biološku aktivnost u tlu, što rezultira poboljšanim ciklusom nutrijenata i strukturnim razvojem samog tla (Hobbs, 2007; Holland 2004). Uz pozitivne učinke konzervacijske obrade tla, prisutni su i oni negativni, manje istraženi učinci. Primjerice povećanje stope preživljavanja različitih vrsta fitopatogenih gljiva, poput onih iz roda *Fusarium*, koji mogu biti štetni za zdravlje usjeva na način da povećaju rizik infekcija specifičnih biljnih bolesti (Pereyra i sur., 2004; Pereyra i Dill-Macky, 2008). Infekcije uzrokovane gljivama stvaraju široki spektar simptoma bolesti. Jedna od najvažnijih bolesti u

svijetu uzrokovana gljivicama kod žitarica je fuzarijska palež klasova (engl. *Fusaruium head blight*) koju uzrokuje više vrsta fitopatogenih gljiva iz roda *Fusarium* od kojih su najčešće *Fusarium graminearum, Fusarium culmorum* i *Fusarium avanaceum* (Nicholson i sur., 2003; Parry i sur., 1995).

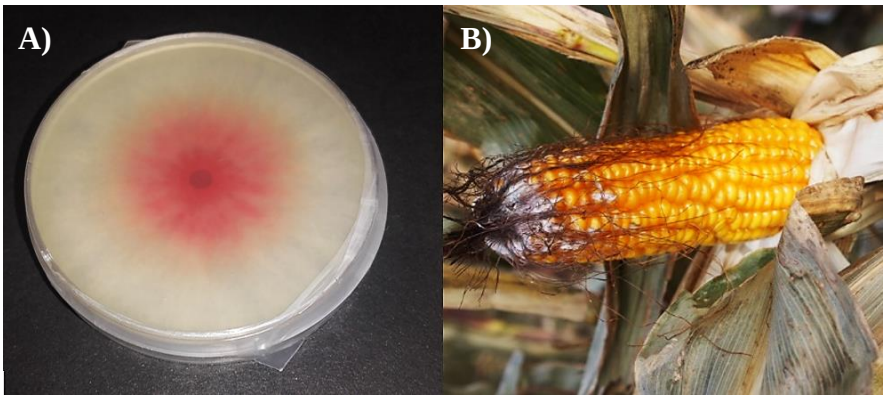
Gljive su razvile mnoštvo strategija kolonizacije biljaka i takve interakcije rezultiraju raznim ishodima od obostrano korisnih interakcija do smrti biljke domaćina. S obzirom na biljne patogene, gljive predstavljaju najrazličitiju skupinu sa značajnim ekološkim i ekonomskim prijetnjama. Fitopatogene gljive se obično dijele na dvije glavne skupine: biotrofne patogene koji formiraju bliske interakcije s biljkama i trajno nastanjuju živa tkiva te ih mogu iskorištavati (biotrofi) i nekrotrofne patogene koji uzrokuju smrt stanica i tkiva s ciljem ekstrakcije nutrijenata (nekrotrofi). Nekrotrofi uzrokuju nekroze, a naposlijetku i smrt same biljke (Doehlemann, 2017).

U povoljnim okolišnim uvjetima fitopatogene gljive izlučuju mnoštvo sekundarnih metabolita uključujući mikotoksine i sekretorne proteinske toksine koji induciraju staničnu smrt i doprinose fitopatogenosti na biljci domaćinu (Howlett, 2006). Biosinteza sekundarnih metabolita ovisi o vrsti gljiva, gljivičnom soju i njegovim genetskim osobinama, a mogu je potaknuti i okolišni uvjeti, odnosno fizikalno- kemijski parametri poput količine slobodne vode, količine kisika, temperature, sastava i pH supstrata i dr. (Kosalec i Pepeljnjak, 2004; Yiannikouris i Jouany, 2002). Najučestaliji mikotoksin vrste *F. culmorum* je trihotecenski mikotoksin deoksinivalenol (DON) te ga iz tog razloga često nalazimo kod žitarica (Curtui i sur., 2005; Pestka, 2007). U istraživanju Millera i sur. (2010) dokazano je kako se koncentracije DON-a kod pšenice mijenjaju s obzirom na klimatske i topografske čimbenike. Kontaminacija žitarica s ovim mikotoksinom veliki je problem koji vodi ka gubitku kvalitete u hrani baziranoj na žitaricama te može narušiti zdravlje životinja i ljudi (Bennett i Klich, 2003; Rotter, 1996). Na staničnoj razini DON inhibira DNA, RNA i sintezu proteina te ima negativne učinke na imunološki sustav (Smith i sur., 1995). U istraživanju Oldenburg i sur. (2007) dokazane su veće koncentracije DON-a u zrnu pšenice koje je došlo s polja u kojem se primjenjivala konzervacijska obrada tla u usporedbi s onom pšenicom s konvencionalno oranog polja i to zahvaljujući velikim količinama zaraženih ostataka usjeva koji su ostali na površini tla. Osim DON-a dokazano je da analog sfinganina, mikotoksin fumonizin B1 kojeg proizvode vrste roda *Fusarium*, može inducirati smrt biljnih stanica, akumulaciju ROS-a (reaktivnih kisikovih jedinki), taloženje kaloze i ekspresiju obrambenih gena kod vrste *Arabidopsis thaliana* (Stone i sur., 2000; Asai i sur., 2007).

1.5. Karakteristike fitopatogenih gljiva korištenih u istraživanju

Od velikog broja fitopatogenih gljiva koje mogu uzrokovati štetu biljnim organizmima, u ovom su istraživanju odabrane tri vrste: *Fusarium culmorum*, *Phytium irregulare* i *Chalara elegans*.

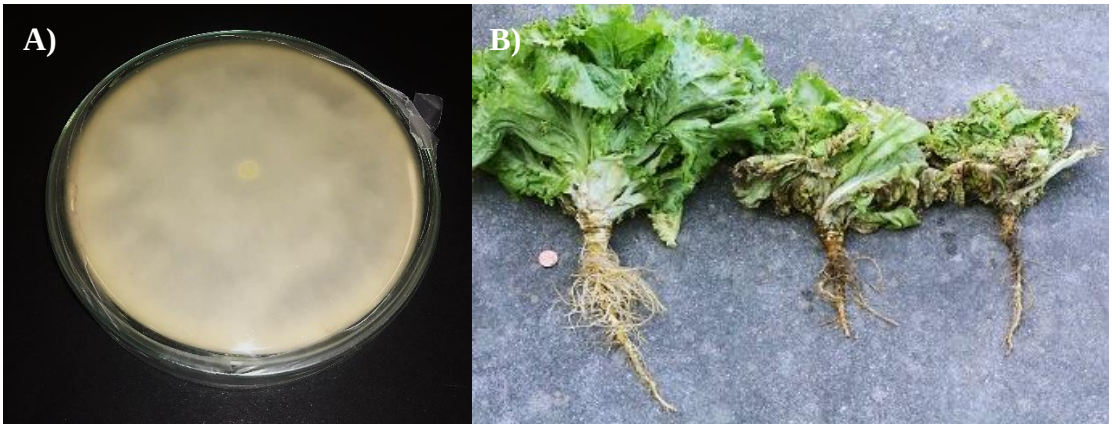
Fusarium culmorum vrsta je iz roda *Fusarium* koji uz fuzarijsku palež klasova uzrokuju i palež klijanaca (engl. *seedling blight*), trulež korijena (engl. *root rot*) i sniježnu plijesan na kukuruzu i pšenici (Ćosić i sur., 2004) (Slika 1B). Ova vrsta ima kratke i jake makrokonidije sa zakrivljenim ventralnim i dorzalnim površinama, dok mikrokonidje izostaju. Obično su prisutne klamidospore koje se stvaraju iz hifa ili iz stanica makrokonidija, a micelij je uglavnom bijel ili žučkasto smeđ. Nakupine hifa (engl. „*sporodochia*“) pojavljuju se starenjem kulture i imaju narančasto do crveno smeđe obojenje (Wagacha i Muthomi, 2007) (Slika 1A).



Slika 1. A) Micelij vrste *Fusarium culmorum* uzgojen u Petrijevoj zdjelici (originalna fotografija), **B)** Fuzarioza na klipu kukuruza (Izvor: https://www6.inra.fr)

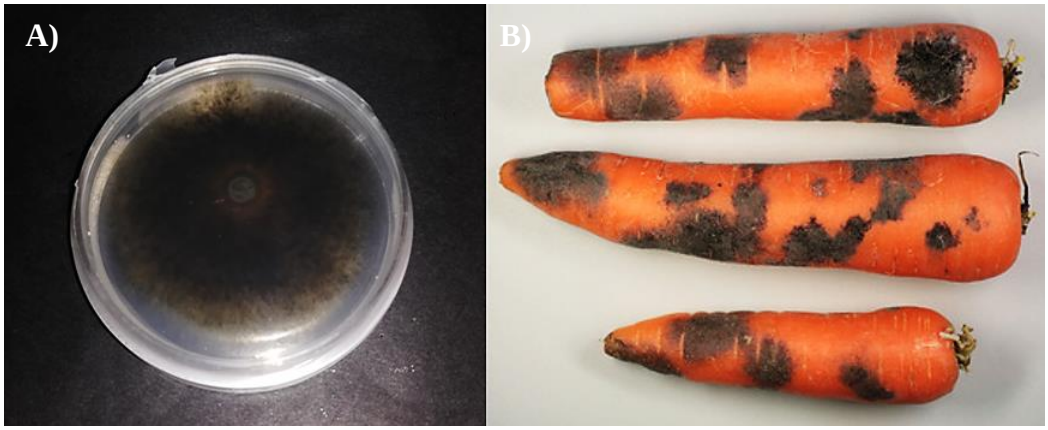
Pythium irregulare biljni je patogen koji pripada oomicetama, protistima nalik gljivama zbog sličnog životnog ciklusa. Oomicete penetriraju u biljne stanice degradirajući staničnu stijenku pomoću raznih enzima uključujući pektinaze, hemicelulaze, celulaze i proteinaze (Oliver i sur., 2009). *P. irregulare* je izrazito patogena vrsta za mnoge žitarice i mahunarke jer uzrokuje velike gubitke u prinosu i energiji same biljke. Kao i većina vrsta roda *Pythium*, *P. irregulare* uzrokuje bolesti klijanaca i korijena biljaka (engl. „*damping off*“ i „ *root rot*“), posebice pri uvjetima visoke vlage koja pogoduje širenju ovog patogena putem zoospora (Slika

2B). Micelij ove vrste može se opisati kao snježno bijeli s tankim, nježnim hifama (Cvjetković i sur., 2016) (Slika 2A). *P.irregulare* pripada skupini oomiceta koja je prvotno bila klasificirana pod carstvo gljiva, zbog mnogih morfoloških i funkcionalnih sličnosti, no s novijim saznanjima i dokazima o filogenetskoj vezi s fotosintetičkim organizmima kao što su smeđe alge i dijatomeje svrstavani su pod carstvo protista (Web 1).



Slika 2. A) Micelij vrste *Phytium irregulare* uzgojen u Petrijevoj zdjelici (originalna fotografija), **B)** Zakržljalost biljaka salate (desno) u usporedbi sa zdravom biljkom (lijevo) uzrokovana vrstom iz roda *Phytium* (Izvor: https://blog.agrivi.com)

Chalara elegans je gljiva koja uzrokuje crnu trulež korijenja na usjevima duhana, graha, kikirikija i pamuka, a i napada dijelove zemljišnih biljaka (Heller, 2012) (Slika 3B). Brzina i ozbiljnost infekcije i simptoma ovise o širokom spektru čimbenika uključujući osjetljivost biljke domaćina i kultivara, soj vrste *C. elegans* koji je prisutan i veličinu inokuluma gljive. *C. elegans* proizvodi dvije vrste spora: 1. Veće, tamne aleurispore koje su građene od kratkog lanca spora koji se s vremenom raspada na pojedinačne klamidospore koje mogu ostati dormantne u tlu i na suhim kontaminiranim površinama duže vrijeme između žetvi. Klamidospore su visoko rezistentne na kemijske sterilante i puno ih je teže uništiti nego spore rodova *Pythium* i *Phytophtora*; 2. Male i manje otporne endospore koje se proizvode nešto ranije od klamidospora. Ova vrsta stvara tamno smeđe do crne višestanične spore na zaraženom korijenu koje se lako prenose tlom, zrakom i vodom (Web 2) (Slika 3A).



Slika 3. **A)** Micelij vrste *Chalara elegans* uzgojen u Petrijevoj zdjelici (originalna fotografija), **B)** Crna trulež mrkve uzrokovana vrstom *Chalara elegans* (Izvor: https://www.discoverlife.org)

1.6. Cilj istraživanja

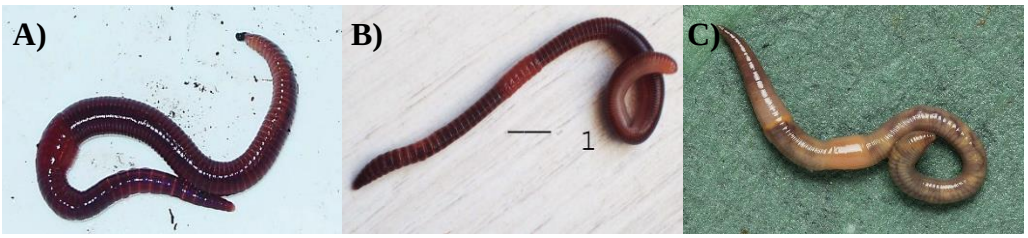
Cilj ovog istraživanja je utvrditi prisutnost inhibitornog učinka ekstrakta celomske tekućine triju vrsta gujavica (*Eisenia andrei, Dendrobaena veneta, Allolobophora chlorotica*) na rast i razvoj micelija triju vrsta fitopatogenih gljiva (*Fusarium culmorum, Phytium irregulare, Chalara elegans*). Potrebno je i utvrditi postoje li razlike među inhibitornim učincima različitih vrsta gujavica te koja od testiranih vrsta gljiva pokazuje najveću osjetljivost na celomsku tekućinu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema ekstrakta celomske tekućine i tretiranje gujavica

Za pripremu 500 mL fiziološke otopine za gujavice otopljeno je 3.25 g NaCl, 0.07 g KCl, 0.06 g $CaCl_2$, 0.1 g NaH_2CO_3 i 0.05 g NaH_2PO_4 u 500 mL destilirane H_2O. Pripremljena otopina pohranjena je u hladnjak na 4°C do korištenja.

U ovom istraživanju korištene su tri vrste gujavica: *Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica* (Slika 4). Odrasle jedinke gujavica nabavljene su od lokalnog uzgajivača te pohranjene u laboratoriju Zavoda za zoologiju, Odjela za Biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strosmayera za vrijeme trajanja eksperimenta. Potreban broj jedinki ispran je u prethodno priređenoj fiziološkoj otopini i ostavljen na čišćenju u Petrijevim zdjelicama na vlažnom filter papiru minimalno 24 h prije korištenja u eksperimentu. Za potrebe istraživanja korištene su samo odrasle jedinke gujavica s dobro razvijenim i vidljivim klitelumom.



Slika 4. Gujavice korištene u istraživanju: **A)** *Eisenia andrei* (Izvor: https://phys.org), **B)** *Dendrobaena veneta* (Izvor: https://www.researchgate.net), **C)** *Allolobophora chlorotica* (Izvor: https://www.earthwormwatch.org)

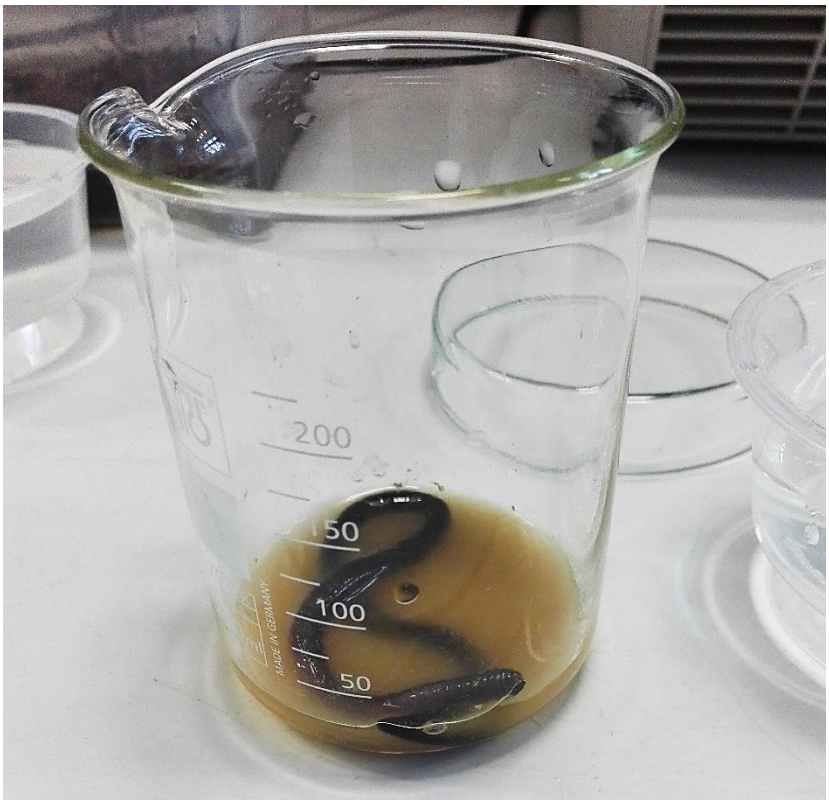
Nakon čišćenja, gujavice su isprane najprije destiliranom vodom, a zatim i fiziološkom otopinom u zasebnim posudicama kako bi se odstranili svi komadići zemlje i fecesa zaostalih na tijelu gujavice (Slika 5). U Petrijevu zdjelicu dodana je fiziološka otopina u omjeru: 4 mL otopine na 10 jedinki gujavica za vrstu *Eisenia andrei* te 4 mL otopine na 5 jedinki gujavica za vrstu *Dendrobaena veneta* zbog razlike u veličini gujavice i sukladno tome, količini ispuštene celomske tekućine. Ovaj postupak u potpunosti je rađen na ledu. Gujavice su zasebno stavljane u zdjelicu gdje su tretirane strujom u procesu elektrostimulacije. Kao izvor struje korišten je modificirani punjač na način da su obje elektrode bile prislonjene na tijelo gujavice oko 30 sekundi (Slika 6). Gujavica je prilikom prolaska struje kroz tijelo ispuštala celomsku tekućinu

u okolnu fiziološku otopinu. Nakon prikupljanja određenog volumena, ekstrakt celomske tekućine prebačen je pipetom u tubicu s čepom te držan na ledu do korištenja, a postupak elektrostimulacije ponovljen je nekoliko puta.

Slika 5. Jedinke vrste *Dendrobaena veneta* izdvojene za tretman (originalna fotografija)

Slika 6. Izbacivanje celomske tekućine procesom elektrostimulacije kod vrste *Eisenia andrei* (originalna fotografija)

Kod vrste *Allolobophora chlorotica* za dobivanje ekstrakta celomske tekućine korišten je ekstrakcijski pufer umjesto procesa elektrostimulacije zbog toga što su jedinke ove vrste znatno veće i kao takve nisu reagirale na stres uzrokovan elektrostimulacijom. Jedinke su pojedinačno stavljane u veće laboratorijske čaše u koje je prethodno usipano 8 mL ekstrakcijskog pufera te držane 60 sekundi ili sve dok su izbacivale celomsku tekućinu (Slika 7). S 8 mL ekstrakcijskog pufera tretirano je 15 jedinki, a dobiveni ekstrakt je prebačen u tubicu s čepom. Tubice s ekstraktima centrifugirane su na 60 sekundi kako bi se odvojio i bacio supernatant koji je bio pomiješan sa ekstraktom celomske tekućine, a koji je smanjivao koncentraciju samog ekstrakta, dok je talog resuspendiran s fiziološkom otopinom.



Slika 7. Izbacivanje celomske tekućine pomoću ekstrakcijskog pufera kod vrste *Allolobophora chlorotica* (originalna fotografija)

Kada je dobiven potreban volumen ekstrakta celomske tekućine, za sve vrste gujavica određena je početna koncentracija celomocita prebrojavanjem pod mikroskopom pomoću Bürker-Türkove komorice (Slika 8). Kapaljkom je nanesena mala količina ekstrakta na komoricu uz rub pokrovnice, a iz prebrojanih celomocita izračunat je ukupan broj stanica u 1 mL tekućine.

Nakon toga slijedila je priprema različitih koncentracija celomske tekućine. Za potrebe ovog eksperimenta korištene su približne koncentracije od 2000, 3500 i 5000 celomocita/mL ekstrakta celomske tekućine. Navedene koncentracije dobivene su razrijeđivanjem početne koncentracije s fiziološkom otopinom. Kao kontrola pripremljena je čista fiziološka otopina u jednakom volumenu za vrste *Eisenia andrei* i *Dendrobaena veneta,* te fiziološka otopina s ekstrakcijskim puferom za vrstu *Allolobophora chlorotica* kako bi se isključili utjecaji fiziološke otopine i ekstrakcijskog pufera na rast gljiva.

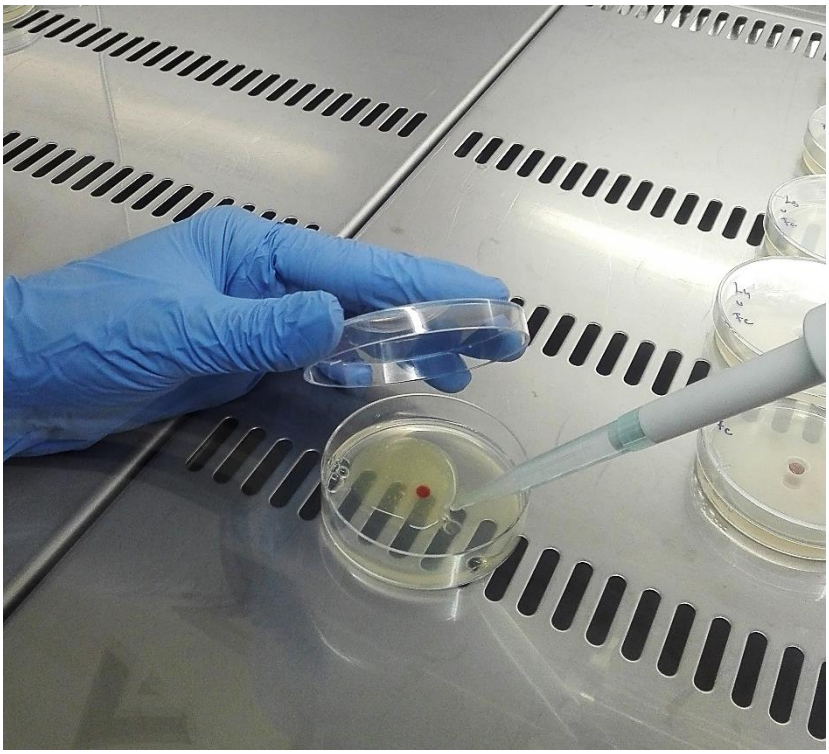
Slika 8. Prebrojavanje celomocita pod svjetlosnim mikroskopom pomoću pomoću Bürker-Türkove komorice (izvor: http://braukaiser.com)

2.2. Priprema inokulata i tretiranje gljiva

Za potrebe eksperimenta korištene su kulture triju vrsta fitopatogenih gljiva: *Fusarium culmorum, Phytium irregulare* i *Chalara elegans* koje su uzgajane u laboratoriju Zavoda za zaštitu bilja Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Gljive su uzgajane u specijaliziranoj komori u Petrijevim zdjelicama na hranjivoj podlozi uz temperaturne uvjete od 22°C te svjetlosnom režimu u omjeru dan i noć 12:12 h.

Radna površina i sav metalni pribor korišten pri rukovanju s gljivama steriliziran je kako bi se izbjegla kontaminacija. U prethodno sterilizirane plastične posudice promjera 6 cm za vrste *Fusarium culmorum* i *Chalara elegans* te promjera 9 cm za vrstu *Phytium irregulare* usipano je 5 mL, odnosno 7.5 mL hranjive podloge (PDA). Korištene su različite veličine posudica zbog razlike u brzini rasta gljiva. Nakon hlađenja, podloga je inokulirana s kružnim isječcima triju vrsta gljive zasebno, promjera 4 mm, a zatim tretirana s 1 mL ekstrakta celomske tekućine triju vrsta gujavica sa svakom od navedenih koncentracija i kontrolom (Slika 9). Za svaku koncentraciju i kontrolu napravljeno je 5 neovisnih replika. Nakon ispuštanja celomske

tekućine na inokulat gljive, tekućina je pravilno raspoređena po zdjelici laganim kružnim pokretima, a Petrijeve zdjelice omotane su parafilmom u svrhu smanjivanja rizika od kontaminacije te stavljene u uzgojne komore.

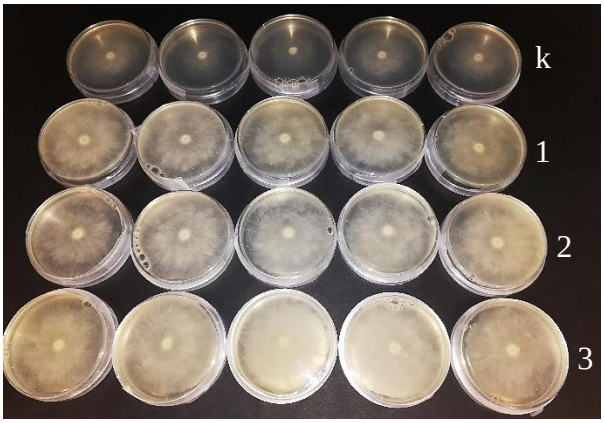


Slika 9. Tretiranje kružnog isječka micelija vrste *Fusarium culmorum* ekstraktom celomske tekućine gujavice (originalna fotografija)

Ukupno je napravljeno 9 zasebnih tretmana u kojima je ispitan učinak ekstrakta celomske tekućine triju vrsta gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*) na rast svake od triju vrsta fitopatogenih gljiva (*Fusarium culmorum*, *Phytium irregulare* i *Chalara elegans*). Svaki od 9 tretmana, odnosno utjecaj ekstrakta gujavice na rast pojedine vrste gljiva, ponovljen je minimalno 4 puta kako bi dobiveni rezultati bili statistički značajni.

2.3. Mjerenje rasta gljiva

Rast tretiranih gljiva praćen je na način da je mjeren promjer zračnog micelija 24, 48 i 72 h nakon inokulacije i tretmana ekstraktom celomske tekućine ili dok inokulati tretirani kontrolom nisu prerasli Petrijevu zdjelicu. Vrsta *Phytium irregulare* posudicu je prerasla već nakon 48 h (Slika 10), dok je za vrstu *Chalara elegans* bilo potrebno čak 10 dana.



Slika 10. Prikaz micelija vrste *Phytium irregulare* 48 h nakon tretmana celomskom tekućinom k- kontrolna skupina, 1- 2000 celomocita/mL, 2- 3500 celomocita/mL, 3- 5000 celomocita/mL (originalna fotografija)

2.4. Statistička obrada podataka

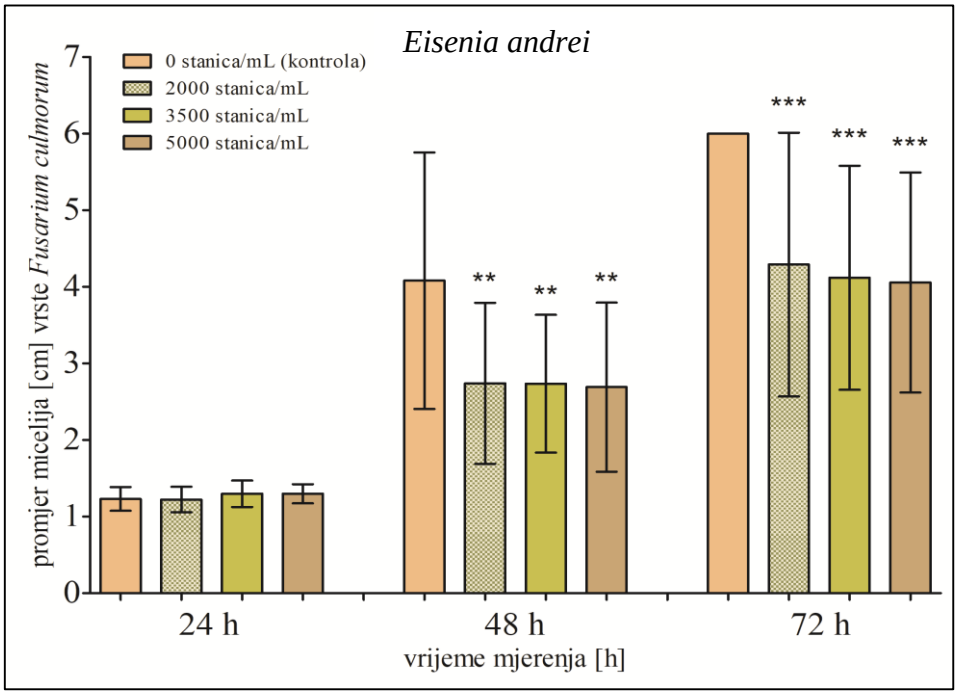
Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu GrapPad Prism 5. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Razlike između kontrolne i skupina izloženih različitim koncentracijama ekstrakta celomocita uspoređene su primjenom jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, proveden je Dunnett test višestruke usporedbe kako bi se odredilo koje se skupine razlikuju od kontrole. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

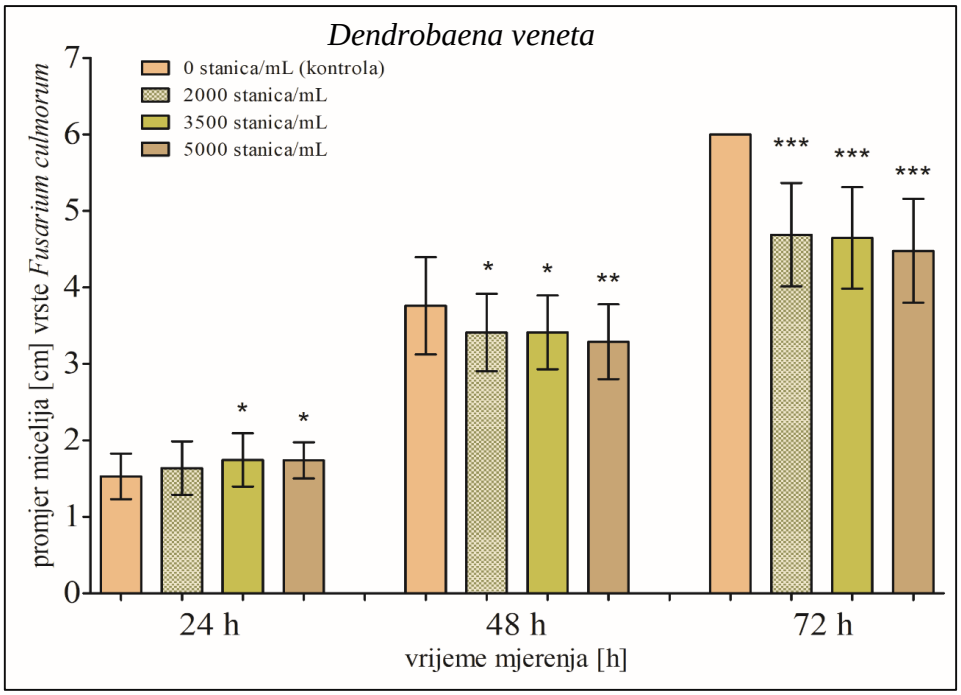
Utjecaj ekstrakta celomske tekućine triju vrsta gujavica: *Eisenia andrei, Dendobaeana veneta* i *Allolobophora chlorotica* na rast micelija triju vrsta gljiva: *Fusarium culmorum, Phytium irregulare* i *Chalara elegans* ispitan je mjerenjem porasta zračnog micelija gljiva 24, 48 i 72 h nakon tretmana različitim koncentracijama ekstrakta celomske tekućine ili dok kontrolna skupina nije prerasla Petrijevu zdjelicu.

3.1. Inhibicija rasta micelija gljive *Fusarium culmorum*

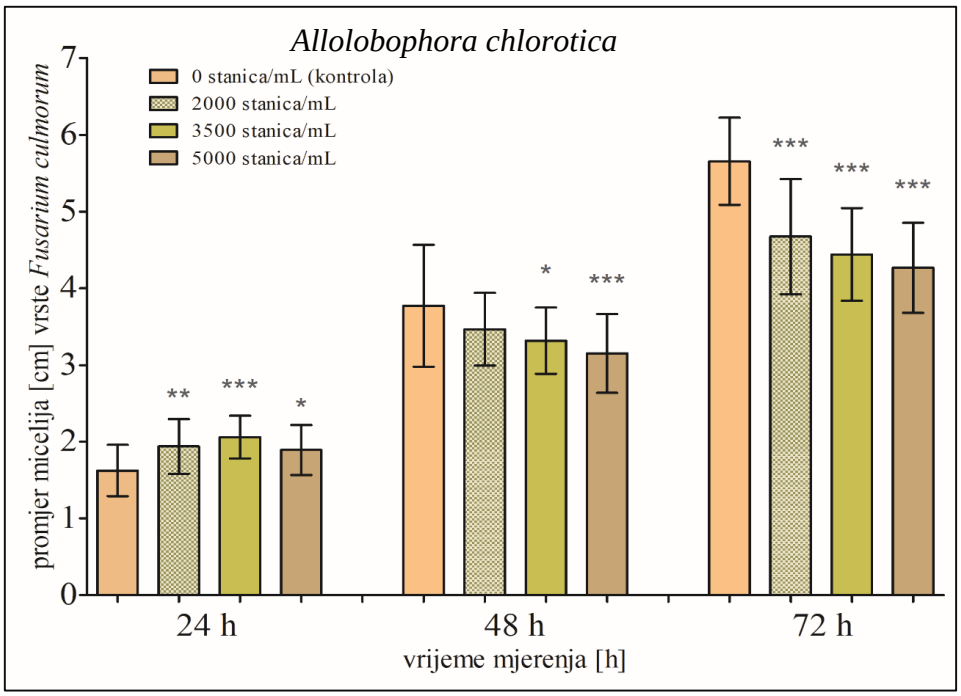
Rezultati inhibicije rasta gljive *Fusarium culmorum* prikazani su na Slikama 1, 2 i 3. Porast micelija mjeren je 24, 48 i 72 h nakon tretmana.



Slika 11. Promjer zračnog micelija vrste *Fusarium culmorum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Eisenia andrei*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).



Slika 12. Promjer zračnog micelija vrste *Fusarium culmorum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).



Slika 13. Promjer zračnog micelija vrste *Fusarium culmorum* 24, 48 i 72 h nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Allolobophora chlorotica*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

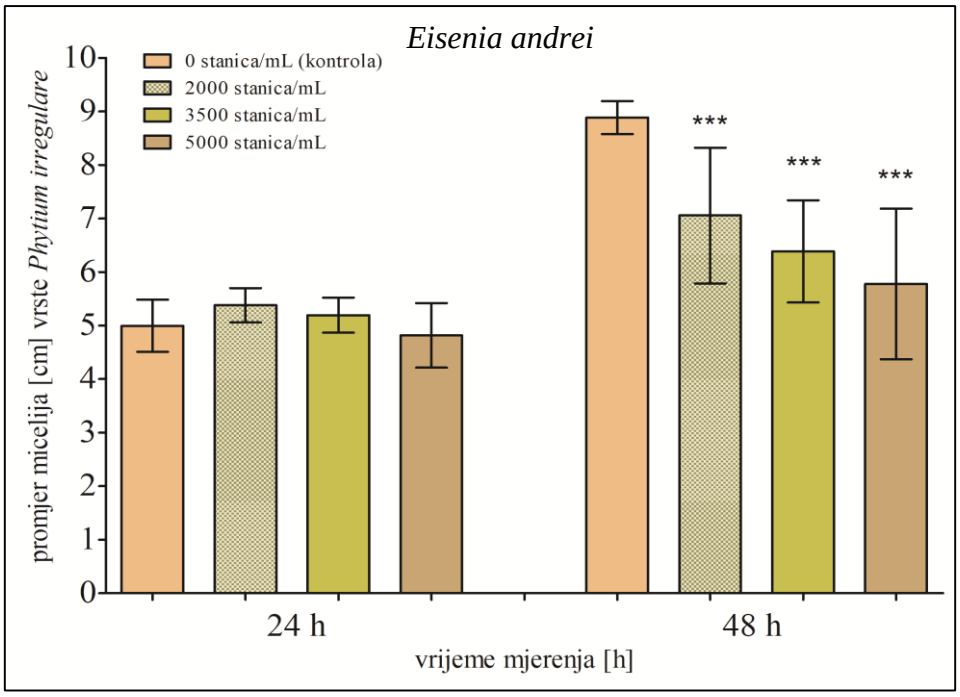
Iz rezultata (Slika 11, 12 i 13) je vidljivo da tretman od 24 h nije uzrokovao inhibiciju rasta micelija gljiva u odnosu na kontrolnu skupinu. Štoviše, nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrsta *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica* uočen je blagi, ali značajni rast gljive *Fusarium culmorum* (Slika 12 i 13).

Značajna inhibicija rasta u usporedbi s kontrolom uočena je 48 h nakon tretmana za sve tri vrste gujavica pri čemu su ekstrakti celomske tekućine vrsta *Eisenia andrei* i *Dendrobaena veneta* uzrokovali značajnu inhibiciju pri tretmanu svim testiranim koncentracijama (Slika 11 i 12), dok je ekstrakt vrste *Allolobophora chlorotica* uzrokovao značajnu inhibiciju pri tretmanu dvjema najvećim koncentracijama ekstrakta celomske tekućine (3500 i 5000 stanica/mL) (Slika 13).

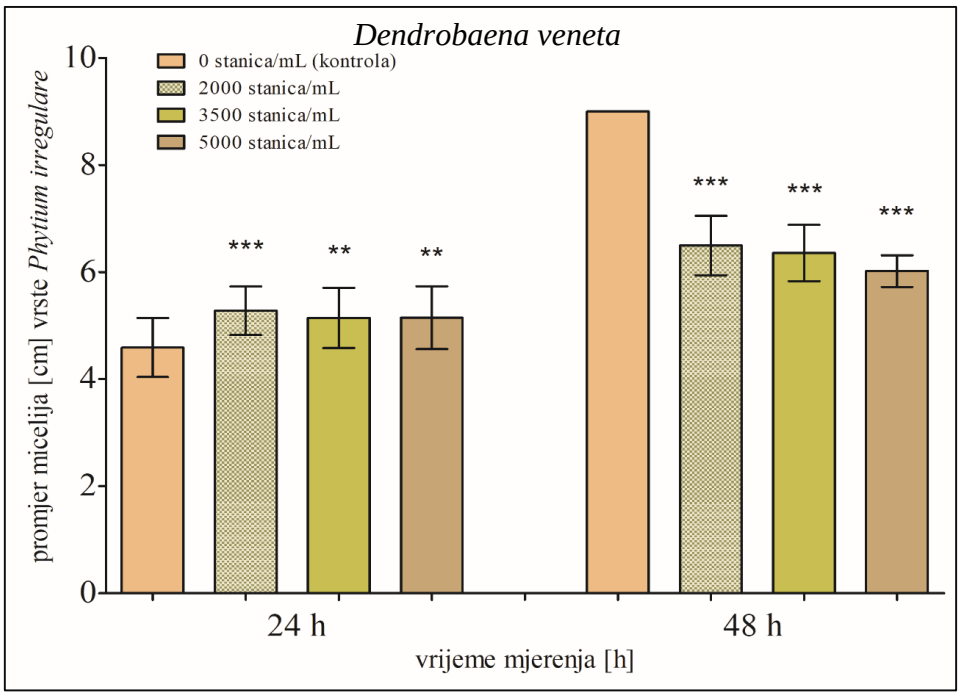
Tretman od 72 h uzrokovao je značajnu inhibicija rasta vrste *Fusarium culmorum* pri svim testiranim koncentracijama ekstrakta celomske tekućine kod sve tri vrste gujavica u usporedbi s kontrolom (Slika 11, 12 i 13). Najveći postotak inhibicije zabilježen je kod koncentracije 5000 stanica/mL, a najmanji kod koncentracije 2000 stanica/mL u sva tri slučaja.

3.2. Inhibicija rasta micelija gljive *Phytium irregulare*

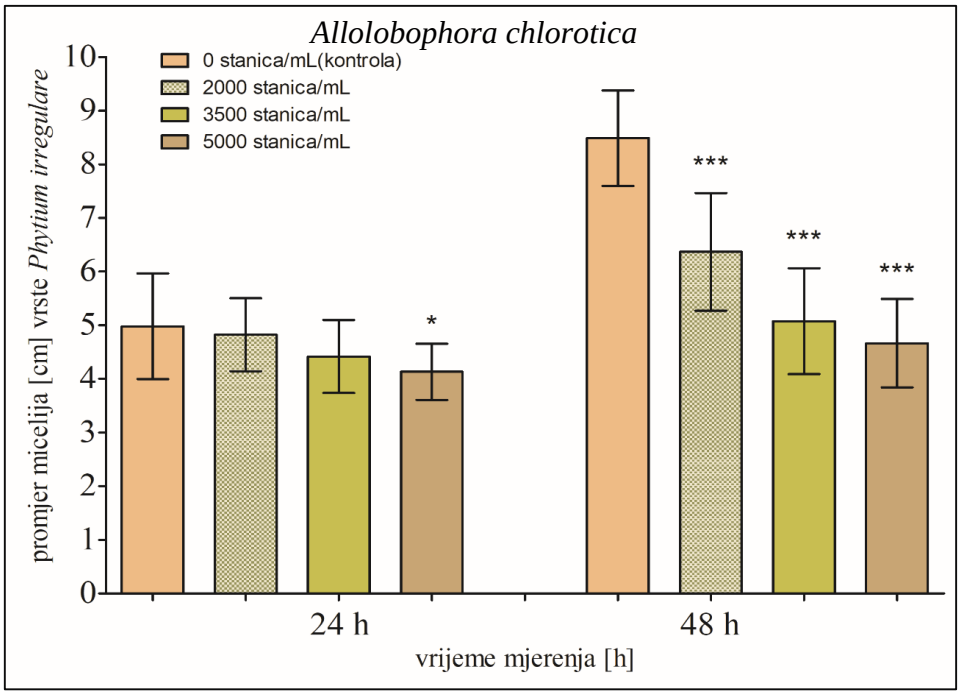
Porast zračnog micelija vrste *Phytium irregulare* mjeren je 24 i 48 h nakon tretmana te je gljiva uzgajana u posudicama promjera 9 cm zbog velike brzine rasta i razvoja njezina micelija koji bi onemogućio praćenje rasta u posudicama promjera 6 cm u kojima su uzgajane ostale vrste gljiva. Na Slikama 14, 15 i 16 prikazani su rezultati inhibicije rasta gljive *Phytium irregulare*.



Slika 14. Promjer zračnog micelija vrste *Phytium irregulare* 24 i 48 h nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Eisenia andrei*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).



Slika 15. Promjer zračnog micelija vrste *Phytium irregulare* 24 i 48 h nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).



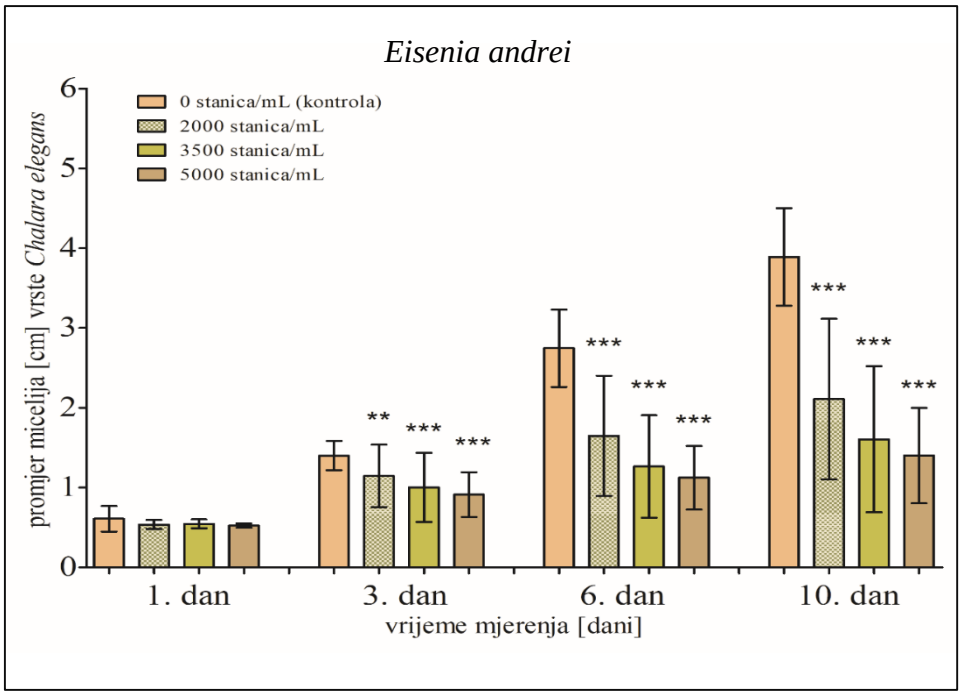
Slika 16. Promjer zračnog micelija vrste *Phytium irregulare* 24 i 48 h nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Allolobophora chlorotica*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Kao i kod vrste *Fusarium culmorum*, 24 h nakon tretmana nije uočena statistički značajna inhibicija rasta vrste *Phyitium irregulare* nakon izlaganja ekstraktu celomske tekućine vrste *Eisenia andrei* (Slika 14). Također kao i kod vrste *Fusarium culmorum*, ekstrakt celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta* 24 h nakon tretmana uzrokovao je značajan rast gljive *Phyitium irregulare* (Slika 15). Suprotno tome, ekstrakt celomske tekućine vrste *Allolobophora chlorotica* uzrokovao je značajnu inhibiciju rasta gljive *Phyitium irregulare* 24 h nakon tretmana najvećom koncentracijom (5000 stanica/mL) (Slika 6).

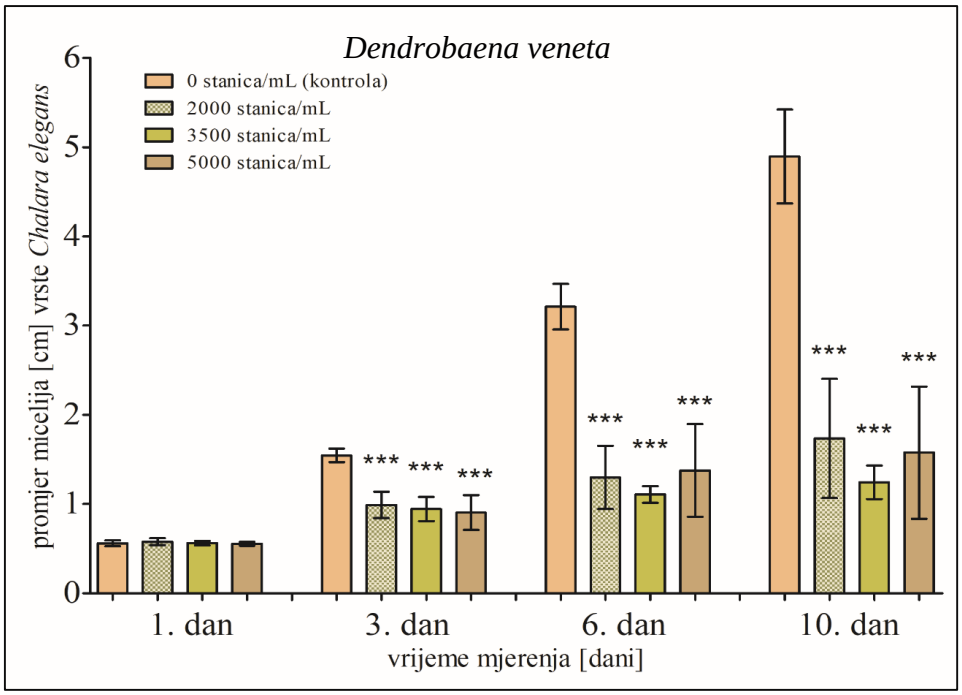
Nakon 48 h zabilježena je značajna inhibicija rasta micelija gljive u odnosu na kontrolu za ekstrakte celomske tekućine sve tri vrste gujavica i pri svim testiranim koncentracijama (Slika 14, 15 i 16). Jačina inhibicije rasta se povećavala s povećanjem koncentracija ekstrakta celomske tekućine.

3.3. Inhibicija rasta micelija gljive *Chalara elegans*

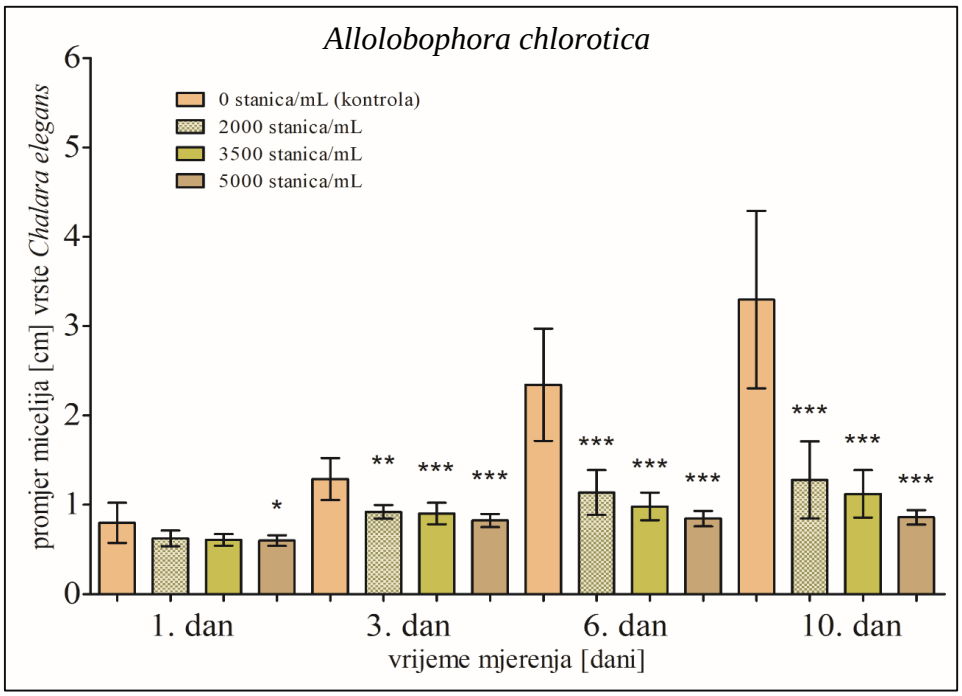
Za razliku od vrste *Phytium irregulare*, vrsta *Chalara elegans* je gljiva koja ima ograničeni i sporiji rast te je porast njezinog micelija mjeren do 10 dana nakon tretmana, a ni tada kontrolna skupina nije u potpunosti prerasla Petrijevu zdjelicu promjera 6 cm. Porast micelija nije mjeren svaki dan upravo zbog sporijeg rasta gljive pa su tako prikazani rezultati za 1., 3., 6. i 10. dan. Inhibicija rasta vrste *Chalara elegans* prikazana je na Slikama 17, 18 i 19.



Slika 17. Promjer zračnog micelija vrste *Chalara elegans* 1., 3., 6. i 10. dan nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Eisenia andrei*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).



Slika 18. Promjer zračnog micelija vrste *Chalara elegans* 1., 3., 6. i 10. dan nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).



Slika 19. Promjer zračnog micelija vrste *Chalara elegans* 1., 3., 6. i 10. dan nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *Allolobophora chlorotica*. Statistički značajne razlike označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Tretman od 24 h ekstraktima celomske tekućine vrsta *Eisenia andrei* (Slika 17) i *Dendrobaena veneta* (Slika 8) nije uzrokovao značajni učinak na rast vrste *Chalara elegans*. U slučaju ekstrakta celomske tekućine vrste *Allolobophora chlorotica* najveća koncentracija (5000 stanica/mL) uzrokovala je značajnu inhibiciju rasta već 24 h nakon tretmana (Slika 19).

3. dan (72 h) nakon tretmana uočeno je značajno smanjenje u rastu nakon primjene sve tri koncentracije ekstrakta celomske tekućine (2000, 3500 i 5000 stanica/mL) kod sve tri vrste gujavica (Slike 17, 18 i 19).

Nakon 6. i 10. dana zabilježena je značajna inhibicija rasta za sve koncentracije u usporedbi s kontrolom kod svih vrsta gujavica (Slika 17, 18 i 19). Također, kao i kod ostalih vrsta gljiva, inhibicija je bila najveća pri najvećoj koncentraciji ekstrakta celomske tekućine.

3.4. Inhibicija rasta micelija gljiva izražena u postocima

	Fusarium culmorum								
	Eisenia andrei			***Dendrobaena veneta***			***Allolobophora chlorotica***		
	Koncentracija celomocita [br.stanica/mL]								
Vrijeme [h]	**2000**	**3500**	**5000**	**2000**	**3500**	**5000**	**2000**	**3500**	**5000**
24	0,65% ↓	5,53% ↑	5,53% ↑	6,95% ↑	13,9 % ↑*	13,49% ↑*	19,29% ↑**	26,75% ↑***	16,39% ↑*
48	32,84% ↓	32,97% ↓	34,07% ↓ *	9,28% ↓ *	9,22% ↓ *	12,50% ↓ **	8,14% ↓	12,07% ↓*	16,50% ↓***
72	28,50% ↓ ***	31,37% ↓ ***	32,40% ↓ ***	21,84% ↓ ***	22,56% ↓ ***	25,38% ↓ ***	17,36% ↓ ***	21,46% ↓ ***	24,54% ↓ ***

Tablica 1. Promjene rasta micelija gljive *Fusarium culmorum* tretirane celomskom tekućinom gujavica u usporedbi s kontrolom. Promjene rasta izražene su u postocima (↓ - smanjenje rasta micelija, ↑ - povećanje rasta micelija). Statistički značajne promjene u rastu označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Kod vrste *Fusarium culmourm* 24 h nakon tretmana celomskom tekućinom uočeno je povećanje u porastu micelija u usporedbi s kontrolnom grupom za sve tri vrste gujavica s izuzetkom koncentracije od 2000 celomocita/mL vrste *Eisenia andrei* koja je uzrokovala neznačajno smanjenje u rastu. Najveći porast zabilježen je tretmanom vrste *Allolobophora chlorotica* pri koncentraciji od 3500 celomocita/mL s porastom od 26,75%, dok je za tretman

ekstraktom celomske tekućine vrste *E. andrei* zabilježena najmanja i statistički neznačajna promjena u porastu u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama (Tablica 1).

48 i 72 h nakon izlaganja ekstraktu celomske tekućine zabilježena je inhibicija rasta micelija vrste *Fusarium culmorum* za sve tri vrste gujavica i pri svim testiranim koncentracijama. Vrsta *Eisenia andrei* imala je najizraženiji učinak na micelij gljive s 34,07% inhibicije u odnosu na kontrolu pri najvećoj koncentraciji i to 48 h nakon tretmana, a zanimljivo je da je tretmanom od 48h zabilježen veći inhibitorni učinak od onog nakon 72 h za ovu vrstu gujavice pri svim koncentracijama. Tretmanom od 72 h zabilježena je statistički značajna inhibicija za sva tri slučaja pri svim koncetracijama (Tablica 1).

	Phytium irregulare								
	Eisenia andrei			***Dendrobaena veneta***			***Allolobophora chlorotica***		
	Koncentracija celomocita [br.stanica/mL]								
Vrijeme [h]	**2000**	**3500**	**5000**	**2000**	**3500**	**5000**	**2000**	**3500**	**5000**
24	7,65% ↑	3,98% ↑	3,60% ↓	15,03% ↑ ***	12,03% ↑ **	12,16% ↑ **	3,19% ↓	11,33% ↓	17,06% ↓ *
48	20,57% ↓ ***	32,97% ↓ ***	28,11% ↓ ***	27,80% ↓ ***	29,38% ↓ ***	33,13% ↓ ***	24,98% ↓ ***	40,19% ↓ ***	45,01% ↓ ***

Tablica 2. Promjene rasta micelija gljive *Phytium irregulare* tretirane celomskom tekućinom gujavica u usporedbi s kontrolom. Promjene rasta izražene su u postocima (↓ - smanjenje rasta micelija, ↑ - povećanje rasta micelija). Statistički značajne promjene u rastu označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Kod vrste *Phytium irregulare* 24 h nakon tretmana došlo je do povećanja u rastu micelija za vrste *Eisenia andrei* i *Dendrobaena veneta* kao i kod prethodne gljive s izuzetkom koncentracije od 5000 celomocita/mL za vrstu *E. andrei*, dok je kod tretmana celomskom tekućinom vrste *Allolobophora chlorotica* zabilježena inhibicija pri svim koncentracijama, a statistički značajna pri najvećoj koncentraciji s 17,06% (Tablica 2).

Tretman od 48 h uzrokovao je značajnu inhibiciju rasta vrste *Phytium irregulare* za sve tri vrste gujavica i pri svim koncentracijama. Najveća inhibicija zabilježena je djelovanjem ekstrakta celomske tekućine vrste *Allolobophora chlorotica* s inhibicijom od 45,01% u usporedbi s kontrolnom skupinom pri najvećoj testiranoj koncentraciji (Tablica 2).

	Chalara elegans								
	Eisenia andrei			***Dendrobaena veneta***			***Allolobophora chlorotica***		
	Koncentracija celomocita [br.stanica/mL]								
Vrijeme [h]	**2000**	**3500**	**5000**	**2000**	**3500**	**5000**	**2000**	**3500**	**5000**
24	11,80% ↓	10,56% ↓	14,11% ↓	3,23% ↑	0,12% ↑	0,91% ↓	21,92% ↓	23,95% ↓	24,89% ↓ *
72	18,10% ↓ **	28,37% ↓ ***	34,87% ↓ ***	35,94% ↓ ***	38,94% ↓ ***	41,48% ↓ ***	28,63% ↓ **	29,94% ↓ ***	36,06% ↓ ***
144	39,97% ↓ ***	53,95% ↓ ***	59,09% ↓ ***	59,57% ↓ ***	65,48% ↓ ***	57,11% ↓ ***	51,52% ↓ ***	58,17% ↓ ***	63,93% ↓ ***
240	45,83% ↓ ***	58,71% ↓ ***	63,97% ↓ ***	64,54% ↓ ***	74,58% ↓ ***	67,78% ↓ ***	61,19% ↓ ***	65,92% ↓ ***	73,89% ↓ ***

Tablica 3. Promjene rasta micelija gljive *Chalara elegans* tretirane celomskom tekućinom guajvica u usporedbi s kontrolom. Promjene rasta izražene su u postocima (↓ - smanjenje rasta micelija, ↑ - povećanje rasta micelija). Statistički značajne promjene u rastu označene su kao: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Za razliku od prethodnih, kod vrste *Chalara elegans* 24 h nakon tretmana možemo uočiti inhibiciju rasta micelija pri svim koncentracijama celomske tekućine vrsta *E. andrei i A. chlorotica* te kod najveće koncentracije vrste *Dendrobaena veneta*. Najveća inhibicija od 24,89% zabilježena je tretmanom vrste *Allolobophora chlorotica* pri koncentraciji od 5000 celomocita/mL (Tablica 3).

3., 6. i 10. dan nakon tretmana celomskom tekućinom uočena je značajna inhibicija rasta micelija vrste *Chalara elegans* za sve tri vrste gujavica i pri svim testiranim koncentracijama. Postotak inhibicije povećavao se s povećanjem koncentracija ekstrakta celomske tekućine i s vremenom trajanja tretmana. Najveća inhibicija zabilježena je za tretman vrste *Dendrobaena veneta* s 74,58% u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3).

4. RASPRAVA

U ranijim istraživanjima o interakcijama gujavica i fitopatogenih gljiva proučavani su neki od inhibitornih učinaka gujavica. U jednom istraživanju, bolesti uzrokovane gljivama *Rhizoctonia solani* i *Gaeumannomyces graminis* smanjene su u prisutnosti gujavice *Aporrectodea rosea* (Stephens i sur., 1994; Stephens i Davoren, 1995). Temeljni mehanizam koji je uzrokovao ovakvo smanjenje nije poznat, ali pretpostavlja se su za to zaslužne gujavice koje su se hranile gljivama (engl „*grazing"*) te na taj način smanjile njihovu brojnost i fitopatogeni potencijal. Istraživanjem prehrane gujavica, Edward i Fletcher (1988) kao glavni izvor hrane gujavica naveli su gljive i praživotinje, nakon kojih slijede alge i bakterije. Gujavice će uvijek izabrati one gljive koje su podložne ranoj sukcesiji kao znak izvora svježe organske tvari bogate nutrijentima, dok će gljive povezane sa starom organskom tvari s malo nutrijenata gujavice izbjegavati.

Utjecaj probavnog trakta gujavica na spore gljiva i ostale tipove propagula znatno se razlikuje kod različitih vrsta gujavica. Utjecaj može biti povoljan te omogućiti preživljavanja i poboljšanu germinaciju spora gljiva, dok s druge strane prolaskom kroz probavilo gljive mogu narušiti svoj fitopatogeni potencijal te izgubiti sposobnost razmnožavanja što dovodi do ukupnog smanjivanja njihove populacije. Uz različita svojstva propagula, preživljavanje u probavnom traktu gujavica ovisi i o različitim hranidbenim navikama gujavica koje se očituju u sadržaju njihovih probavnih enzima (Doube i Brown. 1998; Brown i sur., 2000, Fiolka i sur., 2010). Naime, uz izravan utjecaj probavom micelija i spora gljiva, gujavice mogu i putem neizravnog utjecaja smanjiti preživljavanje fitopatogenih gljiva. Anecične vrste gujavica poput vrste *Lumbricus terrestris*, koje uzimaju svježi lisni pokrov s površine i odnose ga duboko u tlo, mogu smanjiti populacije fitopatogenih gljiva koje se hrane saprofitski svježim lisnim pokrovom kao što je to vrsta *Fusarium* spp., odnoseći im hranu na njima nedostupna mjesta (Friberg i sur., 2005).

Prethodna istraživanja su uglavnom proučavala utjecaj probavila gujavica na populacije gljiva u tlu, dok se o utjecaju celomske tekućinu gujavica na fitopatogene gljive zna vrlo malo. Celomska tekućina gujavica, uz celomocite – stanice njihovog imunološkog sustava, sadrži i mnoge druge aktivne komponente koje imaju dokazana antimikrobna i antifungalna svojstva kao što su fetidin, lizenin, lumbricin I i lizozimi (Kobayashi i sur., 2003, Engelmann i sur., 2004, Mine i Kovacs-Nolan, 2004). Kako su u dosadašnjoj literaturi dokazani inhibitorni učinci probavila gujavice na populacije bakterija i gljiva u tlu, nužno je bilo istražiti hoće li celomska

tekućina gujavice izlučena u okolno tlo izravnim kontaktom s gljivama imati kakav utjecaj na njihov rast. Do sada je u literaturi poznato samo jedno istraživanje ovakvog utjecaja celomske tekućine (Plavšin i sur., 2017).

Glavni cilj ovog rada bio je ispitati i utvrditi inhibitorni učinak ekstrakta celomske tekućine triju vrsta gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*) na rast zračnog micelija triju vrsta gljiva (*Fusarium culmorum*, *Phyitium irregulare* i *Chalara elegans*). Dobiveni rezultati su potvrdili hipotezu ovog rada i dokazali inhibiciju rasta micelija svih testiranih vrsta gljiva djelovanjem ekstrakta celomske tekućine gujavica pri svim testiranim koncentracijama. Postotak inhibicije povećavao se rastom testiranih koncentracija celomske tekućine gujavica te vremenom trajanja tretmana pa je tako pri najvećoj koncentraciji od 5000 celomocita/mL i kod zadnjeg dana tretmana inhibicija bila najveća. Odstupanja od ovakvog obrasca zabilježena su kod vrste *Fusarium culmorum* tretmanom celomske tekućine gujavice *Eisenia andrei* gdje je za razliku od ostalih slučajeva najveća inhibicija uočena 48 h, a ne 72 h nakon tretmana, no bez statističke značajnosti za dvije od tri testirane koncentracije te kod vrste *Chalara elegans* gdje je ekstrakt celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta* pri koncentraciji od 3500 celomocita/mL uzrokovao veću inhibiciju od ekstrakta koncentracije 5000 celomocita/mL.

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima prijašnjeg istraživanja gdje je dokazan inhibitorni učinak ekstrakta celomske tekućine dvije vrste gujavica, *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*, na rast fitopatogene gljive *Fusarium oxysporum* (Plavšin i sur., 2017). U ovom radu korišteno je ukupno tri vrste gujavica i tri vrste gljiva kako bi ispitali postoje li razlike u inhibitornim učincima gujavica, te ima li razlika u osjetljivosti različitih vrsta fitopatogenih gljiva na celomsku tekućinu. Najveći postotak inhibicije gljive *Fusarium culmorum* od 34,07% zabilježen je djelovanjem celomske tekućine *gujavice Eisenia andrei*. Gljiva *Phytium irregulare* imala je najveći postotak inhibicije od 45,01% tretmanom gujavice *Allolobophora chlorotica*. Vrstu *Chalara elegans* najviše je inhibirala gujavica *Dendrobaena veneta* s 74,58%, što je ujedno i najveći postotak inhibicije zabilježen u ovom radu, te neznačajno manje gujavica *Allolobophora chlorotica* s 73,89% inhibicije. Različit postotak inhibicije može se pripisati različitoj osjetljivosti pojedine vrste gljiva na celomsku tekućinu gujavica. Prema dobivenim rezultatima kod vrste *Chalara elegans* zabilježena je najveća inhibicija, a jedan od mogućih razloga jest spori rast micelija ove gljive zbog kojeg je mjerenje njezinog rasta trajalo ukupno 10 dana, a dokazano je da se inhibicija povećavala s duljinom trajanja tretmana. Isto tako, moguće je da se sastav celomske tekućine gujavica razlikuje ovisno

o njezinoj vrsti i ekomorfološkoj kategorizaciji što može objasniti razliku u inhibiciji rasta gljive *Phytium irregulare* gdje je gujavica *Eisenia andrei* 48 h nakon tretmana prouzročila 28,11% inhibicije, a vrsta *Allolobophora chlorotica* čak 45,01% inhibicije, odnosno celomska tekućina vrste *Allolobophora chlorotica* imala je 62,45% jači učinak od celomske tekućine vrste *Phytium irregulare.*

Sve je veći naglasak na suzbijanju biljnih bolesti u poljoprivredi koje uzrokuju patogeni poput bakterija, virusa i gljiva. Takve bolesti smanjuju prinos i kvalitetu usjeva, a toksini koje oslobađaju patogeni mogu biti prisutni i u žetvi. Korištenje fungicida najraširenija je metoda suzbijanja ovih štetnika u svrhu osiguravanja dovoljne količine usjeva, no pesticidi smanjuju kvalitetu same biljke, zagađuju okoliš i najbitnije narušavaju zdravlje ljudi i životinja (Burketova i sur., 2015). Kako bi smanjili uporabu fungicida brojni znanstvenici bave se alternativnim metodama suzbijanja biljnih bolesti kao što je biološka kontrola u kojoj se u pravilu koristi populacija jedne vrste ili produkti njihovog organizma za smanjivanje populacije neke druge vrste (van Lenteren i sur., 2018). U nedavnom istraživanju u Španjolskoj primjenom augmentativne biološke kontrole uporaba kemijskih pesticida potpuno je zamijenjena organizmima kao što su grinje i polukrilci u svrhu kontrole širenja bolesti na crvenoj papričici (Calvo i sur., 2012).

Rezultati ovog istraživanja, kojima je dokazano da gujavice mogu utjecati na rast fitopatogenih gljiva, od velike su važnosti te mogu poslužiti kao temelj pri istraživanju novih metoda u zaštiti biljaka u poljoprivredi. Isto tako, potrebna su daljnja istraživanja kojima bi utvrdili postoji li sličan inhibitorni utjecaj drugih organizama koji također izlučuju celomsku tekućinu. Najveću pozornost trebalo bi usmjeriti na mehanizam inhibitornog djelovanja celomske tekućine koji još uvijek nije u potpunosti istražen, a koji je krucijalan za utvrđivanje primjenjivosti ovih saznanja u biološkoj kontroli fitopatogenih gljiva.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja dokazali su inhibitorni učinak ekstrakta celomske tekućine gujavica (*Eisenia andrei, Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*) na rast fitopatogenih gljiva (*Fusarium culmorum, Phyitium irregulare* i *Chalara elegans*). Postotak inhibicije povećavao se razmjerno povećanju koncentracije celomocita i periodu trajanja tretmana. Najveći postotak inhibicije zabilježen je kod vrste *Chalara elegans* djelovanjem celomske tekućine vrste *Dendrobaena veneta*.

Važno je naglasiti da su rezultati ovog istraživanja doveli do novih spoznaja čime je prošireno znanje o učincima celomske tekućine gujavica na rast fitopatogenih gljiva, kao i o mogućnostima poboljšanja i uvođenja novih bioloških metoda njihovog suzbijanja u poljoprivredi.

6. LITERATURA

Aiken, R. M., Smucker, A. J. M. (1996) Root system regulation of whole plant growth. Annual Review of Phytopathology 34: 325-346.

Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., Ausubel, F. M. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. Plant Cell 12: 1823–1836.

Bennett, J., Klich, M. (2003) Mycotoxins. Clinical microbiology reviews 16: 497-516.

Beschin, A., Bilej, M., Hanssens, F., Raymakers, J., Dyck, E. V., Revets, L. B., Brys, L., Gomez, J., De Baetslier, P., Tmmermans, M. (1998) Identification and cloning of a Glucan- and Lipo-polysaccharide binding protein from *Eisenia fetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. Journal of Biological Chemistry 273: 24948-24954.

Bilej, M., De Baetselier, P., Beschin, A. (2000) Anti-microbial defence of the earthworms. Folia Microbiologica 45: 283300.

Bilej, M., De Baetselier, P., Van Dijck, E., Stijlemans, B., Colige, A., Beschin, A. (2001) Distinct carbohydrate recognition domains of an invertebrate defence molecule recognize Gram-negative and Gram-positive bacteria. Journal of Biological Chemistry 49: 45840-45847.

Bonkowski, M., Griffiths, B. S., Ritz, K. (2000) Food preferences of earthworms for soil fungi. Pedobiologia 44: 666-676.

Brown, G. G., Barois, I., Lavelle, P. (2000) Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activityin the drilosphere and the role of interactionswith other edaphic functional domains. European Journal of Soil Biology 36: 177-198.

Burketova, L., Trda, L., Ott, P. G., & Valentova, O. (2015) Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. Biotechnology Advances 33: 994-1004.

Byzov, B. A., Khomyakov, N. V., Kharin, S. A., & Kurakov, A. V. (2007) Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. European Journal of Soil Biology 43: S149-S156.

Calvo, F. J., Bolckmans, K., Belda, J.E. (2012) Biological controlbased IPM in sweet pepper greenhouses using *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae). Biocontrol Science and Technology 22: 1398–1416

Cooper, E. L., Kauschke, E., & Cossarizza, A. (2002) Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. Bioessays, 24: 319-333.

Cooper, E. L. and Roch, P. (2003) Earthworm immunity: a model of immune competence. Pedobiologia. 47: 676 – 688.

Curtui, V., Brockmeyer, A., Dietrich, R., Kappenstein, O., Klaffke, H., Lepschy, J., Märtlauber, E., Schneider, E., Seidler, C., Thidert, G., Usleber, E. (2005) Deoxynivalenol in Lebensmitteln. Mycotoxin research, 21: 83-88.

Cvjetković, B., Sever, Z., & Fabek, S. (2016) Bolesti korijena u hidroponskom uzgoju i osvrt na parasite Thielaviopsis basicola (Berk. & Broome) Ferraris i Pythium sp. Glasilo biljne zaštite 16: 548-556.

Ćosić, J., Vrandečić, K., & Svitlica, B. (2004) *Fusarium* vrste izolirane s pšenice i kukuruza u istočnoj Hrvatskoj. Poljoprivreda 10: 5-8.

Dash, M. C., Senapati, B. K., & Mishra, C. C. (1980) Nematode feeding by tropical earthworms. Oikos 322-325.

Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W. , Sharon, A. (2017) Plant pathogenic fungi. Microbiology Spectrum 5: FUNK-0023-2016.

Domínguez, J., Parmelee, R. W., & Edwards, C. A. (2003) Interactions between *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and nematode populations during vermicomposting. Pedobiologia 47: 53-60.

Doube, B. M., Brown, G.G. (1998) Life in a complex community: Functional interactions between earthworms, organic matter microorganisms, and plants. In: Edwards CA, editor. Earthworm Ecology. Boca Raton: St. Lucie Press. pp 179-211.

Edwards, C. A. (2004) Earthworm ecology. CRC press.

Edwards, C. A., Fletcher, K. E. (1988) Interactions between earthworms and micro-organisms in organic-matter breakdown. Agriculture, Ecosystems & Environment 24: 235-247.

Engelmann, P., Kiss, J., Csongei, V., Cooper, E. L., Nemeth, P., (2004) Earthworm leukocytes kill HeLa, Hep-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. Journal of biochemical and biophysical methods 61: 215–227.

Field, S. G., Kurtz, J., Cooper, E. L., Michiels, N. K. (2004) Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. Journal of Invertebrate Pathology 86: 45-49.

Fiołka, M. J., Zagaja, M. P., Piersiak, T. D., Wróbel, M., & Pawelec, J. (2010) Gut bacterium of *Dendrobaena veneta* (Annelida: Oligochaeta) possesses antimycobacterial activity. Journal of invertebrate pathology 105: 63-73.

Friberg, H., Lagerlöf, J., & Rämert, B. (2005) Influence of soil fauna on fungal plant pathogens in agricultural and horticultural systems. Biocontrol Science and Technology 15: 641-658.

Heller, W. E. (2012) A new method of quantitative detection of *Chalara elegans* and *C. thielavioides* in soils using carrot discs. Journal of Plant diseases and Protection 119: 169-173.

Hendriksen, N. B. (1990) Leaf litter selection by detritivore and geophagous earthworms. Biology and Fertility of Soils 9: 17–21.

Hobbs, P. R. (2007) Conservation agriculture: what is it and why is it important for future sustainable food production? Journam of Agricultural Science-Cambridge 145: 127.

Holland, J. M. (2004) The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. Agriculture, ecosystems & environment 103: 1-25.

Howlett, B. J. (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. Current Opinion in Plant Biology 9: 371-375.

Hyvönen, R., & Persson, T. (1996) Effects of fungivorous and predatory arthropods on nematodes and tardigrades in microcosms with coniferous forest soil. Biology and fertility of soils 21: 121-127.

Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., & Krstanović, V. (2011) Toksičnost *Fusarium* toksina. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 6: 112-116.

Kassam, A., Friedrich, T., Shaxson, F., & Pretty, J. (2009) The spread of conservation agriculture: justification, sustainability and uptake. International journal of agricultural sustainability 7: 292-320.

Kathireswari, P., Alakesan, A., Abirami, P., & Sangeetha, P. (2014). Antimicrobial activity of earthworm coelomic fluid against diseases causing microorganisms. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 608-613.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S. (2004) Najznačajniji mikotoksini i mikotoksikoze. Praxis Veterinaria 52: 169-181.

Le Bayon, R. C., & Binet, F. (2006) Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. Soil Biology and Biochemistry *38*: 235-246.

Milleret, R., Le Bayon, R. C., & Gobat, J. M. (2009) Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. Plant and soil 316: 1-12.

Mine, Y., Kovacs-Nolan, J., (2004) Biologically active hen egg components in humam health and disease. The Journal of Poultry Science 41: 1‑29.

Moody, S. A., Piearce, T. G., & Dighton, J. (1996) Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and Aporrectodea longa. Soil Biology and Biochemistry 28: 533-537.

Müller, M. E., Brenning, A., Verch, G., Koszinski, S., & Sommer, M. (2010) Multifactorial spatial analysis of mycotoxin contamination of winter wheat at the field and landscape scale. Agriculture, ecosystems & environment 139: 245-254.

Nicholson, P., Chandler, E., Draeger, R. C., Gosman, N. E., Simpson, D. R., Thomsett, M., & Wilson, A. H. (2003) Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. European Journal of Plant Pathology 109: 691-703.

Oldenburg, E., Brunotte, J., & Weinert, J. (2007) Strategies to reduce DON contamination of wheat with different soil tillage and variety systems. Mycotoxin research 23: 73-77.

Oliver, J. P., Castro, A., Gaggero, C., Cascón, T., Schmelz, E. A., Castresana, C., & De León, I. P. (2009) *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. Planta 230: 569-579.

Ortiz-Ceballos, A. I., Peña-Cabriales, J. J., Fragoso, C., & Brown, G. G. (2007) Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvetbean mulch. Biology and Fertility of Soils, 44: 181-186.

Parry, D. W., Jenkinson, P., & McLeod, L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. Plant pathology 44: 207-238.

Patil, S. R., & Biradar, P. M. (2017) Earthworms coelomic fluid: extraction and importance. International Journal of Advanced Scientific Research 2: 01-04.

Pereyra, S. A., & Dill-Macky, R. (2008) Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum. Plant Disease, 92: 800-807.

Pereyra, S. A., Dill-Macky, R., & Sims, A. L. (2004) Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. Plant Disease 88: 724-730.

Pestka, J. J. (2007) Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. Animal feed science and technology 137: 283-298.

Piearce, T. G., & Phillips, M. J. (1980) Fate of ciliates in the earthworm gut: An in vitro study. Microbial ecology 5: 313-319.

Plavšin, I., Velki, M., Ečimović, S., Vrandečić, K., & Ćosić, J. (2017) Inhibitory effect of earthworm coelomic fluid on growth of the plant parasitic fungus *Fusarium oxysporum*. European journal of soil biology 78: 1-6.

Rochfort, S., Wyatt, M. A., Liebeke, M., Southam, A. D., Viant, M. R., & Bundy, J. G. (2017) Aromatic metabolites from the coelomic fluid of *Eisenia* earthworm species. European journal of soil biology 78: 17-19.

Rotter, B. A. (1996) Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). Journal of Toxicology and Environmental Health Part A 48: 1-34.

Scheu, S., Theenhaus, A., & Jones, T. H. (1999) Links between the detritivore and the herbivore system: effects of earthworms and Collembola on plant growth and aphid development. Oecologia 119: 541-551.

Smith, J. E., Solomons, G., Lewis, C., & Anderson, J. G. (1995) Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. Natural Toxins 3: 187-192.

Stephens, P. M., Davoren, C. W. (1995) Effect of the lumbricid earthworm *Aporrectodea trapezoides* on wheat grain yield in the field, in the presence or absence of *Rhizoctonia solani* and *Gaeumannomyces graminis var. tritici* . Soil Biology & Biochemistry 28: 561-567.

Stephens, P. M., Davoren, C. W., Doube, B. M., Ryder, M. H. (1994) Ability of the lumbricid earthworms *Aporrectodea rosea* and *Aporrectodea trapezoides* to reduce the severity of take-all under greenhouse and field conditions. Soil Biology & Biochemistry 26: 1291-1297.

Stone, J. M., Heard, J. E., Asai, T., Ausubel, F. M. (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1 resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. Plant Cell 12: 1811–1822

Uri, N. D., Atwood, J. D., & Sanabria, J. (1999) The environmental benefits and costs of conservation tillage. Environmental Geology 38: 111-125

Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2007) *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop protection 26: 877-885.

Wardle, D. A. (2002) Communities and ecosystems: linking the aboveground and belowground components (Vol. 34). Princeton University Press.

Pan,W., Liu, S., Ge, F., Zheng, T. (2003) Reconfirmation of anti-microbial activity in the coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia fetida andrei* by colorimetric assay. Journal of Biosiences 28: 723-731.

Yeates, G. W. (1981) Soil nematode populations depressed in the presence of earthworms. Pedobiologia 22: 191-195.

Yiannikouris, A. J, Jouany, P. (2002) Mycotoxins in feed and their fate in animals: a review. Animal Resarch 51: 81-99.

Web izvor:

Web 1. http://www.phytopathdb.org/content/pythium-irregulare

Web 2. http://plantclinic.cornell.edu/factsheets/blackrootrot.pdf