

Utjecaj sekundarnih metabolita *Fusarium solani* na patogenu gljivicu *Fusarium culmorum*

Ižaković, Ema

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:371571>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ema Ižaković

Preddiplomski stručni studij Bilinogojstvo

Smjer: Ratarstvo

**Utjecaj sekundarnih metabolita *Fusarium solani* na patogenu
gljivicu *Fusarium culmorum***

ZAVRŠNI RAD

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ema Ižaković

Prediplomski stručni studij Bilinogojstvo

Smjer: Ratarstvo

**Utjecaj sekundarnih metabolita *Fusarium solani* na patogenu
gljivicu *Fusarium culmorum***

ZAVRŠNI RAD

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jelena Ilić, mentor
3. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, član

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Preddiplomski stručni studij Bilinogojstvo

Ema Ižaković

Utjecaj sekundarnih metabolita *Fusarium solani* na patogenu gljivicu *Fusarium culmorum*

Sažetak: Cilj ovog istraživanja je bilo utvrditi kako endofitna vrsta *Fusarium solani* djeluje na fitopatogenu gljivicu *Fusarium culmorum*. Provedena su dva pokusa. Nakon ispitivanja u prvom pokusu utvrdili smo da ekstrakt gljivice *F. solani* ne pokazuje antimikrobno djelovanje na porast gljivice *F. culmorum*. Drugi je pokus dao bolje rezultate, te se pokazalo da zrna inokulirana endofitom, a zaražena sa *F. culmorum* bolje klijanju nego zrna zaražena samo sa *F. culmorum* iako taj utjecaj nije statistički značajan. Iz dobivenih rezultata zaključili smo da postoji određen pozitivan utjecaj endofita na klijanje zrna, te protiv zaraze s *F. culmorum*.

Ključne riječi: endofiti, sekundarni metaboliti, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Final work

Faculty of Agriculture in Osijek

Professional study Plant production

Ema Ižaković

Influence of secondary metabolites of *Fusarium solani* on pathogenic fungi *Fusarium culmorum*

Summary: The aim of this study was to find out how endophytic species *Fusarium solani* affects phytopathogenic fungi *Fusarium culmorum*. Two experiments were carried out and after first experiment we have determined that the extract of *F. solani* does not exhibit antimicrobial activity on the growth of *F. culmorum* fungi. The second experiment gave better results and showed that the grain that was inoculated with endophyte and infected with *F. culmorum* better germinate than the grain infected with only *F. culmorum* although that influence is not statistically important. From the obtained results, we conclude that there are certain positive influence of endophyte on grain germination and against infection with *F. culmorum*.

Key words: endophytes, secondary metabolites, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Fusarium.....	4
1.1.1.	<i>Fusarium solani</i>	5
1.1.2.	<i>Fusarium culmorum</i>	6
2.	MATERIJALI I METODE.....	8
2.1.	Uzgoj endofitnih i patogenih gljivica.....	8
2.2.	Priprema ekstrakta endofitnih gljivica.....	8
2.3.	Ispitivanje antimikrobnog djelovanja ekstrakta endofita gljivica.....	8
2.3.1.	<i>Primjena metode otvora u PDA podlozi</i>	8
2.4.	Metoda inokulacije sjemena.....	9
3.	REZULTATI I RASPRAVA.....	11
4.	ZAKLJUČAK.....	16
5.	LITERATURA.....	17
6.	POPIS SLIKA.....	19
7.	POPIS TABLICA.....	20

1. UVOD

U endofitne organizme ubrajamo organizme, najčešće bakterije i gljive, koji cijeli svoj život ili samo dio njega provedu kolonizirajući inter ili intracelularne dijelove zdravog tkiva biljke. Oni u cijelosti borave unutar tkiva biljke, stabljike ili lišća, nastanjuju spore biljaka ili uzrokuju starenje tkiva domaćina (Tan i Zou, 2001.). Dokazi koji su pronađeni o mikroorganizmima koji su povezani sa biljkama u fosiliziranim tkivima lišća i stabljika, pokazali su da se odnos endofita i biljke razvijao još od vremena kada su se više biljke prvi put pojavile na zemlji (Redecker i sur., 2000.). Još od kraja 19. stoljeća poznato je postojanje gljiva unutar organa biljaka (Guerin, 1898.), a pojam „endofiti“ prvi se puta spominje 1886 (de Bary), a otkako su endofiti prvi put opisani 1904. godine (Freeman) do danas su izdvojeni iz različitih dijelova biljaka, od prirodnih staništa do agronomskog ekosistema te se može zaključiti da sve vrste biljaka koje su proučavane u sebi skrivaju barem jednog endofita (Kusari i sur., 2012.).

Neki endofiti koloniziraju biljku, nalaze se unutar njezinog tkiva i uzimaju joj nutrijente, a zauzvrat joj daju sposobnost za obranu tako što proizvode određene funkcionalne metabolite. Te biljke koje su zaražene endofitima rastu brže od onih koje nisu zaražene. Također, neki endofiti pozitivno djeluju na adaptabilnost biljke, na način da povećavaju njezinu toleranciju na negativne učinke okoliša koji prouzrokuju stres, a povećavaju i otpornost na fitopatogene i na biljojede uključujući i neke insekte koji se hrane na biljci domaćinu. Sposobni su i pružiti biljci zaštitu od nekih sisavaca, nematoda, insekata, od bakterijskih i gljivičnih patogena (Tan i Zou, 2011.). Bilo koja interakcija koja se događa između gljive i biljke mora prethoditi fizičkom susretu između te dvije vrste, a u taj susret su uključene brojne fizičke i kemijske barijere, koje je potrebno prevladati kako bi se moglo uspješno uspostaviti udruživanje. Patogeni i endofiti imaju mnoge čimbenike zaraze koji se suprotstavljaju sredstvima obrane biljaka. U slučaju da su gljivična zaraza i obrana biljke uravnoteženi, zajednica ove dvije vrste postaje asimptomatična i nevirulentna. Ako se mehanizam obrane kod biljka u potpunosti suprotstavi faktorima zaraze, gljiva će propasti. U drugom slučaju, ako biljka podlegne zarazi gljive, odnos biljke i gljive doveo bi do bolesti biljke (Kusari i sur., 2012.).

Najčešće kao endofitne organizme spominjemo bakterije i gljive. Gljive se od bakterija razlikuju po tome što su na višem stupnju razvoja te imaju više kompleksnih

bioloških procesa. Razlika je i u tome što one imaju jasno definiranu jezgru, dvoslojnu staničnu stijenku te fiziologiju i način razmnožavanja (Karakašević, 1987.).

Na svijetu postoji oko 1 000 000 različitih vrsta gljiva, a opisano je samo oko 100 000 vrsta gljiva. One su vrlo rasprostranjene i nalaze se u vodi, zraku, zemlji, kod čovjeka, biljaka i životinja. Velik je broj vrsta gljiva apatogen, ali se jedan dio njih prilagodio parazitskom načinu života te mogu parazitirati biljke, životinje i ljude. Gljive dijelimo na saprofite, nekrofite, simbionte i parazite i najpoznatiji su uzročnici biljnih bolesti (Pusztahelyi i sur., 2015).

Većina je gljiva nastala reprodukcijom spora i imaju tijelo talus koji se sastoji od mikroskopskih cjevastih stanica koje se nazivaju hife. Spadaju u heterotrofe, i one kao i životinje prikupljaju ugljik iz drugih organizama. Gljive koje prikupljaju hranjive tvari iz žive biljke ili životinje nazivaju se biotrofi, one koje se hrane na mrtvoj biljci ili životinji nazivaju se saprofiti. Gljive koje parazitiraju na drugim biljkama, te uništavaju zdrave stanice biljaka i hrane se njihovim nutrijentima, nazivaju se nekrofiti (Carris i sur., 2012.). Velika većina biljaka nije proučavana na prisustvo endofita i to otvara mogućnosti za otkrivanje novih gljiva, njihovih oblika, vrsta i biotopa. Proizvodnja bioaktivnih spojeva, a posebice onih koje su važne za biljke domaćina, nije važna samo iz ekološke nego i iz biokemijske i molekularne perspektive. Postoje mnoge mogućnosti za iskorištenje endofitnih gljiva za proizvodnju mnoštva poznatih i novih biološki aktivnih sekundarnih metabolita (Kusari i sur., 2012.).

Mnogi endofiti su sposobni sintetizirati različite bioaktivne metabolite koji mogu biti korišteni direktno ili indirektno protiv velikog broja bolesti. Endofiti su bogat i pouzdan izvor genetske raznolikosti. Gljive proizvode velik broj sekundarnih metabolita, a to su spojevi koje proizvode organizmi i koji nisu neophodni za primarne metaboličke procese. Neki od spojeva koje ispuštaju gljivice utječu na organizme koji su u interakciji sa gljivama, te dovode do nove uloge metabolita. Sekundarni su metaboliti najčešće proizvedeni u toku aktivnog rasta i mnogi od njih imaju neobičnu kemijsku strukturu (Tan i Zou, 2001.). Proizvedeni sekundarni metaboliti različiti su po strukturi i po biološkoj aktivnosti. Neki od njih imaju pigmente, drugi su otrovni za biljke i/ili životinje, jedan dio njih regulira rast biljke ili ima farmaceutska svojstva, a neki, uključujući i metabolite roda *Fusarium* pridonose patogenezi biljaka (Ma i sur., 2013.).

Biljne se bolesti moraju kontrolirati kako bi se održala kvaliteta biljne hrane. Za sprječavanje ili ublažavanje biljnih bolesti koriste se različiti pristupi, a jedan od tih pristupa je biološka kontrola. Biološka kontrola u entomologiji označava upotrebu entomopatogenih nematoda, mikrobnih patogena ili živih grabežljivih insekata kako bi se suzbili insekti koji su štetni. U fitopatologiji se koriste mikrobn antagonisti za suzbijanje bolesti. U oba područja organizam koji se koristi za suzbijanje štetnika naziva se biološki kontrolni agens. Također, u biološku se kontrolu ubraja i primjena prirodnih proizvoda koji su ekstrahirani ili fermentirani iz različitih živih organizama. Ti proizvodi mogu biti vrlo jednostavne smjese prirodnih sastojaka ili složene smjese koje imaju višestruke učinke na domaćina kao i na određene štetočine i patogene. Nazivaju se još i biopesticidima i biofertilizatorima (Pal i Gardener, 2006.).

Biljke i patogeni su tijekom cijelog svog životnog ciklusa u interakciji sa velikim brojem organizama, a te interakcije uvelike utječu na zdravlje biljaka. Biološka se kontrola može smatrati rezultatom koji proizlazi iz različitih specifičnih i nespecifičnih interakcija živih organizama i njihovih produkata. Mnogi mikroorganizmi izlučuju sekundarne metabolite koji mogu ometati rast ili aktivnost patogena. Neke vrste mikroorganizama su sposobne proizvoditi i oslobađati različite litičke enzime, a ti enzimi hidroliziraju različite vrste polimernih spojeva kao što su hitin, proteini, celuloza, hemiceluloza i DNA. Izlučivanje tih enzima može rezultirati supresivnom aktivnosti patogena biljaka. Za neizravno suzbijanje bolesti pridonose neki proizvodi enzimske aktivnosti. U njih ubrajamo oligosaharide koji su nastali iz staničnih stjenki gljiva, te su poznati kao jaki indikatori za obranu biljke domaćina. (Pal i Gardener, 2006.). U Republici Hrvatskoj postoje pripravci koji u sebi sadrže antagonističku gljivicu *Trichoderma*. Pomoću te gljivice suzbija se siva plijesan na grožđu i jagodama, kao i različiti štetnici na povrtlarskim i ratarskim kulturama. Neki od pripravaka *Trichoderme* vrlo su važni u mikrobiološkom suzbijanju parazita zbog toga što sadrže svojstva hiperparazita antagonista, proizvođača antibiotika i enzima kojima razgrađuju hitin i glukone. Mikrobiološka je sredstva važno koristiti odvojeno od ostalih kemijski pripravaka (Šubić, 2017.).

U istraživanju koje je provedeno 2012. godine sa korova koji rastu na poljoprivrednim tlima, izolirane su *Fusarium* vrste (Poštić i sur., 2012), a nakon toga odabrano je 30 *Fusarium* izolata za pšenicu i ispitana je njihova patogenost (Ilić i sur., 2012.). Tim je istraživanjem utvrđeno da jedan dio izolata pozitivno djeluje na zrna

pšenice, te su zbog toga ti izolati korišteni u daljnjim istraživanjima. Primijenjeni su na višnji uzgojenoj iz kulture tkiva na kojoj su pokazali pozitivni utjecaj na rast i razvoj višnje (Ilić i sur., 2017.). Daljnji tijek istraživanja je bio ispitivanje antifungalnog djelovanja tih *Fusarium* vrsta te je za ovo istraživanje odabarna vrsta *F. solani* korištena u prethodnim istraživanjima. Stoga je cilj je ovog istraživanja bio utvrditi kako endofitna vrsta *Fusarium solani* djeluje na fitopatogenu gljivicu *Fusarium culmorum*.

1.1. *Fusarium*

Rod *Fusarium* obuhvaća široku i heterogenu skupinu gljiva važnih u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, medicini i poljoprivredi. Ovaj rod gljiva je prisutan svuda i dijeli se na saprofite, endofite i patogene, kako biljaka, tako životinja i ljudi. Generalno, pripadaju patogenima velikog broja biljaka, a neke *Fusarium* vrste mogu proizvoditi sekundarne metabolite koji uključuju mikotoksine (Izzati i sur., 2011)

Fusarium vrste proizvode vrlo važnu skupinu mikotoksina, a to su trihoteceni, fumonizini i zearalenoni. Mikotoksini su podskupina od mnogo veće skupine spojeva, koji se nazivaju sekundarni metaboliti, a oni nisu neophodni za rast gljivica, barem kako je utvrđeno u laboratorijskim uvjetima (Leslie i Summerell, 2011.).

Fusarium je rod gljiva koji sadrži puno agronomski važnih patogena, proizvođača mikotoksina i patogena ljudi. Usporedne analize su pokazale da je rod *Fusarium* raspoređen u regijama koje su odgovorne za primarni metabolizam i re-proizvodnju i virulentnost patogena, te eventualno za druge funkcije (adaptabilni genom). Kao fitopatogen *Fusarium* obuhvaća širok raspon strategija infekcije. Većina se može općenito klasificirati kao hemibiotrofi, jer infekcija u početku nalikuje na infekciju biotrofnih patogena koji se hrani na živom tkivu, ali s vremenom prelazi na ubijanje i konzumiranje stanica domaćina te postaje nekrofit. Ovaj rod je obuhvaćen sa nekoliko načina preživljavanja, među kojima je njegov brz kapacitet za promjenu, kako morfološku tako i fiziološku, kada je suočen sa promjenama u okolišu. Postoje patogeni i nepatogeni oblici. Posljednji mogu kolonizirati korteks korijena biljaka bez ikakvih simptoma bolesti te preživljavati u živom tkivu, kao i pokazati antagonizam prema patogenim oblicima u tlu. Fitopatogene vrste uzrokuju veliki broj bolesti kao što su trulež korijena, venuće provodnih tkiva, žućenje i lisna nekroza. (Ma i sur., 2013.).

1.1.1. *Fusarium solani*

Fusarium solani je fitopatogena gljivica i važan je uzročnik nekoliko bolesti usjeva. Pripada saprofitnim gljivama, a to znači da može kolonizirati mrtvo ili živo tkivo biljke. Gljiva ulazi u biljku kroz nodije na stabljici ili uz liniju površine tla, gdje iskorištava priliku napasti biljku na oštećenjima stabljike. Također, spore biljaka će klijati tijekom duljeg razdoblja, visoke temperature i vlažnosti. Domaćini koje najčešće napada *F. solani* su krumpir, grašak, grah, te porodicu tikvica kao što su dinje, krastavci i bundeve, a neki sojevi mogu izazvati zarazu i kod ljudi (Leslie i Summerel, 2008.).

Na PDA podlozi *F. solani* proizvodi dobro razvijen bijeli micelij. *F. solani* proizvodi nespolne mikrokonidije i makrokonidije. Kolonije ove gljive brzo rastu, promjenjive su boje, često su granulirane ili paučinaste, crveno-rozne boje ili boje lavande, ali mogu biti i bijele (Luginbuhl, 2010.).



Slika 1. *Fusarium solani* (original)

Ova se gljiva pri identifikaciji često zamijeni s *F. oxysporum*. Mikrokonidije *F. solani* su ovalnog oblika, imaju manje stjenke, te su malo šire u odnosu na makrokonidije. Micelij koji se nalazi na PDA podlozi je dobro razvijen, u početku je bijele boje, a s

vremenom postaje žućkast i crvenkast (slika 1). Makrokonidije gljive su krupne te su blago srpastog oblika, najčešće s pet septi, a broj septi varira od pet do sedam (slika 2). Te konidije nastaju u velikom broju, a veličina makrokonidija sa pet septi je $48,0-0,62 \times 4,5-6,2 \mu\text{m}$. Monofijalide koje se formiraju na mikrokonidijama mogu biti jednostanične, ovalne ili izdužene, sa jednom ili dvije septe, ali njih ne mogu formirati svi izolati. Jednostanične mikrokonidije veličine su $7,3-12,36 \times 3,4-4,5 \mu\text{m}$, a sa jednom septom $10,9-18,1 \times 3,6-4,8 \mu\text{m}$.

Hlamidospore formira brzo i u velikom broju na CLA podlozi (podloga sa karanfilom). Veličina hlamidospora se kreće od 9,3 do $12,2 \mu\text{m}$.



Slika 2. Makrokonidije *F. solani* (Poštić, 2012.)

1.1.2. *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum pripada skupini *Discolor*, a članovi ove skupine često se odnose na fuzarioze žitarica. Fuzarioze žitarica najčešće ne formiraju mikrokonidije, osim pod određenim uvjetima, i uglavnom se determiniraju na temelju morfologije makrokonidija. Ova patogena gljiva je najdominantnija u sjevernoj, srednjoj i istočnoj Europi.

Za razliku od *F. graminearum*, *F. culmorum* proizvodi askospore (telomorf). Proizvodi aseksualne spore (konidije) koje su glavni način širenja. Konidije se šire pomoću vjetra ili kišnih kapljica sve do glava pšenice. Konidija inficira klas pšenice uglavnom tijekom kratkog perioda visoke osjetljivosti tijekom anteze. Uspjeh infekcije ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući klimu, otpornost kultivara i gnojdbu dušikom.

F. culmorum proizvodi kratke, debele makrokonidije koje imaju gusto zbijene zidove, te ima zakrivljenu ventralnu i dorzalnu stranu. Hlamidiospore se općenito oblikuju u velikim količinama i vrlo brzo, ali se mogu pojaviti i pojedinačno u lancima ili skupinama. Na krompir dekstroznom agaru ova gljiva ubrzano raste i stvara gusti micelij. Micelij je obično bijele boje, ali može biti žuti ili tamno-žuti, a donja strana je crvene boje. (Wagacha i sur., 2007.).

Fusarium culmorum je gljiva koja je u stanju izazvati trulež korijena i donjeg dijela stabljike, te fuzarijsku palež klasa na različitim žitaricama malog zrna, a posebice na pšenici i ječmu. To uzrokuje značajne gubitke kvalitete i prinosa i rezultira zagađenost žitarica mikotoksinima (Scherin i sur., 2013).



Slika 3. *Fusarium culmorum* (original)

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Uzgoj endofitnih i patogenih gljivica

Endofitna gljivica *Fusarium solani*, izolat broj 149 i patogena gljivica *Fusarium culmorum* su uzgojene na hranjivim podlogama u laboratoriju. Hranjiva podloga je krumpir dekstrozni agar (potato dextrose agar – PDA). Vrlo mali komadić micelija gljivice se sa sterilnom iglom stavi na sredinu PDA podloge u Petrijevoj zdjelici veličine 9 cm te uzgaja u komori 7 dana. U komori za rast temperatura je 22 °C, vlaga 80% , a svjetlosni režim 12 sati dan, 12 sati noć.

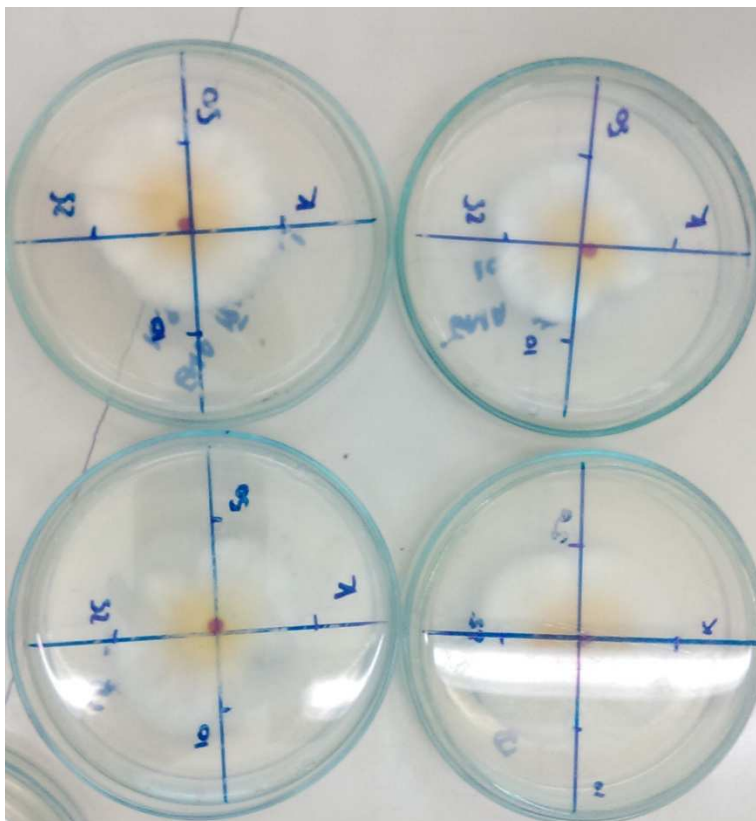
2.2. Priprema ekstrakta endofitnih gljivica

U svaku Petrijevu posudu s endofitnom gljivicom *F. solani* se doda 20 ml 100% metanola, te se posude oblijepe parafilomom. Ostave se da stoje 24 sata u digestoru jer je metanol otrovan. Nakon toga se metanol izlije u male laboratorijske čaše koje se ostave otvorene u digestoru kako bi metanol u potpunosti ispario. Kada metanol ispari, na dnu ostane vrlo tanak sloj suhog taloga kojem se doda destilirana voda.

2.3. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja ekstrakta endofitnih gljivica

2.3.1. Primjena metode otvora u PDA podlozi

U PDA podlozi se naprave četiri okrugla otvora veličine 6 mm sa sterilnim bušačem te se dno otvora zalije s malo podloge kako tekućina ne bi otišla pod podlogu. U svaku rupu se naspe odgovarajuća količina ekstrakta, a u sredinu se nacijepi patogena gljivica. Porast gljivice se mjeri 3., 5. i 7. dan nakon naciepljivanja.



Slika 4. Metoda otvora u PDA podlozi (original)

2.4. Metoda inokulacije sjemena

Na PDA podlozi 7 dana uzgaja se *F. solani*. Nakon 7 dana režu se kružni isječki (6 mm) koji se moraju nacijepiti u tekuću podlogu. Kao tekuća podloga koristi se PDB (Potato Dextrose Broth) i stavlja se količina od 250 ml podloge u četiri Erlenmayer tikvice od 500ml. Podlogu je potrebno držati 7 dana na horizontalnoj treskalici kako bi se spriječilo razvijanje neželjenih organizama i kako bi se omogućila aeracija uzorka (slika 5.). Suspenziju je nakon 7 dana potrebno procijediti kroz sterilan filter papir, a za antifugalno ispitivanje koristi se tekući dio.



Slika 5. Horizontalna treskalica s tekućom podlogom (original)

U dobivenoj suspenziji potrebno je 2 sata natapati sterilna zrna pšenice, te se nakon toga stavljaju na vlažan filter papir u Petrijeve zdjelice. Nakon 3 dana zrna je potrebno natapati sat vremena u suspenziji *F. culmorum*. Ova se suspenzija dobije tako da se *F. culmorum* uzgaja na PDA podlozi 7 dana, te se nakon toga micelij sastruže i samelje sa 40 ml vode. Nakon toga zrna se stavljaju na vlažan filter papir u Petrijeve zdjelice promjera 150 mm, a nakon 7 dana se mjeri dužina klica i simptomi bolesti.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon mjerenja porasta micelija fitopatogene gljivice *F. culmorum* utvrđeni su sljedeći rezultati.

Tablica 1. Mjerenje porasta micelija *F. culmorum* pri primjeni metode otvora u PDA podlozi

Dan mjerenja	Količina ekstrakta (ml)			
	10	25	50	K
3.	0,2 cm	0,2 cm	0,4 cm	0,6 cm
	0,4 cm	0,1 cm	0,2 cm	0,4 cm
	-	-	0,1 cm	0,2 cm
5.	0,2 cm	-	0,3 cm	0,1 cm
	0,2 cm	-	0,2 cm	-
	-	-	-	-
7.	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
Prosjek	0,25 cm	0,15 cm	0,24 cm	0,325 cm

U tablici 1 možemo primijetiti antifungalni utjecaj endofitnih gljivica na porast micelija *F. culmorum* pri mjerenju 3. dan, a nešto manji utjecaj pri mjerenju 5. dan. Sedmi dan mjerenja nije zabilježena zona inhibicije, odnosno *F. culmorum* je prerastao endofitnu gljivicu. Na osnovu toga možemo zaključiti da postoji određeni antifungalni utjecaj, ali se on gubi nakon nekog vremena. Bilo bi dobro da se endofit razvija neko vrijeme prije primjene kao antifungalni agens kako bi mogao bolje djelovati.

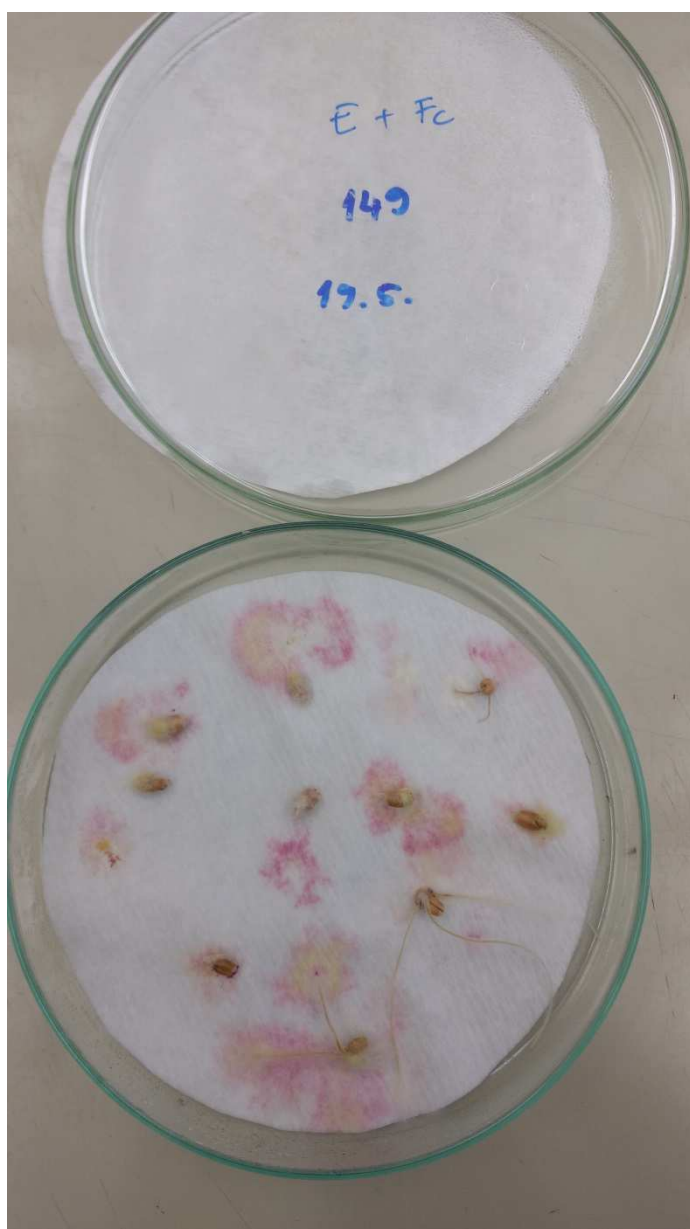
Tablica 2. Ispitivanje utjecaja gljivice *F. solani* na klijavost pšenice zaražene s *F. culmorum* (analiza varijance)

	Tretmani			
Ponavljjanja	1.	2.	3.	4.
1	7	0.3	3	4
2	5	2	0.3	3.7

3	3.2	0.5	0.5	5.1
4	4.2	1	-	2.2
5	3.1	2	-	2.8
6	5.3	0.2	-	5.3
7	6.10	0.8	-	3.9
8	6.8	1.2	-	6.10
9	2.9	-	-	3.4
10	2.8	-	-	3.1
x	4.64	0.8	0.38	3.96
I-smjerna analiza varijance				
Izvor varij.	St. slob.	Suma kvadrata	Sred. kvadrata	F
Tretmani	3	140.8350	46.9450	33.67648**
Greška	36	50.1840	1.3940	
Ukupno	39	191.0190		
Prosjek pokusa: 2.4450		St. gr. prosjeka: 0.3734		
LSD 0.05 SIG: 1.0349		LSD 0.01 SIG: 1.3601		
Za upoređivanje sredina tretmana $T=(x_1-x_2)/0.528$				

1. Tretman – samo endofit,
2. Tretman – endofit i *F. culmorum*,
3. Tretman – *F. culmorum*,
4. Tretman - netretirano zrno pšenice

Iz tablice analize varijance uočljivo je da ne postoji statistički značajna razlika između klijanaca tretiranih sa endofitom i *F. culmorum* i klijanaca tretiranih samo s *F. culmorum*. Iako je vidljivo da zrna tretirana sa endofitom daju dužu klicu, ta vrijednost u odnosu na zrna pšenice tretirana samo s endofitom i netretirana zrna pšenice nije značajna. Stoga možemo zaključiti da endofit *F. solani* pospješuje klijavost zrna pšenice, ali da ona u ovom pokusu nije bila statistički značajna.



Slika 6. Zaraza sa *F. culmorum* i inokulacija endofitom (original)

Antifungalni učinak endofitnih gljivica do sad je istraživao velik broj autora. Malhadas i suradnici (2017.) su utvrdili antimikrobno djelovanje endofitnih gljivica izoliranih iz listova masline na porast patogenih bakterija i gljivica. Kumar i Kaushik (2013.) su izolirali endofitne gljivice iz biljke *Jatropha curcas* L. u Indiji, među njima i *Fusarium oxysporum*. *Jatropha curcas* L. je višegodišnja biljka uzgojena u tropima i

subtropima koja je poznata po svom potencijalu kao biogorivo. To je biljka koja preživljava pod različitim uvjetima okoliša, ona je tolerantna na stres, na nametnike i bolesti. Istražena je zbog svojih endofitnih gljiva za upotrebu u zaštiti usjeva. Endofitne su gljive izolirane iz listova *Jatropha curcas* L. te je utvrđeno antifungalno djelovanje ekstrakta tih gljivica protiv patogenih gljivica roda *Sclerotinia* i *Fusarium*.

Taechowisan i sur. (2005.) izolirali su sa tkiva korijena *Zingiber officinale* endofitnu gljivu *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130, antagonist gljive *Fusarium oxysporum* i *Colletotrichum musae* koji su uzročnici antraknoze banane i žita pšenice. Ova su dva patogena (*Fusarium oxysporum* i *Colletotrichum musae*) korištena za provjeravanje antifungalne aktivnosti. Rezultati dvostrukih kultura su pokazali da je *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 inhibirao rast *F. oxysporum* i *C. musae*.

Obledo i sur. (2003.) su izolirali nepatogenu gljivu *Fusarium oxysporum* iz polja sa *Agave vitoria reginae* Moore. Uzorak koji su uzeli bio je korišten za umjetnu infekciju mikro propagiranih biljaka *Agave vitoria reginae* u stakleniku. Biljke koje su inokulirane na kraju su imale 225% veći korijen, za 50% se povećao broj postranih korjenčića i za 50% se povećao broj stomata. Također, povećao se sadržaj klorofila i šećera za 14% i 172%. Rezultati koje su dobili upućuju na to da biljke koje su inokulirane gljivicom imaju veću fotosintetsku učinkovitost u usporedbi sa neinokuliranim biljkama te su samim tim otpornije na bolesti.

Kao što je već navedeno, ovo je istraživanje potaknuto prijašnjim istraživanjem koje je provedeno 2012. godine, gdje su sa korova koji rastu na poljoprivrednim tlima izolirane *Fusarium* vrste. Neki od izolata koji su izolirani, pokazali su pozitivno djelovanje na zrna pšenice (Poštić i sur., 2012.). Nakon toga Ilić i sur. (2017.) proveli su drugo istraživanje u kojem su izdvojili pet *Fusarium* izolata, te je cilj bio odrediti utjecaj tih izolata na parametrima rasta trešnje uzgojene iz kulture tkiva. Nakon dobivenih rezultata, utvrđeno je da je većina parametara veća nakon tretiranja endofitom. Provedena su dva tretmana, u prvom je tretmanu provedena inokulacija podloge, a u drugom inokulacija podloge i biljke. Također, u tom je istraživanju najveći pozitivan utjecaj na razvoj trešnje pokazao izolat *Fusarium solani* 149, korišten i u ovom istraživanju, a kemijska analiza pokazala je da taj izolat ima visoku proizvodnju intergracida.

Na kraju možemo zaključiti da treba dodatno ispitati antifungalni utjecaj endofitne gljivice *F. solani* korištene u ovom istraživanju. Iako tijekom ovog istraživanja nismo

dokazali fungistatično djelovanje endofitnih gljivica i njihovih metabolita, smatram da treba nastaviti ispitivanje djelovanja ovih gljiva jer pokazuju određeni utjecaj na porast patogenog micelija. U prirodi endofitne gljive se već nalaze neko vrijeme u biljci prije nego što dođe do zaraze s patogenom te je možda potrebno da se endofit razvija dulje vrijeme unutar biljke kako bi mogao imati antifungalno djelovanje.

Nema sumnje da će *Fusarium*, globalno ostati jedan od najvažnijih rodova gljiva. Toksini koje ispušta, bolesti koje prouzrokuje, te sekundarne metaboliti koje proizvodi, imaju veliki značaj kako u poljoprivrednoj, tako i u farmaceutskoj industriji. Korištenje antagonističkih mikroorganizama kao što su endofitne *Fusarium* vrste idealna je metoda kontrole biljnih bolesti.

4. ZAKLJUČAK

Nakon ispitivanja u prvom pokusu utvrdili smo da ekstrakt gljivice *F. solani* ne pokazuje fungistatično djelovanje na porast gljivice *F. culmorum*. Razlozi za to mogu biti razni. Kada se endofitna gljivica nalazi u biljci ona kontinuirano izlučuje sekundarne metabolite te na taj način može kroz duži vremenski period djelovati na fitopatogene gljivice. U ovom istraživanju primijenjene su metode u kojima sekundarni metaboliti gljivica nakon prvobitne aplikacije vjerojatno gube učinak.

Drugi pokus u kojem smo provodili metodu inokulacije sjemena je dao određene pozitivne rezultate koji su bili vizualno uočljivi, ali se nakon mjerenja nisu pokazali kao statistički značajni. Mjerili smo isključala zrna i duljinu klice, te smo utvrdili da zrna inokulirana endofitom, a zaražena sa *F. culmorum* bolje klija nego zrna zaražena samo sa *F. culmorum*. Iz toga možemo zaključiti da postoji određen pozitivan utjecaj endofita na klijanje zrna iako se nije pokazao kao statistički značajan.

5. LITERATURA

1. Bary, A. (1866): Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten. W. Engelmann.
2. Carris, L. M., Little, C., Stiles, C. (2012.): Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor.
3. Freeman, E.M. (1904.): The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character, 196: 1-27.
4. Guérin, P. (1898.): Sur la présence d'un champignon dans l'ivraie. J Bot, 12: 230-238.
5. Izzati, M.Z.N.A., Azmi, A.R., Nordahliawate, M.S.S., Norazlina, J. (2011.): Contribution to the knowledge of diversity of fusarium associated with maize in Malaysia. Plant Protect Sci, 47 (1): 20-4.
6. Kumar, S., Kaushik, N. (2013.): Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. PloS one, 8(2): e56202.
7. Kusari, S., Hertweck, C., Spiteller, M. (2012.): Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. Chemistry & biology, 19(7): 792-798.
8. Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2008.): The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley & Sons.
9. https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm (preuzeto 18.02.2017.)
10. Ma, L.J., Geiser, D.M., Proctor, R.H., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Trail, F., Kazan, K. (2013.): *Fusarium* pathogenomics. Annual review of microbiology, 67: 399-416.
11. Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J.A., de Pinho, P.G., Baptista, P. (2017.): Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(3): 46.
12. Obledo, E.N., Barragán-Barragán, L.B., Gutiérrez-González, P., Ramírez-Hernández, B. C., Ramírez, J.J., Rodríguez-Garay, B. (2003.): Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. Plant cell, tissue and organ culture, 74(3): 237-241.

13. Pal, K.K., Gardener, B.M. (2006.): Biological control of plant pathogens. The plant health instructor, 2, 1117-1142.
14. Pusztahelyi, T., Holb, I.J., Pócsi, I. (2015.): Secondary metabolites in fungus-plant interactions. Frontiers in plant science, 6: 573.
15. Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E. (2000.): Glomalean fungi from the Ordovician. Science, 289(5486): 1920-1921.
16. Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., Migheli, Q. (2013.): *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Molecular Plant Pathology, 14(4): 323-341.
17. Summerell, B.A., Leslie, J.F. (2011.): Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough?. Fungal Diversity, 50(1): 135.
18. Šubić, M. (2017.): Biološka zaštita bilja uz pomoć korisnih mikroorganizama. Gospodarski glasnik. 6: 43-44.
19. Tan, R.X., Zou, W.X. (2001.): Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural product reports, 18(4): 448-459
20. Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y., Lumyong, S. (2005.): Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. Microbiology, 151(5): 1691-1695.
21. 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(7): 877-885.

6. POPIS SLIKA

Slika 1.	<i>Fusarium solani</i>	5
Slika 2.	Makrokonidije <i>Fusarium solani</i>	6
Slika 3.	<i>Fusarium culmorum</i>	7
Slika 4.	Metoda otvora u PDA podlozi.....	9
Slika 5.	Horizontalna treskalica s tekućom podlogom.....	10
Slika 6.	Zaraza sa <i>F. culmorum</i> i inokulacija endofita.....	13

7. POPIS TABLICA

Tablica 1.	Mjerenje porasta micelija <i>F. culmorum</i> pri primjeni metode otvora u PDA podlozi.....	11
Tablica 2.	Ispitivanje utjecaja gljivice <i>F. solani</i> na klijavost pšenice zaražene s <i>F. culmorum</i> (analiza varijance).....	11