Benefitni mikroorganizmi kao alternativa kemijskim fungicidima

Cvjetković, Milan

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:101257

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Milan Cvjetković

Diplomski studij: Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer: Vinogradarstvo i vinarsvo

BENEFITNI MIKROORGANIZMI KAO ALTERNATIVA KEMIJSKIM FUNGICIDIMA

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Milan Cvjetković

Diplomski studij: Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer: Vinogradarstvo i vinarsto

BENEFITNI MIKROORGANIZMI KAO ALTERNATIVA KEMIJKIM FUNGICIDIMA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv.prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. Uvod 1
2. Mogućnosti primjene biofungicida 3
3. Mehanizmi djelovanja biofungicida 5
4. Podjela biofungicida i njihova uporaba 8
5. Problemi u proizvodnji i primjeni biofungicida 20
6. Prednosti i nedostatci biofungicida 21
7. Zaključak 22
8. Popis literature: 23
9. Sažetak 26
10. Summary 27
11. Popis slika 28
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
BASIC DOCUMENTATION CARD

1. Uvod

U cilju zaštite bilja, te u konačnici zbog unaprijeđenja proizvodnje čovjek danas upotrebljava širok spektar različitih pesticida. Primjena mnogih od njih je diskutabilna sa toksikološkog gledišta.

Posljednjih desetljeća, u javnosti, pa i u stručnim krugovima, raste zabrinutost, kako zbog smanjenja efikasnosti pesticida uslijed razvoja rezistentnosti štetnih organizama, tako i zbog novih saznanja o riziku njihove primjene po zdravlje ljudi, zagađivanje proizvoda i nepovoljnim efektima na životnu sredinu u cjelini (Warrior, 2000.).

Međuprodukti degradacije često su perzistentniji od polaznog spoja, ostaju duže vrijeme u tlu ili vodi (podzemne vode), što može ostaviti posljedice i za naredne biljke u plodoredu (Đorđević, 2008.).

Današnji trendovi u fitomedicini nalažu upotrebu ekološki prihvatljivih metoda zaštite bilja koje se postižu smanjenjem upotrebe standardnih kemijskih sredstava u zaštiti bilja, te primjenom preventivnih mjera zaštite i najnovijih metoda bioloških mjera (Baličević i sur., 2007.).

Stvaranje nepovoljnih uvijeta za razvoj bolesti primjenom agrotehničkih mjera, primjena bioloških produkata i antagonostičkih organizama, superparazita, ili predatora, uvodjenje kompetitorskih vrsta pojedinačno, ili integrirano sa manje rizičnim pesticidima, su tehnologije zaštite kojima se danas teži (Klokočar-Šmit i sur., 2006; Grgić, 2009.).

Upotrebom korisnih mikroorganizama oslanja se na njihove produkte metabolizma u što se ubrajaju spore, kristali, toksini i antibiotici. Spomenuti posjeduju antagonističko djelovanje na pojedine uzročnike bolesti poput korova, štetnih nematoda i kukaca. Produkti korisnih mikroorganizama poput npr. enzima i vitamina mogu imati pozitivan utjecaj na povećanje otpornsti tretiranih biljaka. Valja napomenuti da su bezopasni za ljude i korisne mikroorganizme te da su ekološki prihvatljivi.

Podjela biopesticida izvršena je prema vrsti organizama koje suzbijaju, i to na: bioinsekticide, biofungicide, bioherbicide i druge. Svjetski priručnici o biopesticidima u njih najčešće uključuju makrobiološke agense i mikrobiološke agense, zatim prirodne pesticide i derivate nekih organizama. U Hrvatskoj je ta podjela također prihvaćena (Igrc-Barčić i Maceljski, 2001.).

2. Mogućnosti primjene biofungicida

Da bi se proizveo učinkovit biološki preparat potrebno je dobro poznavanje međusobnog odnosa između mikroorganizma i objekta suzbijanja. Prema Klokočar-Šmit i sur. (2006.), da bi se dobio učinkovit preparat potrebna je:

- mogućnost proizvodnje na tekućem ili polučvrstom supstratu u dovoljnim količinama
- vitalnost tijekom čuvanja i nakon primjene preparata
- da pod selekcijskim tlakom u laboratorijskim uvijetima ne izgube vitalnost, varijabilnost i selektivnost.

Veći dio formulacije biopreparata čine hranjive i vezivne tvari, nosači ili štikeri koje se nalaze u obliku prašiva, vodotopivih granula, mikrokapsula, gela, itd.

Biofungicidi su pripravci na osnovi mikro-gljivica, bakterija i *Actinomyceta* koje su anatagonisti fitopatogenih gljivica. Ti antagonistički organizmi nisu genetički modificirani od strane čovjeka. Radi se o korisnim organizmima koji su u prirodi sastavni dio mikro svijeta (microbiota), rizosfere i filosfere gdje se za stanište i hranjive tvari nadmeću s mikroorganizmima štetnim za biljke (Topolovec-Pintarić i Cvjetković, 2003.).

Prema Maceljskom sur. (2004.), u Hrvatskoj i svijetu se najviše koriste biopesticidni pripravci na bazi bakterije *Bacillus thuringiensis*. Navedena bakterija proizvodi kristale koji sadrže proteine koji su toksični za kukce.

B. thuringiensis producira toksin delta-endotoksin koji kada dođe u probavne organe kukca priječi njegovu ishranu. Ima sporo djelovanje, dan dva nakon primjene prestaju ishrana i štete, a smrt nastupa nakon 3-5 dana (Igrc-Barčić i Maceljski, 2001.).

Pripravci koji sadrže gljivicu *Verticillium lecanii* koriste se za suzbijanje lisnih i štitastih uši te štitastog moljca u zaštićenom prostoru, dok se pripravci na osnovi gljivice *Beauveria*

bassiana koriste u suzbijanju krumpirove zlatice, kukuruznog moljca, cvjetnog štitastog moljca (Igrc-Barčić i Maceljski, 2001.).

Pripravci na osnovi bakterije *Bacillus thuringiensis kurstaki* koriste se za suzbijanje gusjenica leptira, a podvrsta *Bacillus thuringiensis tenebrionis* za suzbijanje ličinki kornjaša (Maceljski i sur., 2004.).

U Hrvatskoj je registriran samo jedan biofungicid i to na bazi *Trichoderma harzianum* koji je sadržan u pripravku Trichodex WP. On djeluje preventivno na gljivicu *Botrytis cinerea* na raznim kulturama. Registriran je za suzbijanje *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi i jagodama. Karenca je 14 dana na vinovoj lozi, 4 dana na jagodama. Ne ubraja se u otrove. (Maceljski, 2005., Lučić, 2009) .

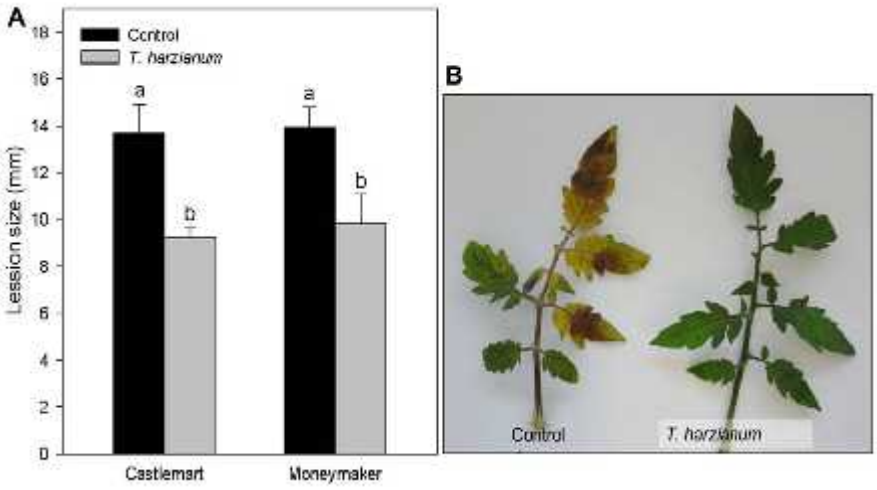
3. Mehanizmi djelovanja biofungicida

Po navodima Topolovec-Pintarić i Cvjetković (2003.), razlikuje se nekoliko mehanizama djelovanja biofungicida:

- Inducirana otpornost biljke domaćina;
- antibioza;
- direktna kompeticija;
- parazitizam.

Inducirana otpornost se javlja kada se u napadnutoj biljci aktivira obrambeni mehanizam pa se ona sama brani od napada uzročnika bolesti (Grahovac i sur., 2009.). Ona npr. Štiti biljku od svih sojeva ali istog virusa, ali ne i od drugih virusa.

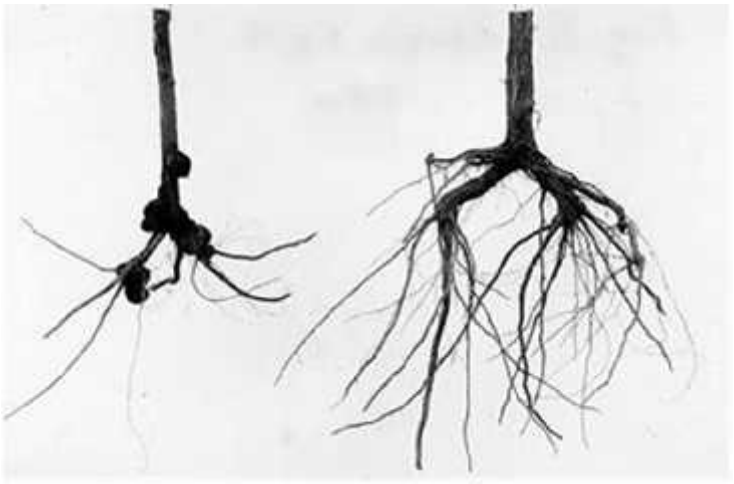
Kod biljaka domaćina se namjerno upotrebljava inolukacija upravo zbog izazivanja inducirane otpornosti. Kao primjer mogu se uzeti dvije zaražene stabljike različitih kultivara rajčice sa *Botrytis cinerea*. Dok je desni kultivar inokuliran sa Trichoderma harzianum, lijevi nije te su uočljivi simptomi (slika 1.).



Slika 1. Zaraženi i inokulirani kultivar rajčice

Izvor: http://www.frontiersin.org/files/Articles/50111/fpls-04-00206-HTML/image_m/fpls-04-00206-g001.jpg

Antibioza je sposobnost inhibicije ili "uništavanja" biljnih parazita toksičnim produktima metabolizma antagonističkih organizama (biološki agensi - BA). Toksični produkti BA su najčešće antibiotici (Grahovac i sur., 2009.). *Agrobacterium radiobacter* – izolat K 84 zaustavlja rast tumora kojem je uzročnik *Agrobacterium tumefaciens.*



Slika 2. Zaraženi i i inokulirani korijen šljive

Izvor: http://www.accessscience.com/loadBinary.aspx?filename=529200FG0030.gif

Direktna kompeticija podrazumijeva da se korijen biljke domaćina (rizosfera) mora naseliti organizmom koji se primjenjuje za biološko suzbijanje uzročnika bolesti prije nego što dođe do infekcije patogenom (Grahovac i sur., 2009.).



Slika 3. *Gaeumannomyces graminis trittici*

Izvor: http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/pub811/14cereal.htm

Kompeticija je natjecanje antagonističkih organizama sa biljnim parazitima oko izvora hraniva, kisika te samog prostora. *Gaeumannomyces graminis* ovisi o žetvenim ostacima čijom razgradnjom propada i sam fakultativni parazit.

Parazitizam je sposobnost organizma koji se primjenjuje za biološku kontrolu da napada patogeni organizam i njime se hrani, pri čemu biološki agens mora biti prisutan prije napada patogena (Grahovac i sur., 2009.). Primjerice, izolat *Trichoderma harzianum* inhibira rast gljive *Rizoctonia solani* penetracijom kroz njezin stanični zid što dovodi do dezintegracije hifa potonje (slika 4.). U ovom slučaju se radi o mikoparazitizmu.

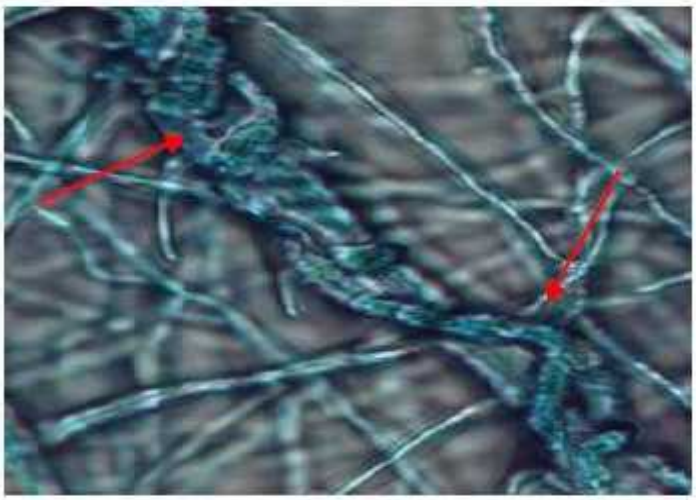


Figure 2. Micrograph of light microscope showing coiling of *T. harzianum* over *R. solani* Arrows point to interaction zones between *T harzianum* and *R. solani*.

Slika 4. Parzitski odnos izmedju *T. harzianum i R. solani*

Izvor: http://www.scielo.org.mx/img/revistas/tsa/v13n1/a13f2.jpg

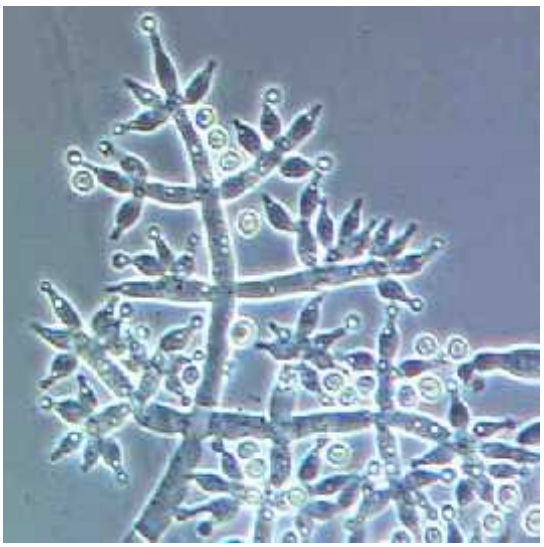
4. Podjela biofungicida i njihova uporaba

Biofungicidi na bazi gljiva

Trichoderma sp. su gljive koje se mogu pronaći u većini obradivih tala. Posjeduju izražen mikoparazitizam te antibiozu. Mikoparazitski proces je zasnovan na direktnom kontaktu micelija antagonista i patogena, a nakon toga sekreti enzima obavljaju degradaciju staničnog zida domaćina (Kubicek et al., 2001.).

Vrste roda *Trichoderma* imaju sposobnost lučenja snažnog hidrolitičkog multi-enzimskog kompleksa koji sačinjavaju: hitinaze (de la Cruz et al., 1992.), β-1,3-glukonaze (Noronha and Ulhoa, 1996.), β-1,6-glukonaze (de la Cruz and Llobell, 1999.), α-1,3 glukonaze (Ait-Lahsen et al., 2001.), proteaze (Geremia et al., 1993.) i celulaze (Monte and Llobell, 2003.).

Trichodermi harzianum (slika 5.) je svojstveno da utječe na pojačan porast biljaka što se moglo uočiti na osnovu pokusa u plastenicima. Prema navodima (Chet i sur., 2006.) ustanovljeno je povećanje porasta klijanja za 30% i korijenovog sustava tih biljaka za 95%.



Slika 5. *Trichoderma harzianum*

Izvor: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Trichoderma_harzianum.jpg

Preparat Trichodex WP na bazi *Trichoderma harzianum* registriran je u Hrvatskoj. Prvo tretiranje preparatom se obavlja u vrijeme cvatnje vinove loze i to u koncentraciji od 0,3-0,4 %. Potrebno je 3-4 kg/ha u 1000 l vode (300-400 g/100 l vode). Po sezoni je potrebno obaviti do četiri tretiranja. Karenca za grožđe iznosi 14 dana. Navedeno se odnosi za suzbijanje *Botrytis cinerea*.

Kako navodi Lučić (2009.), *Trichoderma harzianum* je kontaktni antibiotski fungicid niske toksičnosti za čovjeka, korisne kukce i životnu sredinu, prikladan za ekološku zaštitu u vinogradima, voćnjacima, povrtnjacima, ratarstvu i uzgoju ukrasnog bilja.

U Hrvatskoj je registriran za suzbijanje gljive *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi i jagodama (Maceljski, 2005; Lučić, 2009.).



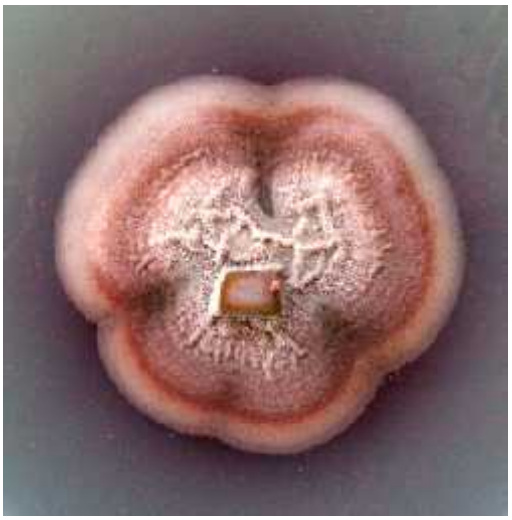
Slika 6. Preparat Trichodex
Izvor: http://www.agribio.it/trichodex

Thomas (2004.) navodi da se preparat pod nazivom Plantshield na bazi *T. harzianum* (izolat T-22) u Virdžiniji upotrebljava za suzbijanje *Fusarium spp., Sclerotinia spp., Rhizoctonia solani i Pythium spp*. u rasadnicima drvenastih biljaka, na ukrasnim biljkama, pri kalemljenju, kupusnjačama, rajčici i krastavcima.

Trichoderma viride spada u grupu bioloških fungicida. Kako naseljava korijenov sustav gljiva inducira lokalnu i sistemičnu otpornst biljke na napad patogena (*Fusarium spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Armilaria spp.*). Miceliji te gljive stvaraju različit spektar enzima uključujući celulaze i hitinaze koji razgrađuju celulozu i hitin. U slučaju tretiranja sjemena gljiva ga kolonizira te vrši napad na patogena, ali i ujedno stvara zaštitu od spomenutih. Svojim razvojem na biljci ona omogućuje dotičnoj i povećanje korijenove apsorpcije hraniva te na taj način uvjetuje bolji razvoj korijena što na kraju dovodi i do veće proizvodnje.

U vinogradarstvu se preparat na bazi *T. viride* (Vital Tricho) rabi folijarno i to kad je 70 % biljaka u fazi pupanja, a nakon toga se tretira svakih 7-10 dana. Potrebno je napraviti minimalno tri tretmana u koncentraciji 0,5 %, dakle po 1 ha potrebno je 1,2 kg/250 l vode.

Gliocladium ssp. spadaju u bitnije biopreparate koji obuhvaćaju široko područje djelovanja te pokazaju određenu efikasnost pri suzbijanju velikog broja patogena. *G.roseum* (teleomorf *N. ochroleuca* Schwein.) je najznačajnija vrsta ovog roda, a njeno prisustvo je zabilježeno u svim klimatskim regijama svijeta, na različitim staništima i supstratima (sjemenu poljoprivrednih kultura, šumskom i ukrasnom bilju, lišću i plodovima voća) (Sutton et al., 1997.).



Slika 7. *Gliocladium roseum*

Izvor:
http://vignette4.wikia.nocookie.net/r6kbio/images/6/66/20081105_Gliocladium_roseum.jpg/revision/latest?cb=20101115044343

Gljiva obitava u tlu u svojstvu saprofita odakle apsorbira potrebni materijal. Pored navedenog *Gliocladium roseum* ima mogućnost uspostavljanja i parazitskog odnosa sa drugim gljivama te nematodama. Inhibicija klijanja spora, direktan mehanički pritisak na isklijale konidije i micelij patogena-domaćina jedan je od oblika antimikrobne aktivnosti *Gliocladium spp*. prema *B. cinerea*, *B. allii* i *F. oxysporum* (Yu and Sutton, 1997.).

Gljiva proizvodi širok spektar toksičnih komponenti kao svojevrstan sustav zaštite od drugih gljiva, bakterija i kukaca. Antibioza se očituje izlučivanjem enzima i antibiotika koji degradiraju staničnu stijenku napadnutog mikroorganizma. Svi ispitivani izolati zaustavljaju svoj rast uslijed prisustva inhibitornih tvari (enzima i antibiotika), koje izlučuje *G. roseum* (Grahovac, 2009).

Coniothyrium minitans rod CON/M/91-08 nastaje fermentacijom, tamno smeđe je boje, mirisa po gljivama. Čuva se na 4°C i stablnost mu se procjenjuje na više od pola godine. Mehanizam djelovanja preparata se temelji na sporama gljive *C. minitans* koje napadaju sklerocije gljive *Sclerotinia sp*. te ih uništava. Spore *C. minitans* penetriraju preko pukotina na površini ili preko vanjske strane sklerocija gdje se rast nastavlja kroz tkiva korteksa i ide do srži sklerocija. Cijeli postupak je popraćen enzimatskom razgradnjom tkiva koja su zahvaćena. U središnjem dijelu dolazi do plazmolize i agregacije staničnih zidova. U razdoblju od 14 dana pri idealnim uvjetima dolazi do stvaranja piknida u unutarnjem te vanjskom dijelu sklerocija (Grahovac i sur., 2009.).



Slika 8. *S. sclerotiorum* kolonizirana od strane *C. minitans*

Izvor:

http://msue.anr.msu.edu/uploads/news/_in_article/White_Mold_Biological_Control.jpg

C. minitans nalazi primjenu u suzbijanju *Sclerotinia sclerotiorum* i *Sclerotinia minor* na različitim kulturama (povrće, voće, duhan, soja, repa, itd.), pred ili poslije sjetve (Tomlin, 2006.).

Prema Lainsbury (2009.) tretiranje preparatom na bazi *C. minitans* se obavlja 3 mjeseca prije redovne zaštite od bolesti, kako bi se omogućilo vrijeme da se smanji brojnost infektivnih sklerocija u tlu.

Primjenom ovog preparata nakon žetve sprječava se daljnja kontaminacija tla sklerocijima formiranim na prethodnom usjevu. Preparat se inkorporira u površinski sloj tla na dubini od 10 cm, uz uvjet da je tlo vlažno s temperaturom 12-20° C (Grahovac i sur., 2009.).

Od preparata na bazi *C. minitans* u upotrebi su: Contans WG, Nativo 75 WG, Rudis, itd.

Ampelomyces quisqualis (AQ 10) služi u svrhu suzbijanja pepelnice vinove loze (*Uncinula necator*). Upotreba ovog preparata je odobrena u Italiji, Francuskoj, Sloveniji i Švicarskoj. Rabi se preventivno u slučaju zamijećivanja minimalno tri kolonije parazita na lišću ili na bobicama. Gljiva djeluje u određenim uvjetima relativne vlage zraka (60%) i temperature (12°C).

A. quisqualis hiperparazitira na kleistotecijima (plodištima) *U. necator* te smanjuje broj prezimljenih kleistotecija pepelnice.



Slika 9. *Ampelomyces quisqualis*

Izvor : http://www.discoverlife.org/



Slika 10. Preparat AQ 10

Izvor : http://www.karsia.si/aq-10

Biofungicidi na bazi bakterija

Bacillus thuringiensis spp. posjeduje specifičano djelovanje na određene kukce dok pritom ne šteti korisnim organizmima. Mehanizam djelovanja bakterije se ispoljava u vidu njena unosa putem hrane u tijelo kukca (npr. krumpirova zlatica, gusjenice različitih leptira) koji se hrani listom tretirane biljke. U organizmu kukca bakterija stvara toksične kristale koji pogubno djeluju na njegov crijevni sustav. Kao posljedica dolazi do prestanka ishrane te nakon 3-5 dana kukac ugiba. Fotolabilnost preparata je uzročnik njegovog kratkog djelovanja koje iznosi od 7 do 8 dana i stoga je potrebno ponoviti tretiranje.



Slika 11. *Bacillus thuringiensis*

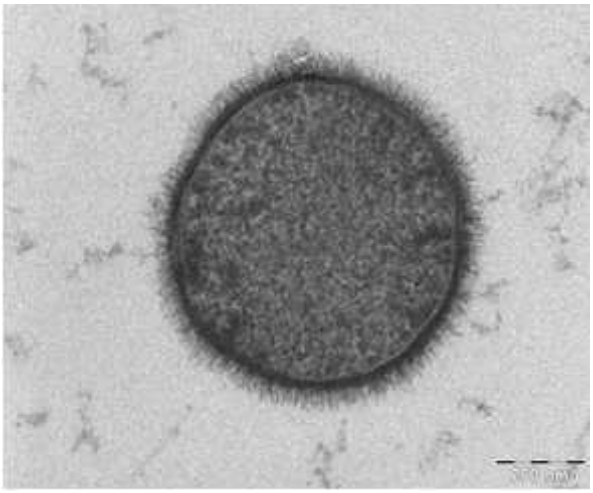
Izvor: https://biocontrol.entomology.cornell.edu/images/pathogens/B-thuring-image1.jpg

U organskoj poljoprivredi su dopušteni rodovi poput: *Bacillus thurigiensis var. aizwai, var. israeliensis, var. kurstaki, var. tenebrions.* Među poznatije preparate spadaju: Turex (Novartis), Solbac (Andermatt), Dipel (Siegfried), Baktur (CTA), Novodor (Andermatt Leu-Gygax).

Bacillus subtilis Cohn; var. amyloliquefaciens izolat GB03 (Gustafson) se upotrebljava za tretiranje leguminoza, sjemena pamuka, povrća, pšenice, ječma, soje, u kontroli *Fusarium spp., Aspergillus spp., Rhizoctonia solani*.

Bakterija (slika 7.) naseljava korijenov sustav napadnute biljke i na taj način dolazi do kompeticijskih odnosa sa patogenim mikroorganizmima.

Nakon primjene tj. tretiranja sjemena ili zalijevanja biljaka formira se zaštitna barijera u području rizosfere. Bakterija tijekom cijele vegetacije pruža zaštitu od patogena. Nema štetnog utjecaja na čovjeka.



Slika 12. *Bacillus subtilis Cohn*

Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Bacillus_subtilis.jpg

Pored izolata GB03 vrijedi istaknuti i izolat QST713. Njima se tretira sjeme leguminoza, pamuka te drugih vrsta u kontroli *Fusarium spp., Rhizoctonia solani, Alternaria spp, Aspergillus spp., Botrytis cinerea, Sphaerotheca aphani*. Poznati preparati su: Serenade WP, Botokiller, Subtilex i System 3 (*B. subtilis* + metalaxyl + quintozene), (Tomlin, 2006.). Serenade WP se rabi u koncentraciji 2,5-4 kg na 500-1000 l vode.

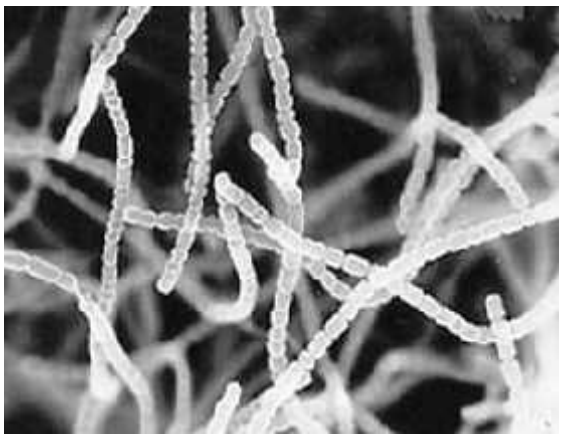


Slika 13. Serenade WP

Izvor : http://agronotizie.imagelinenetwork.com/

Streptomyces griseoviridis izolat K61 je bakterija koja djeluje na patogene gljive uzrokujući biljne bolesti i to koloniziranjem korijena biljaka prije pojave patogenih gljiva čime ih lišava prostora i hranjivih tvari (Grahovac i sur., 2009.).

Streptomyces griseoviridis primjenu nalazi u kontroli gljiva koje su uzročnici truleži sjemena, stabljike, korijena i venuća u ratarskim i povrtlarskim usjevima, te voćnjacima. Može se primijeniti folijarno, potanjem rasada i biljnih dijelova prije kalemljenja, zatim preko sjemena i tla. Navedeni biofungicid treba primijeniti preventivno, tj. prije nego što patogene gljive dostignu prag štetnosti (Grahovac i sur., 2009.).



Slika 14. *Streptomyces griseoviridis*

Izvor: http://www.lagrotecnico.it/immagini/Streptomyces%20griseoviridis.jpg

Spomenuti izolat ne djeluje štetno ukoliko se unese u organizam, međutim u nekim slučjevima može doći do iritacije očiju ili kože. Rukovatelji su obvezni nositi zaštitnu opremu pri tretiranju.

Prema Tomlinu (2006.), *S. griseoviridis* rabi se za kontrolu *Fusarium* i drugih patogena. Preparat Mycostop koji je namijenjen za biološku borbu u integriranoj zaštiti bilja je registriran u Mađarskoj (Ocsko i sur. 2008.).

Streptomyces lydicus, izolat WYEC 108. Pri određenim klimatskim uvijetima bakterija producira antibiotike i antifugalne sekundarne metabolite.

Bakterija proizvodi enzim hitinazu koji destruktivno djeluje na stanične zidove određenih patogenih gljiva (Sims, 1998.).

Od pripravaka na bazi bakterije *S. lydicus* valja izdvojiti preparat Actinovate SP, registriran u S.A.D. Rabi se u svrhu zaštite od sive plijeni i pepelnice u voćarstvu i povrćarstvu.



Slika 15. Biopreprat Actinovate SP

Izvor:
http://www.earlysgarden.com/components/com_mijoshop/opencart/image/cache/data/product/Garden/Greenhouse%20Supplies/Actinovate_Package-700x700.jpg

Biofungicidi na bazi virusa



Slika 16. *Baculovirus*

Izvor:
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/46/Baculovirus.jpg/200px-Baculovirus.jpg

Baculoviruses ili mikrobiološki virusi javljaju se u prirodi te posjeduju sposobnost zaraze i uništavanja određenih vrsta štetnih kukaca. Među zastupljenijima su virus granuloze te virus poliedarije (suzbijanje gusjenica različitih vrsta).

Patogeni virusi se mogu na dva načina prenijeti na domaćina: roditelji preko jajašaca prenose virus na sljedeću generaciju i direktna infekcija domaćina. Nakon par dana od unošenja hrane javljaju se simptomi i zaražena jedinka se prestaje hraniti te dolazi do diskoloracije kutikule. U roku 2 – 3 dana nakon pojave simptoma dolazi do uginuća domaćina.

Među važnije patogene viruse ubrajaju se cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV), nuclear polyhedrosis virus (NPV) i granulosis virus (GV).

Glavni nedostatci preparata su ovisnost o klimatskim faktorima, fotolabilnost, kratkotrajno i sporo djelovanje te uži spektar djelovanja. Da bi se postigao odgovarajući efekt potrebno je višekratno tretiranje u kombinaciji sa drugim mjerama. Od virusa u upotrebi si: *Helicoverpa armigera*, *Anagrapha falcifera*, *Autographa californica*, *Helithis virescens*, itd. Zastupljeni preparati: Kathon 893 MW, Biotrol (Biocide G30), Elcar, Spod-X, TM Biocontrol.

Biopesticidi na bazi kvasaca

Rhodotorula glutinis (izolat LS-11), *Cryptococcus laurentii* (izolat LS-28), *Candida famata* (izolat 21-D) i *Pichia guilliermondii* (izolat 29-A) navode se kao vrlo efikasni antagonisti fitopatogenh gljiva (*Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Rhizopus stolonifer, P. expansum, P. italicum* i *P. digitatum*) na plodovima jabuka, krušaka, jagoda, kivija, grožđa, naranči, mandarina i grejpfruta (Lima i sur., 1999.).

Različitim ispitivanjima spomenutih izolata došlo se do nekih novih saznanja. Prema Limi i sur. (1999.) koji su od dvjesto kvasaca izoliranih sa površina različitih plodova njih pedeset testirali za kontrolu *Penicillium expansum* na jabuci, najviše do izražaja po pitanju antagonizma spram spomenute gljive su došli *Rhodotorula glutinis* (izolat LS-11), *Cryptococcus laurentii* (izolat LS-28).



Slika 17. *Rhodotorula glutinis*

Izvor: http://nadidem.net/k/Rhod/thumbnails/Rhodotorula%20glutinis_jpg.jpg

Između ova dva dobivena izolata postoje izvjesne razlike. Testiranjem izolata na patogenima utvrđeno je da LS-28 ispoljava veću i stabilniju aktivnost od od izolata LS-11. LS-28 je testiranjem na oštećenim plodovima jabuke iskazao veću gustoću koloniziranja u odnosu na drugi izolat (Lima i sur., 1998.).

Budući da su dva pomenuta izolata ispoljila različite nivoe antagonističke aktivnosti u kontroli više patogena na uskladištenim proizvodima, ispitani su mehanizmi delovanja. Kompeticija za hranljive materije imala je najznačajniju ulogu u aktivnosti oba kvasca,

naročito izolata LS-11. Direktna interakcija sa hifama patogena utvrđena je samo kod izolata LS-11, dok kod aktivnijeg izolata LS-28, ovakva pojava nije registrirana. U odnosu na LS-11, izolat LS-28 je *in vitro* producirao značajno više ekstracelularne β 1,3-glukanaze, kada je uzgajan u prisustvu hifa patogena *P. expansum* i *B. cinerea* antibioza nije bila registrirana. (Marusich i sar., 1997).

5. Problemi u proizvodnji i primjeni biofungicida

Tijekom proizvodnog postupka prijeko je potrebno voditi računa o pojedinim segmentima proizvodnje. Prema navodima Warriora, (2000.), za pozitivan rezultat u proizvodnji potrebno je ispuniti određene preduvjete:

- kontrola proizvodnog postupka od početka uzgoja mikroorganizama;
- kvalitetan postupak fermentacije;
- oslobađanje mikroorganizama nakon postupka fermentacije;
- kvalitetna formulacija konačnog proizvoda.

Formulacije biofungicida spadaju u glavne preduvjete za uspješnu proizvodnju. U njih se često stavljaju različiti sastojci u svrhu očuvanja vitalnosti, klijavosti i drugih osobina. Bitna stavka kod proizvodnje biofungicida je održavanje stabilnosti same formulacije za vrijeme miješanja s različitim preparatima gdje je potrebno voditi računa o nekim faktorima poput temperature, razine kiselosti, itd.

Biopreparati se mogu primijeniti u obliku polunativne kulture ili u različitim formulacijama: vodotopive granule, pelete, mikrokapsule, prašiva, topiva prašiva, emulzije.

Nedostatak bioloških preparata je kratak rok čuvanja, ali taj problem se rješava inkapsulacijom mikroorganizama ili njihovih produkata u matrice organskih polimera. Biopreparati mogu sadržavati jedan ili veći broj mikroorganizama kao aktivnih tvari (Klokočar-Šmit i sur., 2006.).

S napretkom tehnologije došlo je i do razvijanja novih načina formuliranja biopreparata. Jedan od njih je mikroinkapsulacija. Rabe se kapsule sitnih dimenzija, veličine do 100 µm, u kojima se nalaze željeni mikroorganizmi i tvari namijenjene njihovom očuvanju.

Vosak je u funkciji nosača. Princip funkcioniranja je jednostavan, kapsula je stabilna sve dok se na određenoj temperaturi ne počne topiti i tad dolazi do oslobađanja mikroorganizama. U praksi je zastupljena još jedna metoda, mikroinkapsulacija do koje se dolazi miješanjem parafinskog voska i mikroorganizma. Tako dobivena tekućina se dezintegrira u sitne kapljice koje se potom hlade te na kraju formiraju mikrokapsule. Ovakav način primjene ima više prednosti, poput manjih troškova proizvodnje, jednostavnog skladištenja te jednostavne uporabe.

6. Prednosti i nedostatci biofungicida

U prednosti uporabe ubrajaju se:

- bezopasni su za neciljane organizme;
- upotreba bioloških tvari u programima integralne zaštite bilja osigurava razvoj održive poljoprivredne proizvodnje (Grahovac i sur., 2009.);
- manja fitotoksičnost;
- karenca i radna karenca posjeduju kratko vremensko trajanje;
- primjena u eko i integriranoj proizvodnji;
- smanjuju rizik od pojave rezistentnosti patogena u odnosu na kemijska sredstva (Filajdić i sur., 2003.);
- sigurnija upotreba u odnosu na kemijska sredstva;
- upotrebom se smanjuje potrošnja kemijskih preparata.

Postoje i određeni nedostaci kod njihove uporabe, poput:

- usporavaju infekcije;
- skuplji su od konkurencije rađene na kemijskoj bazi;
- slabije i sporije djelovanje u odnosu na kemijske fungicide;
- kompliciranost proizvodnje;
- uži spektar djelovanja;
- nemogućnost miješanja s drugim fungicidima i baktericidima;
- potrebno je voditi računa o njihovom uskladištavanju.

7. Zaključak

Razvijanjem ljudske svijesti o zdravijem načinu života podjednako se razvijaju i metode kojima bi se to omogućilo. Kao alternativa kemijskoj zaštiti razvila se zaštita koja se temelji na uporabi korisnih mikroorganizama ili njihovog metaboličkog produkta. Kao produkti metabolzma nastaju spore, kristali, toksini, antibiotici koji djelujući antagonistički na parazite štite biljke. Pored navedenog mikroorganizmi proizvode enzime, vitamine te biljne hormone čime utječu na imunitet biljke, povećavajući joj otpornost. Zbog svojih antagonističkih i kompeticijskih odnosa spram štetnih mikroorganizama, korisni igraju glavnu ulogu u ekološkoj poljoprivredi. U patogene organizme se ubrajaju fitoplazme, fitopatogene bakterije, gljive i virusi. U slučaju vinove loze postoje mnogi patogeni mikroorganizmi koji dovode do bolesti te na kraju do samog smanjenja uroda. Među značajnije bolesti kojima su uzročnici gljive, mogu se ubrojati: *Botrytis cinerea* (siva plijesan), *Uncinula necator* (pepelnica), *Plasmopara viticola* (plamenjača), *Phomopsis viticola* (crna pjegavost rozgve).

8. Popis literature:

1. Baličević, R., Paradiković, N., Šamota, D. (2007.): Control of soil parasites (*Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*) on tomato by a biological product. Cereal Research Communications. 35 (2 Part2): 1001-1004.

2. Chet, I., Viterbo, A. and Brotman, Y.: Plant biocontrol by *Trichoderma* spp. Department of Biological Chemistry, Jerusalem, Israel, 2006.

3. De La Cruz, J., Rey, M., Lora, J. M., Hidalgo-Gallego, A., Dominguet, F., Pintor-Toro, J. A., Llobell, A. & Benitez, T. (1993). Carbon source control on p-glucatiases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. Arch Microbiol.

4. De La Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Beniter, T. & Llobell, A. (1995). Purification and characterization of an endo-p-l,G-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. J. Bacteriol., 177, 6937- 6945.

5. Đorđević, S (2008.): Primena mikroorganizama u organskoj proizvodnji. U: Organska poljoprivreda (Lazić, B., Babović, J., urednici), Institut za ratarstvo i povrtlarstvo, Novi Sad.

6. Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M., Rekanović, E. (2003.): Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive. Pregledni rad. Pesticidi.

7. Grahovac, M., Inđić, D., Lazić, S., Vuković, S. (2009.): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi . Pestic. fitomed. (Beograd).

8. Grgić, A.: Biološki fungicidi i insekticidi u paleti Stockton-a. Zbornik sažetaka 53. seminara biljne zaštite – Glasilo biljne zaštite, 1/2: 54-55, 2009.

9. Igrc-Barčić, J., Maceljski, M. (2001.): Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika. Zrinski d.d., Čakovec.

10. Klokočar-Šmit, Z., Šovljanski, R., Inđić, D. (2006.): Biopreparati- alternativa u zaštiti plodovitog povrća. Biljni lekar, XXXIV.

11. Lučić, K. (2009.): Sadržaj sredstava za zaštitu bilja. Glasnik zaštite bilja.

12. Lainsbury, M. (2009.): The UK Pesticide Guide. BCPC, Norwich, UK.

13. Lima, G., Arru, S., De Curtis, V. and Arras, G. (1999.): Influence of antagonist, host fruit ant pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.

14. Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. and De Cicco, V. (1998.): Activity of the yeasts Cryptococcus laurentii and Rhodotorula glutinis against post-harvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology.

15. Lučić, K.: Sadržaj sredstava za zaštitu bilja 2009. g. Glasnik zaštite bilja, 1-2: 191-192, 2009.

16. Maceljski, M., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Igrc-Barčić, J., Pagliarini, N., Oštrec, Lj., Barić, K., Čizmić, I. (2004.): Štetočinje povrća. Zrinski d.d., Čakovec.

17. Maceljski, M.(2005.): Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj. Glasilo biljne zaštite.

18. Marusich, M.F., Robinson, B.H., Taanman, J.-W., Kim, S.J., Schillace, R., Smith, J.L., Capaldi, R.A., Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., De Cicco, V. (1997) β-1, 3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. Postharvest Biology and Technology.

19. Monte, E., Llobell, A., 2003. *Trichoderma* in organic agriculture. Proc. V World Avocado Congress.

20. Noronha, E.F., Ulhoa, C.J., 1996. Purification and characterization of an endo–ß-glucanase from *Trichoderma harzianum*.

21. Ocsko, Z., Molnar, J., Erdos, G. (2008.): Novenyvedo szerek, termesnovelo anyagok 2008/I. A Folmuvelesugyi es Videkfejlesztesi Miniszterium, Budapest .

22. Parađiković, N., Vinković T., Iljkić D. (2007.): Hydroponic Cultivation and Biological Protection of Pepper (Capsicum annum L.). Acta Agriculturae Serbica, 12(23): 19-24.

23. Tomlin, C. (Ed.) (2006.): The Pesticide Manual British Crop Protection Council. Farnham, UK.

24. Thomas, C. (2004.): Bug vs bug-managing plant diseases with biofungicides. Virginia Vegetable, Small Fruit and Speciality Crops.

25. Topolovec-Pintarić, S., Cvjetković, B. (2003.): Biofungicidi - nova rješenja za suzbijanje biljnih bolesti. Glasilo biljne zaštite / Maceljski, Milan (ur.). - Zagreb : Hrvatsko društvo biljne zaštite, 23.

26. Warrior, P. (2000.): Living system as natural crop-protection agents. Pest Manag. Sci., 56, 681-687.

27. Yu H., Sutton J. C. (1997.): Morphological development and interactions of *Gliocladium roseum* and *Botrytis cinerea* in raspberry. Can. J. Plant Pathol. 19: 237-246.

9. Sažetak

U svrhu zadovoljavanja tržišnih zahtjeva po pitanju rastuće organske proizvodnje, od presudne je važnosti razvoj biološke kontrole. Najčešći mehanizmi djelovanja korisnih mikroorganizama su: kompeticija, proizvodnja metabolita te mikoparazitizam. Mikrobiološki biofungicidi su u kompeticiji sa patogenim gljivama za hranu i prostor, stimuliraju sam proces odbrane biljaka te utječu na rast korijena.

Trichoderma hrazianum se nalazi u biofungicidu Trihodex za suzbijanje sive truleži. *Gliocladium spp*. se iskazao kao efektan u suzbijanju *B. cinerea, B. allii* i *F. oxysporum*. *Coniothyrium minitans* se pokazao djelotvoran protiv *Sclerotinia sp*.

Prednosti uporabe biopreparata se očituju u smanjenju uporabe konvencionalnih pesticida bez smanjenja prinosa. Oni djeluju samo na ciljane organizme i neopasni su za čovjeka. Postupak registracije im je jednostavniji i kraći, traje manje od godinu dana. Neki od nedostataka su kratkotrajno i sporo djelovanje te uži spektar djelovanja, fotolabilnost te ovisnost o klimatskim faktorima. Od registriranih preparata u RH mogu se izdvojiti sljedeći: Trichodex, AQ 10, Serenade WP.

10. Summary

In order to meet market requirements in terms of the growing organic farming, is crucial the development of biological control. The most common mechanisms of action of beneficial microorganisms are: competition, production of metabolites and micoparasitism. Microbial biofungicides are in competition with pathogenic fungi for food and space, stimulate the process itself of defense plants and affect the growth of roots.

Trichoderma hrazianum is located in Trihodex to combat the gray rot. *Gliocladium spp*. had proved effective in combating *B. cinerea*, *B. allie* and *F. oxysporum*. *Coniothyrium minitans* has proven to be effective against *Sclerotinia sp*.

The advantages of using bioproducts are reflected in the reduction of the use of conventional pesticides without reducing yield. They act only on target organisms and non-hazardous for humans. The registration procedure of them is much simpler and shorter, lasting less than a year. Some of the disadvantages are short-lived and slow action and a narrower range of activities, photolability and dependence on climatic factors. Of registered products in the Republic of Croatia may be allocated as follows: Trichodex, AQ 10, Serenade WP.

11. Popis slika

Red br.	Naziv slike	Str.
Slika 1.	Zaraženi i inokulirani kultivar rajčice	4
Slika 2.	Zaraženi i i inokulirani korijen šljive	5
Slika 3.	*Gaeumannomyces graminis trittici*	5
Slika 4.	Parzitski odnos izmedju *T. harzianum* i *R. solani*	6
Slika 5.	*Trichoderma harzianum*	7
Slika 6.	Preparat Trichodex	8
Slika 7.	*Gliocladium roseum*	9
Slika 8.	*S. sclerotiorum* kolonizirana od strane *C. minitans*	10
Slika 9.	*Ampelomyces quisqualis*	11
Slika 10.	Preparat AQ 10	12
Slika 11.	*Bacillus thuringiensis*	12
Slika 12.	*Bacillus subtilis Cohn*	13
Slika 13.	Serenade WP	14
Slika 14.	*Streptomyces griseoviridis*	14
Slika 15.	Preparat Actinovate SP	15
Slika 16.	*Baculovirus*	16
Slika 17.	*Rhodotorula glutinis*	17

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku Sveučilišni diplomski studij Vinogradarstvo i vinarstvo

Benefitni mikroorganizmi kao alternativa kemijskim fungicidima

Milan Cvjettović

U svrhu zadovoljavanja tržišnih zahtjeva po pitanju rastuće organske proizvodnje, od presudne je važnosti razvoj biološke kontrole. Najčešći mehanizmi djelovanja korisnih mikroorganizama su: kompeticija, proizvodnja metabolita te mikoparazitizam. Mikrobiološki biofungicidi su u kompeticiji sa patogenim gljivama za hranu i prostor, stimuliraju sam proces odbrane biljaka te utječu na rast korijena. *Trichoderma hrazianum* se nalazi u biofungicidu Trihodex za suzbijanje sive truleži. *Gliocladium spp*. se iskazao kao efektan u suzbijanju *B. cinerea*, *B. allii* i *F. oxysporum*. *Coniothyrium minitans* se pokazao djelotvoran protiv *Sclerotinia sp*. Prednosti uporabe biopreparata se očituju u smanjenju uporabe konvencionalnih pesticida bez smanjenja prinosa. Oni djeluju samo na ciljane organizme i neopasni su za čovjeka. Postupak registracije im je jednostavniji i kraći, traje manje od godinu dana. Neki od nedostataka su kratkotrajno i sporo djelovanje te uži spektar djelovanja, fotolabilnost te ovisnost o klimatskim faktorima. Od registriranih preparata u RH mogu se izdvojiti sljedeći: Trichodex, AQ 10, Serenade WP.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Doc. dr. sc. Suzana Kristek

Broj stranica: 30

Broj slika: 17

Broj literaturnih navoda: 27

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: korisni i patogeni mikroorganizmi, biološki pripravci, bolesti

Datum obrane:

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv.prof.dr.sc. Krolina Vrandečić, predsjednik

2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor

3. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, član

4. Doc.dr.sc. Sanda Rašić, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Osijek

Faculty of Agriculture University graduate study Winery

Benefit microorganisms as an alternative to chemical fungicides

Milan Cvjetković

Summary: In order to meet market requirements in terms of the growing organic farming, is crucial the development of biological control. The most common mechanisms of action of beneficial microorganisms are: competition, production of metabolites and micoparasitism. Microbial biofungicides are in competition with pathogenic fungi for food and space, stimulate the process itself of defense plants and affect the growth of roots. *Trichoderma hrazianum* is located in Trihodex to combat the gray rot. *Gliocladium spp*. had proved effective in combating *B. cinerea, B. allie* and *F. oxysporum*. *Coniothyrium minitans* has proven to be effective against *Sclerotinia sp*. The advantages of using bioproducts are reflected in the reduction of the use of conventional pesticides without reducing yield. They act only on target organisms and non-hazardous for humans. The registration procedure of them is much simpler and shorter, lasting less than a year. Some of the disadvantages are short-lived and slow action and a narrower range of activities, photolability and dependence on climatic factors. Of registered products in the Republic of Croatia may be allocated as follows: Trichodex, AQ 10, Serenade WP.

The work was created at: Faculty of Agriculture

Mentor: PhD. Susan KRISTEK

Pages: 30

Number of photos: 17

Number of references: 27

Original in: Croatian

Keywords: beneficial and pathogenic microorganisms, biological preparations, diseases

Date of defense:

Commission for evaluation and defense of thesis:

1. PhD. Karolina Vrandecic, President

2. PhD. Susan Kristek, mentor

3. PhD. Drago Bešlo, member

4. PhD Sanda Rasic, a replacement member

The work is stored in the Library, Faculty of Agriculture, University of Osijek, King Peter Svačića 1d.