

# Antagonističko djelovanje *Trichoderma* sp. u suzbijanju rasta *Rhodococcus fascians* i *Pseudomonas syringae*

---

Vujošević, Marin

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:772143>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



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](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marin Vujošević

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Antagonističko djelovanje *Trichoderma* sp. u suzbijanju rasta**

***Rhodococcus fascians* i *Pseudomonas syringae***

Završni rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marin Vujošević

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

**Antagonističko djelovanje *Trichoderma* sp. u suzbijanju rasta  
*Rhodococcus fascians* i *Pseudomonas syringae***

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić
2. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. prof. dr. sc. Vesna Rastija

Osijek, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Bilinogojstvo

Završni rad

Marin Vujošević

### **Antagonističko djelovanje *Trichoderma* sp. u suzbijanju rasta *Rhodococcus fascians* i *Pseudomonas syringae***

**Sažetak:** Biopesticidi predstavljaju ekološka sredstva za zaštitu bilja, ne ugrožavaju ljudsko zdravlje niti zdravlje životinja i ne djeluju štetno na prirodu i okoliš. Gljive roda *Trichoderma* u poljoprivredi se koriste u svrhu suzbijanja patogenih organizama. U ovome radu je cilj istraživanja bio utvrditi djelotvornost roda *Trichoderma* u suzbijanju rasta dvije fitopatogene bakterije *Rhodococcus fascians* i *Pseudomonas syringae*. Prikazani rezultati pokazali su da djelovanje ispitivanog roda *Trichoderma* na *P. syringae*, ne dovodi do inhibicije, *R. fascians* pokazuje izrazitu osjetljivost prema inhibitornim tvarima *Trichoderma* sp. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi za cilja imala izolaciju i identifikaciju još učinkovitijih sojeva roda *Trichoderma*.

Ključne riječi: biopesticidi, fitopatogene bakterije, gljive, inhibicija, biljka

22 stranica, 8 slika, 2 tablice i 58 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agriculture in Osijek  
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production

BSc Thesis

Marin Vujošević

### **Antagonistic activity of *Trichoderma* sp. in suppressing the growth of *Rhodococcus fascians* and *Pseudomonas syringae***

**Summary:** Biopesticides represent ecological products for plant protection, they do not endanger human or animal health and do not have a harmful effect on nature and the environment. *Trichoderma* fungi are used in agriculture to control pathogenic organisms. In this study, the aim of the research was to determine the effectiveness of the genus *Trichoderma* in suppressing the growth of two phytopathogenic bacteria *Rhodococcus fascians* and *Pseudomonas syringae*. The presented results showed that the action of the tested genus *Trichoderma* on *P. syringae* does not lead to inhibition, *R. fascians* shows a distinct sensitivity to the inhibitory substances of *Trichoderma* sp. Further research is needed to isolate and identify even more effective strains of the genus *Trichoderma*.

Key words: biopesticides, phytopathogenic bacteria, fungi, inhibition, plant

22 pages, 8 photos, 2 tables and 58 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Pesticidi i biopesticidi.....	2
1.2. Osobine roda <i>Trichoderma</i> .....	5
1.2.1. Sekundarni metaboliti roda <i>Trichoderma</i> .....	6
1.3. Fitopatogene bakterije .....	7
1.3.1. Osobine <i>Rhodococcus fascians</i> .....	7
1.3.2. Osobine <i>Pseudomonas syringae</i> .....	8
2. MATERIJAL I METODE .....	10
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	11
3.1. Antagonističko djelovanje <i>Trichoderma</i> sp. u suzbijanju rasta <i>Pseudomonas syringae</i> .....	11
3.2. Antagonističko djelovanje <i>Trichoderma</i> sp. u suzbijanju rasta <i>Rhodococcus fascians</i> .....	15
4. ZAKLJUČAK .....	17
5. POPIS LITERATURE .....	18

## 1. UVOD

U današnjem vremenu sve više se primjenjuje intenzivna poljoprivreda, čiji je zadatak: velika proizvodnja, upotrebe tehnike, primjena mineralnih gnojiva i intenzivna upotreba kemijskih sredstava. Ovakav način poljoprivrede odlikuje i primjena veće količine kemijskih sredstava, koje imaju štetan utjecaj na ljude i životinje, dolazi do degradacije tla, u tlu zaostaju rezidue pesticida što dovodi do zagađivanja voda. Primjenom sredstava na bazi mikroorganizama, možemo smanjiti zagađivanje ekosustava. U ovome radu je cilj istraživanja bio utvrditi mogu li se gljive roda *Trichoderma* koristiti u svrhu suzbijanja rasta dvije fitopatogene bakterije *Rhodococcus fascians* i *Pseudomonas syringae*.

## 1.1. Pesticidi i biopesticidi

Ekološka poljoprivreda je sustav poljoprivredne proizvodnje u kojem je cilj primjenjivati sredstva na prirodnoj bazi u svrhu zaštite biljnih vrsta odnosno smanjenja šteta na ekosustavima izostankom primjene kemijskih pesticida koje se mogu akumulirati u čovjeku i životinjama. Ostaci kemijskih sredstava su usko povezane s raznim bolestima, poremećajima, mutacijama, sterilnosti i problema tijekom trudnoće (Rupa i sur., 1991.) koji se mogu pojaviti dugotrajnim unosom i izlaganjem štetnim tvarima. Primjena kemijskih pesticida u poljoprivredi dovodi do onečišćenja podzemnih voda, gdje se pesticidi ispiru u dublje slojeve tla i dolaze do podzemnih voda. Voda koja je kontaminirana pesticidima nije sigurna za ljudsku upotrebu kao niti za navodnjavanje biljnih kultura.

Biopesticidi su pesticidi koji potiču iz prirodnih izvora, poput: biljaka s biopesticidnim djelovanjem gdje se koristi 2000 vrsta, sapuna na bazi biljnih masnih kiselina (Znaor, 1996.) i mikroorganizama, a očituje ih vrlo brza razgradnja i primjena u manjim količinama (Znaor, 1996.). Biopesticidi u suzbijanju štetočinja ili štetočina koriste netoksične mehanizme suzbijanja, dok kemijski pesticidi putem aktivnih tvari direktno ubijaju štetočine (Kumar i sur., 2022.). Za razliku od biopesticida koji se baziraju na prirodnim izvorima, pojedini pesticidi kemijskoga podrijetla su nerazgradivi u prirodi (Znaor, 1996.). Proizvodnja biopesticida godišnje prelazi preko 3000 tona (Farooqi i sur., 2020.).

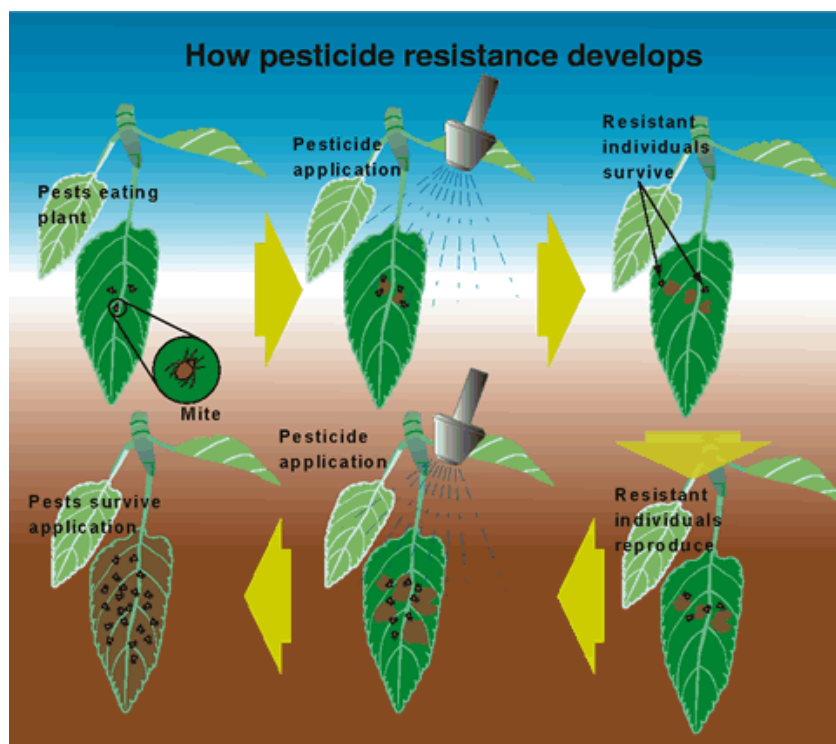
Odabirom biopesticida možemo umanjiti i izbjeći ugrožavanje vodenih ekosustava. Također nepravilna ili prekomjerna upotreba pesticida ima negativne učinke na samo površinu, odnosno tlo, gdje dolazi do degradacije tla i smanjivanje plodnosti tla. Postoji opasnost od udisanja otrovnih kemikalija koja je nastaje zanošenjem pesticida vjetrom u obliku škropiva. Pesticid tada može biti prenesen na površine koje nisu bile ciljano tretirane. Ekološki problem predstavlja i isparavanje pesticida gdje oni mogu nakon isparavanja se naći u kiši i drugim oborinama (Znaor, 1996.). Prednost uporabe biopesticida je suzbijanje ciljanih organizama i štetočinja, a da pri tome ne uzrokuje opasnost prema pticama, korisnim insektima poput pčela i ostalih životinja. Danas u Europi 50% biljnih i životinjskih vrsta je u opasnosti zbog primjene kemijskih pesticida (Znaor, 1996.).

Pojava rezistentnosti stvara u današnje vrijeme veliki problem. Odabir i upotreba selektivnih pesticida dovodi do stvaranja i jačanja otpornosti biljnih bolesti i štetnika prema pesticidima. (Znaor, 1996.). Rezistentnost nastaje kada određena populacija nekoga organizma uspije preživjeti apliciranje pesticida, a te otporne jedinice npr. kukaca se nastave razmnožavati te

prenose rezistentnost na njihove potomke, a ovakvim načinom dolazi do stvaranja tolerantne populacije kukaca (Slika 1.) (Sowmiya i Sankarganesh, 2019.).

Uz štetna djelovanja pesticida, važno je navesti da pesticidi uništavaju i korisne mikroorganizme, a tako i gujavice. Ovi organizmi su od iznimne važnosti u poljoprivredi iz razloga što njihovo prisustvo pridonosi razgradnji organske tvari u tlu (Znaor, 1996.). Biopesticidi ne uništavaju korisne organizme u tlu a njihovom primjenom indirektno dolazi i do povećanje kvalitete tla.

Mnogi poljoprivrednici koji koriste i primjenjuju pesticide, ambalažu ne odlažu na siguran način i na zato predviđena mjesta. Takav način odlaganja čini ogromnu štetu na ekosustav. Ovaj problem bi se mogao izbjeći uporabom biopesticida jer njihovo odlaganje neće predstavljati štetu na ekosustav.

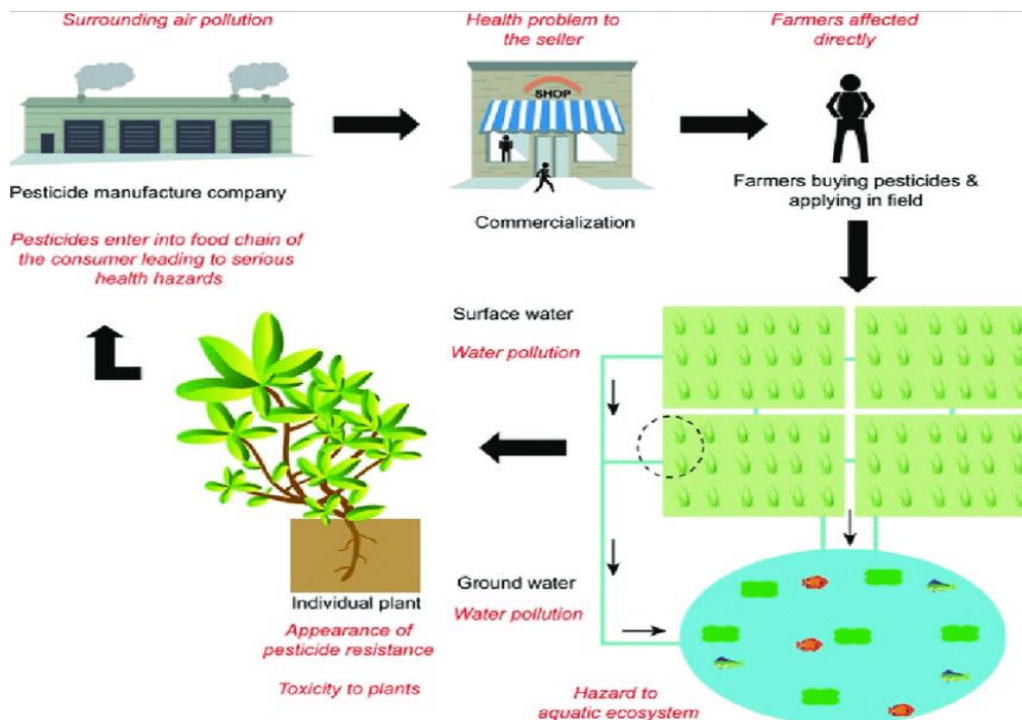


Slika 1. Razvijanje rezistentnosti kod kukaca

(Izvor: <https://www.canr.msu.edu/grapes/uploads/images/pesticResist.gif>)



Zbog rastuće osviještenosti o štetnosti na ljudsko zdravlje i okoliš (Slika 2.), mnogi proizvođači se okreću ekološkoj proizvodnji, što se očituje na tržištu, gdje postoji širok spektar biopesticida. Danas na tržištu mogu se naći razna biološka sredstva (biopesticidi) na bazi mikroorganizama kao što su: *Trichoderma*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*. Primjenom sredstava na bazi gljive *Trichoderma* sp. možemo preventivno i direktno djelovati na nastanak i razvoj bakterijskih bolesti, uz biocidno djelovanje ima i stimulirajući učinak na biljni rast i razvoj, te smanjenje stresa biljaka (Tyśkiewicz, 2022). Isti autori navode kako je u svijetu 50-60 % biopesticida na bazi gljive *Trichoderma* (Tyśkiewicz i sur., 2022.).



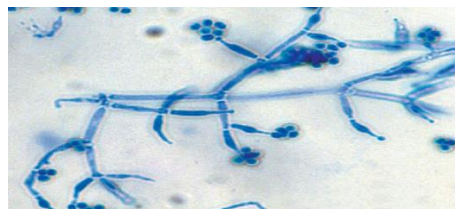
Slika 2. Štetno djelovanje pesticida na ljude i ekosustav

Izvor: Pradhan i Mailapalli, 2020: Nanopesticides for Pest Control. Sustainable Agriculture Reviews 40 (<https://www.researchgate.net>)

## 1.2. Osobine roda *Trichoderma*

Rod *Trichoderma* (Slika 3.) pripada razredu: Sordariomycetes, redu: Hypocreales, porodici: Hypocreaceae (Barman i sur., 2021.), a predstavlja rod saprofitnih gljiva koje su prisutne u svim tlima i koloniziraju materijale koji se sastoje od celuloze (Kubicek i sur., 2008.). Rod *Trichoderma* se prvi puta opisuje 1794.godine (Persoon, 1794., cit. Schuster i Schmoll, 2010.). Zbog vrlo dobre mogućnosti adaptacije, gljiva se može razviti u gotovo svim prirodnim uvjetima, kako u bogatim i raznolikim, tako i u sterilnijim i tamnijim uvjetima poput biotehnološkoga fermentora (Schuster i Schmoll, 2010.).

Uz upotrebu u zaštiti bilja od različitih patogena, *Trichoderma* posjeduje enzime koji se koriste u svrsi poboljšavanja procesa proizvodnje piva ( $\beta$ -glukanaza), macerirajuće enzime za proizvodnju voćnih sokova i kao aditiv koji se nalazi u hrani za stoku (ksilanaza) (Schuster i Schmoll, 2010.). Dok se *Trichoderma reesei* koristi kao izvor enzima, u biološkoj zaštiti bilja koriste se: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* i *Trichoderma asperellum* (Silva i sur., 2014.). Rod gljiva *Trichoderma* se prvenstveno koristi u zaštiti bilja od bolesti. Prema Yao i sur. (2023.) ona ima izuzetnu ulogu u stimuliranju rasta i razvoja biljke, poboljšava usvajanje hranjiva, jača otpornosti biljke prema parazitima i poboljšava agroekosustava. Uz istraživanja koje navodi Yao i sur. (2023.) gljive roda *Trichoderma* imaju pozitivni učinak u suzbijanju patogenih gljiva i posjeduju mogućnost antagonističkoga djelovanja i prema nematodama. Prema Zhangu i sur. (2022.) mnogi sojevi roda *Trichoderma* proizvode antimikrobne sekundarne metabolite, a jedan od važnijih metabolit koji ima antibakterijsko svojstvo je peptaibol. Peptaibol je bioaktivni peptid koji sadrži  $\alpha$ -aminoizomaslačnu kiselinu. Ova amino kiselina omogućava inhibicijska svojstva protiv uzročnika biljnih bolesti (Ramachander Turaga 2020.). Gljive iz roda *Trichoderma* najbolje rastu u uvjetima čiji je pH u rasponu od 5.5. - 7.5. i temperaturama u rasponu od 25 - 30 °C (Singh i sur. 2014.).

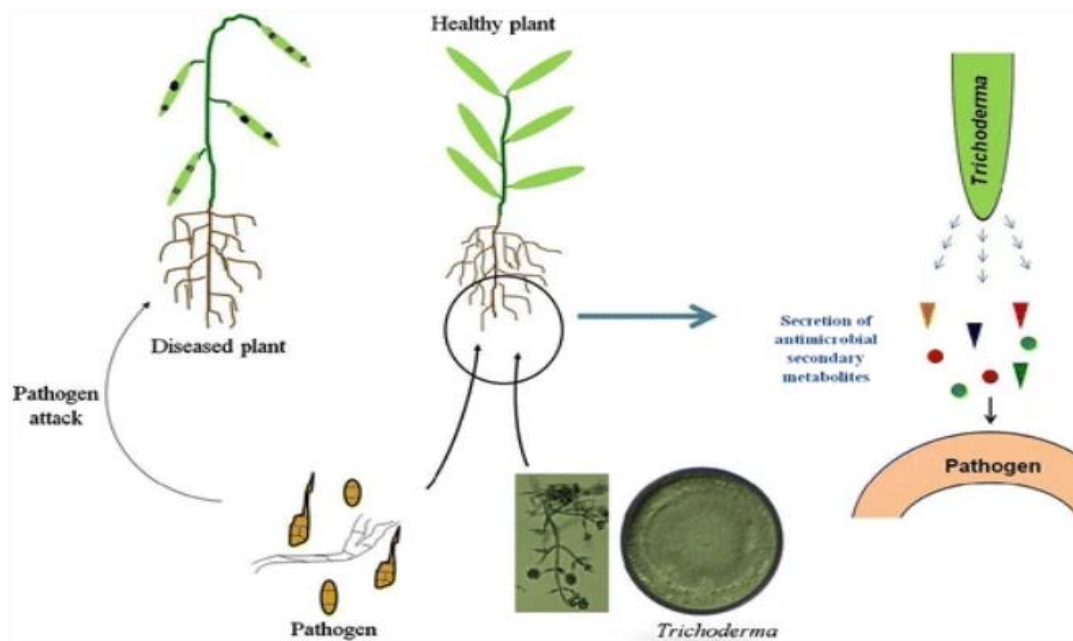


Slika 3. *Trichoderma* mikroskopski prikaz

(Izvor:[https://www.adelaide.edu.au/mycology/sites/default/files/styles/ua\\_image\\_landscape/public/media/images/2021-09/trichoderma.jpg?h=11824060&itok=81Z\\_GAOJ](https://www.adelaide.edu.au/mycology/sites/default/files/styles/ua_image_landscape/public/media/images/2021-09/trichoderma.jpg?h=11824060&itok=81Z_GAOJ))

### 1.2.1. Sekundarni metaboliti roda *Trichoderma*

Iako sekundarni metaboliti ne moraju nužno imati antimikrobno djelovanje, oni su korisni gljivi tijekom njezinoga rasta i razvoja. *Trichoderma* proizvodi sekundarne metabolite poput: enzima, antibiotika, vitamina, polisaharida i organskih kiselina. Sekundarni metaboliti roda *Trichoderma* uzrokuju oštećenje stanične stijenke bakterije, njeno raspadanje i izljev sadržaja iz stanica (Khan i Xuan, 2020.) (Slika 4.). Sekundarni metaboliti koje proizvodi *Trichoderma* su: gliotoksin (mikotoksin čiji je učinak antibakterijski) (Kosalec i Pepeljnjak, 2004.), peptiboli (membranski aktivni polipeptidi koji pokazuju antibiotsku i antifungalnu aktivnost) (Chugh i Wallace 2001.), gliovirin, terpeni, poliketidi, pironi i drugi (Khan i Xuan, 2020.).



Slika 4. Djelovanje sekundarnih metabolita roda *Trichoderma* na patogene

(Izvor: Keswani i sur. (2014.): Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied microbiology and biotechnology, 98(2), 533–544)

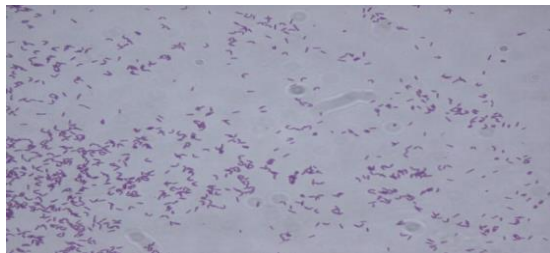
### 1.3. Fitopatogene bakterije

Fitopatogene bakterije su jedne od važnijih biljnih patogena u svijetu. Procjenjuje se da je oko 150 bakterijskih vrsta fitopatogeno (Aguilar-Marcelino i sur., 2022.). Fitopatogene bakterije su klasificirane u 3 porodice: *Xantomonadaceae*, *Pseudomonaceae*, i *Enterobacteriaceae*. Ove porodice fitopatogenih bakterija se dijele na rodove *Dickeya*, *Liberibacter*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Candidatus*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralsonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma*, *Phytoplasma*, *Brenneria*, *Lonsdale* i *Xylophilus* (Aguilar-Marcelino i sur., 2022.). Navedene fitopatogene bakterije vrše zarazu kroz različite mehanizme, neki od načina vršenja zaraze je primjerice raspadom stanične stijenke enzimima ili unošenjem kemikalija i proteina (Aguilar-Marcelino i sur., 2022.). One u početku koloniziraju biljno tkivo, a zatim se i brzo razmnožavaju, gdje se u velikoj populaciji nalaze u određenome biljnom tkivu po području (Tampakaki i sur., 2009.). Patogenim organizmima poput bakterija, potreban je domaćin kako bih se mogle razmnožavati (Buttimer i sur., 2017.). Nakon izvršene zaraze i određenog perioda inkubacije, kod biljke dolazi do pojave simptoma karakterističnih za pojedni patogen. Glavne posljedice zaraze su: smanjenje prinosa, manja kvaliteta. Uz simptome i zarazu ulogu imaju također i abiotski čimbenici (Tampakaki sur., 2009.).

#### 1.3.1. *Osobine Rhodococcus fascians*

*Rhodococcus fascians* pripada razredu: Actinomycetes, redu: Mycobacteriales i porodici: Nocardiaceae (Barka i sur., 2015.). *R. fascians* je aerobna, gram-pozitivna bakterija (Park i sur., 2021.), što znači da stanična stijenka ove bakterije ima debeli sloj peptidoglikana mureina i teihonsku kiselinu (Potekhina i sur., 2011.). Ova fitopatogena bakterija ne stvara spore i nepokretna je, dok stanična stijenka sadrži mikoličnu kiselinu (Putnam i Miller, 2007.). Oblik ove bakterije može biti štapičasti ili kokoidan (Putnam i Miller, 2007.) (Slika 5.). *R. fascians* vrši zarazu kod dikotiledonih i monokotiledonih biljaka (Vereecke i sur., 2000.), a širenje ove bakterije vrši se zaraženim alatima, vodom, tлом, sjemenom i biljkama (Putnam i Miller, 2007.). Zaraza bakterijom *R. fascians* kod biljaka djeluje na način da prodire intercelularno kroz biljno tkivo i uzrokuje probleme sa neuravnoteženim biljnim hormonima, normalnim rastom biljaka, pri čemu izaziva poremećaj normalnoga rada biljnoga metabolizma (Cornelis i sur., 2001.). Simptomi zaraze ovom fitopatogenom bakterijom očitavaju na nadzemnom dijelu biljaka. Dolazi do povećanog rasta izbojka u blizini baze biljke, izbojaka, cvatova i nastanka vještijih metla. Stvaranje brojnih pupova

čini proliferaciju izdanaka (Putnam i Miller, 2007.). Optimalna temperatura za *R. fascians* je 25 - 28 °C, maksimalna do 35 °C i minimalna do 7 °C. Temperature iznad 33 °C dovode do inhibicije, a čak i do smanjenja širenja zaraze (Putnam i Miller, 2007.). Simptomi koje uzrokuje *R. fascians* poput abnormalnosti u rastu biljke, slični su kao i kod biljaka koje imaju hormonsku neuravnoteženost (Putnam i Miller, 2007.). Štete koje nanosi *R. fascians* su od velikoga ekonomskoga značaja jer onemogućuje uzgajanje ukrasnoga bilja i uzgoja u rasadnicima (Putnam i Miller, 2007.).



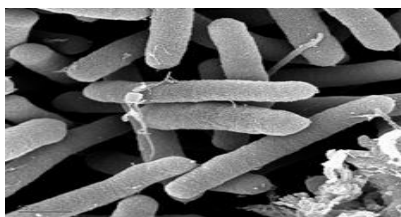
Slika 5. Mikroskopski prikaz *Rhodococcus fascians*

(Izvor: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/75/Rhodococcus\\_fascians.jp](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/75/Rhodococcus_fascians.jp))

### 1.3.2. *Osobine Pseudomonas syringae*

*Pseudomonas syringae* pripada razredu: Gammaproteobacteria, redu: Pseudomonadales i porodici: Pseudomonadaceae (Arnold i Preston, 2019.). *P. syringae* je gram-negativna bakterija čija stanična stijenka sadrži malu količinu peptidoglikana mureina (Silhavy i sur., 2010.). Aerobna je bakterija, štapičasta oblika (Slika 6.) i imaju jednu polarnu flagelu (Arnold i Preston, 2019.). Idealna temperatura za rast i razvoj *P. syringae* je 22 - 30 °C (Arnold i Preston, 2019.). Određeni sojevi *P. syringae* imaju mogućnost pružanju otpora antimikrobnim spojevima, što omogućuje povećanje zaraznosti (Hwang i sur., 2005.). Čak 50% sojeva *P. syringae* proizvodi toksine, a dok svega par sojeva proizvodi više od jednoga toksina (Hwang i sur., 2005.). *P. syringae* sadrži protein koji omogućava na temperaturama od 5 – 8 °C stvaranje ledenih kristala na listu biljke, što dovodi do velikih gubitaka u poljoprivredi (Hwang i sur., 2005.). Toksini koje proizvodi ova fitopatogena bakterija su: fazelotoksin (toksin koji uzrokuje rak i pjegavost lista kod kivija) (Sawada i sur., 1997), tabtoksin (toksin koji proizvodi *P. syringae*; *pv. tabaci* i uzrokuje bakteriozu na duhanu) (Agrios, 2005.), koronatin i drugi (Geng i sur., 2012.). Ova fitopatogena bakterija uzrokuje razne bolesti na voćkama, povrću i ukrasnome bilju (Križanac i sur., 2016.). Bolesti koje uzrokuje ova fitopatogena bakterija su: bakterijska pjegavost rajčice (*P. syringae pv. tomato*) (Morán-Diez i sur., 2020.), rak stabljike mušmule (*P. syringae pv. eriobotryae*) (Khanh, i

sur., 2018.), uglatu pjegavost lista (*P. syringae* pv. *lachrymans*) (Yedidia i sur. 2003.), bakterijski rak trešnje i višnje (*P. syringae* pv. *syringae*) (Ashorpour i sur., 2008.) *P. syringae* pv. *morsprunorum*) (Križanac i sur., 2016.), rak masline (*P. syringae* pv. *savastanoi*) (Rodríguez-Moreno, (2009.), bakterioza paprike (*P. syringae* pv. *syringae*), bakterioza duhana (*P. syringae* pv. *tabac*) (Agrios, 2005.) i bakterijski rak kivija (*P. syringae* pv. *actinidiae*) (Hill i sur., 2013.).



Slika 6. Mikroskopski prikaz *Pseudomonas syringae*  
(Izvor:[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pseudomonas\\_syringae\\_SEM.jpg](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pseudomonas_syringae_SEM.jpg))

## 2. MATERIJAL I METODE

Bioaktivnost *Trichoderma* sp. iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek je utvrđena u *in vitro* pokusu na fitopatogenim bakterijama *Pseudomonas syringae* DSM 50256 i *Rhodococcus fascians* DSM 20669. *Trichoderma* je umnožena na krumpir dekstroznom agaru (Biolife, Italija) pri temperaturi od  $25 \pm 1$  °C tijekom pet dana, a bakterije su umnožena na hranjivom agaru (Liofilchem, Italija) tijekom 72 sata na  $27 \pm 1$  °C.

Test antimikrobne osjetljivosti je utvrđena modificiranom Kirby - Bauerovom dilucijskom metodom, prema uputama CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012). Hranjivi agar je naciepljen s ispitanim bakterijama, u četiri ponavljanja. Gustoća inokuluma je podešena na 0,5 McFarland standarda.

Micelijski disk promjera 4 mm uzet je s ruba čiste kulture roda *Trichoderma* i postavljen je na centralno mjesto u Petrijevu zdjelicu (Slika 7.). Negativna kontrola je sadržavala disk filter papira sa sterilnom vodom.

Svi postupci su rađeni poštujući pravila sterilnosti. Petrijeve zdjelice su stavljene u termostat na inkubaciju. Rezultati su očitani nakon 48, 96 sati i 144 sata pri čemu je izmjerena zona inhibicije rasta patogenih bakterija.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

#### 3.1. Antagonističko djelovanje *Trichoderma* sp. u suzbijanju rasta *Pseudomonas syringae*

U Tablici 1. prikazani su rezultati utjecaja *Trichoderma* sp. na *P. syringae* pri čemu nije utvrđeno antagonističko djelovanje ispitivanog roda *Trichoderma* na *P. syringae*.

Tablica 1. Zone inhibicije nastale djelovanjem *Trichoderma* sp. na *P. syringae*

<i>Pseudomonas syringae</i>	Zona inhibicije (mm)			
	kontrola	48 h	96 h	144 h
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
$\bar{x}$	0	0	0	0

Prema CLSI zona inhibicije od  $\leq 14$  mm predstavlja rezistentnost, 15 – 19 mm umjerenu osjetljivost,  $\geq 20$  osjetljivost. Granične vrijednosti antimikrobne aktivnosti istraživači postavljaju u slične okvire. Prema Monks i sur. (2002.) slabu aktivnost predstavlja zona inhibicije od 7 – 11 mm, umjerenu aktivnost od 11 – 16 mm i jaka aktivnost od  $>16$  mm inhibicijske zone. Slična istraživanjima utvrdila su i inhibitorno i rezistentno djelovanje roda *Trichoderma* prema *P. syringae*.



Morán-Diez i sur. (2020.) istraživali su utjecaj tri vrste gljive *Trichoderma parareesei* T6, *Trichoderma asperellum* T25 i *Trichoderma harzianum* T34 u biokontroli na fitopatogenu bakteriju *P. syringae pv. tomato* sojeva DC3000 i DC3118. Cilj istraživanja je bio utvrditi potencijal različitih sojeva *T. parareesei* T6, *T. asperellum* T25 i *T. harzianum* T34, u suzbijanju fitopatogenu bakteriju *P. syringae pv. tomato* koja proizvodi toksin koronatin i može li rajčica modulirati mehanizam obrane protiv *P. syringae pv. tomato*. U istraživanjima koji su provedeni postignuto je smanjenje pojave simptoma ali nije zapažena inhibicija bakterije *P. syringae pv. tomato*, te u slučaju gljive roda *Trichoderma* nije moguće preventivno i direktno djelovanje u zaštiti biljnih vrsta protiv ove bakterije (Morán-Diez i sur., 2020.)(Slika 8.).



Slika 7. Simptomi napada *P. syringae pv. tomato* na listu rajčice

(Izvor: <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5606052>)

Yedidia i sur. (2003.) proveli su istraživanje koristeći gljivu *Trichoderma asperellum* (T-203) u suzbijanju uzročnika uglatih mrlja na listu krastavca. U pokusu su koristili sjeme krastavca (*Cucumis sativus* L. cv. Delila) koje su prvotno dezinficirali 2 minute u 2% NaOCl, a zatim isprali ga destiliranom vodom. Sjeme je postavljeno na sterilnu gazu i hidroponski uzgoj. Kontejneri za hidroponski uzgoj su prozračivani filterom zraka, a biljke su uzgajane pri 26 °C i relativnoj vlazi zraka od 80% te ciklusu svjetla od 14 sati dana i 10 sati noćnoga uvijete (Yedidia i sur., 2003.). Na sadnice starosti 12 dana je aplicirana gljiva *T. asperellum* (T-203) u zoni korijena biljke. Biljke zaražene *P. syringae* pv. *lachrymans*, a na koje prethodno nije bio apliciran *T. asperellum* (T-203), došlo je do pojave simptoma. Simptomi su se očitovali u obliku nekrotičnih lezija koje su bile okružene klorozom. Biljke krastavca koje su prije toga bile tretirane *T. asperellum* (T-203), pokazale su manju pojavu simptoma, te je zaštita protiv *P. syringae* pv. *lachrymans* izmjerena na način mjerenjem dijametra nekroze i proporcije cijelog nekrotičnoga područja po listu (Slika 9.). Smanjenje nekroze nakon 5 dana je iznosilo 50%, dok je sveukupno područje pod nekrozom je smanjeno za 80%. U ovome pokusu je dokazano da gljiva *T. asperellum* (T-203) smanjuje pojavu simptoma na biljkama na način da inhibira dijeljenje i rast bakterija (Yedidia i sur., 2003.).



Slika 8. Simptomi napada *P. syringae* pv. *lachrymans* na listu krastavca  
(Izvor:<https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5602270>)

Hill i sur. (2013.) proveli su istraživanje gdje su izolirali različite spojeve roda *Trichoderma* u cilju suzbijanja *Pseudomonas syringae pv. actinidiae*, uzročnika bakterijskoga raka kivija. Izolirali su sojeve roda *Trichoderma* iz korijena zdravih biljaka kivija. Korijenje mladih sadnica kivija inokulirali su različitim izolatima roda *Trichoderma* koji su primijenjeni pojedinačno ili u smjesi na korijen kivija. Nakon 8 do 10 tjedana, inokulirajućom iglom je unesena fitopatogena bakterija *P. syringae pv. actinidiae*. Rezultati istraživanja ukazali su kako *Trichoderma* može pridonjeti u kontroli i suzbijanju *P. syringae pv. actinidiae*, smanjujući simptome pojave bolesti. Također tretiranje starijih biljka kivija može doprinijeti u povećanju otpornosti na *P. syringae pv. actinidiae* (Hill i sur., 2013.).

### 3.2. Antagonističko djelovanje *Trichoderma* sp. u suzbijanju rasta *Rhodococcus fascians*

Rezultati prikazani u Tablici 2. prikazuju izrazitu osjetljivost bakterije *R. fascians* prema inhibitornim tvarima koje sintetizira *Trichoderma* sp.

Tablica 2 . Utvrđene zone inhibicije nastale djelovanjem *Trichoderma* sp. na *R. fascians*.

<i>Rhodococcus fascians</i>	Zona inhibicije (mm)				
	Broj ponavljanja	kontrola	48 h	96 h	144 h
1		0	30	30	30
2		0	30	31	31
3		0	22	24	24
4		0	27	27	27
$\bar{x}$		0	27,3	28	28

Provedenim pokusom utvrđena je velika osjetljivost *R. fascians* prema metabolitima soja *Trichoderma*. Time je potvrđena pretpostavka kako ovaj soj ima veliki potencijal u suzbijanju navedenog fitopatogena. Daljna *in vivo* istraživanja trebala bi potvrditi rezultate ovog *in vitro* pokusa.

Prema dostupnim podacima vrlo je malo istraživanja o antagonističkom utjecaju *Trichoderma* sp. na *R. fascians*. Balsz i sur. (2023.) su izolirali peptaibole iz različitih vrsta roda *Trichoderma* te ih ispitali na različitim gram pozitivnim i gram negativnom fitopatogenim bakterijama. Istraživanju je utvrđeno kako *R. fascians* ne pokazuje značajnu osjetljivost, osim za ekstrakte peptaibola iz *Trichoderma saturnisporum* i *Trichoderma effusum* gdje je utvrđena minimalna inhibotna koncentracija od 0,12 mg ml<sup>-1</sup>. Autori navode kako brojne *Rhodococcus* vrste mogu proizvoditi biosurfaktantne spojeva koji mogu oslabiti prodiranje u staničnu stijenku i sposobnost stvaranja ionskih kanala peptaibola što može objasniti nisku osjetljivost na peptaibol.

Učinak *Trichoderme harzianum* soja KABOFT4 na suzbijanje gram-pozitivne fitopatogene bakterije *Clavibacter michiganensis* subsp. *Mmchiganensis* koja uzrokuje bakterijsko venuće, proveli su Abo-Elyousr i Almasoudi (2021.) u zatvorenome načinu uzgajanja (stakleniku). Sadnice rajčice tretirane su folijarno sojem KABOFT4, kao i tlo u kojem su posađene. Biljke rajčice koje su tretirane folijarno pokazale su 40% posto manju zarazu od biljaka koje nisu bile tretirane. Uz smanjenje zaraze, biljke tretirane sojem KABOFT4 sadržavale su veću količinu fenola i flavonoida, bolji rast i veću akumulaciju suhe tvari. Uz tretiranje biljke, tretirano je i sjeme rajčice koje je pokazalo 82% veću klijavost, u odnosu na zaraženo sjeme koje je imalo 60% klijavosti (Abo-Elyousr i Almasoudi, 2021.).

Prema ovome istraživanju i navedenim literaturnim podacima, uspješnost antagonističkog djelovanja roda *Trichoderma* ovisiti će o osobinama samog soja, ali i o osobinama fitopatogenih bakterije koje imaju različitu građu stanične stijenke i različitu virulentnost.

#### 4. ZAKLJUČAK

Intenzivna kemizacija i neoprezna primjena agrokemikalija, direktno ili indirektno izlaganje i akumulacija veće količine štetnih kemijskih tvari u ljudskom i životinjskom organizmu može štetno djelovati, a u najgoremu slučaju dovesti i do trovanja i smrti. Intenzivna primjena kemijskih sredstava u suzbijanju biljnoga patogena može dovesti do pojave rezistentnosti i smanjenja učinka djelovanja sredstva. Primjenom bioloških preparata u zaštiti bilja, bilo bi smanjeno degradiranje tla i brojna zagađivanja, vode i općenito okoliša u kojem živimo. Smanjenje apliciranja kemijskih pesticida i prelazak na uporabu biopesticida omogućilo bi nam ponovno suzbijanje štetnih i patogenih organizama koji su stvorili rezistentnost prema mehanizmima djelovanja kemijskih pesticida. U ovom istraživanju je utvrđeno kako *P. syringae* pokazuje veliku rezistentnost prema rodu *Trichoderma*, dok *R. fascians* pokazuje visoku osjetljivost. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi za cilja imala izolaciju i identifikaciju još učinkovitijih sojeva roda *Trichoderma*.

## 5. POPIS LITERATURE

1. Agrios G. N., (2005.): Plant pathology. Academic Press, 175-205.
2. Abo-Elyousr K.A.M., Almasoudi N. (2021.): Application of *Trichoderma harzianum* Strain KABOFT4 for management of tomato bacterial wilt under greenhouse conditions. *Gesunde Pflanzen*,74. 1-9.
3. Aguilar-Marcelino L., Mendoza-de-Gives P., Al-Ani LKT., López-Arellano ME., Gómez-Rodríguez O., Villar-Luna E., Reyes-Guerrero DE. (2020.): Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. Academic Press, 333-349.
4. Arnold, D., Preston, G., (2019.): *Pseudomonas syringae*: enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiology*, 165(3), 251-253.
5. Ashorpour M., Niknejad Kazempour M., Ramezanie M., (2008.): Bacterial canker of olives caused by of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 128-131.
6. Buttimer C., McAuliffe O., Ross P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A., (2017.): Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology* 8(34).
7. Balázs D., Marik T., Szekeres A., Vágvölgyi C., Kredics L, Tyagi C., (2023.): Structure-activity correlations for peptaibols obtained from clade Longibrachiatum of *Trichoderma*: A combined experimental and computational approach. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 1860-1873.
8. Barman S., Shankar Gorai P., Chandra Mandal N., (2021.): *Trichoderma spp.*— Application and future prospects in agricultural industry. *Recent Advancement in Microbial Biotechnology*,49-70.
9. Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P., (2015.): Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(1), 1–43.
10. Cornelis K, Ritsema T, Nijse J, Holsters M, Goethals K, Jaziri M., (2001.): The plant pathogen *Rhodococcus fascians* colonizes the exterior and interior of the aerial parts of plants. *Mol Plant Microbe Interact* 14(5), 599-608.
11. Cameron A., Sarojini V., (2014.): *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathology* 63.

12. CLSI (2012) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI Document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 32(1).
13. Chugh, J. K., Wallace, B. A. (2001.): Peptaibols: models for ion channels. *Biochemical Society transactions*, 29(4), 565–570.
14. Farooqi, Z. U., Kareem A., Ayub M., Hussain M.M., Zeeshan N., Shehzad M., (2020.): Use of pesticides in agriculture: Impacts on soil, plant, and human health, 59-61.
15. Geng X., Cheng J., Gangadharan A., Mackey D., (2012.): The coronatine toxin of *Pseudomonas syringae* is a multifunctional suppressor of Arabidopsis defense. *The Plant cell*, 24(11) 4763–4774.
16. Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., Guttman, D. S., (2005.): Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5182–5191.
17. Hill, R., Stark, C., Cummings, N., Elmer P., Hoyte S., (2015.): Use of beneficial microorganisms and elicitors for control of *Pseudomonas syringae* *pv.* *actinidiae* in kiwifruit (*actinidia* *spp.*). *Acta Horticulturae*, 137-146.
18. Ivić, D., (2019.): Bakterijske i virusne bolesti rajčice i paprike u Hrvatskoj, *Glasnik Zaštite Bilja*, 42(3), str. 36-42.
19. Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V., (2021): An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants*, 10(6), 1185.
20. Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., Singh, H. B. (2014.): Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* *spp.* *Applied microbiology and biotechnology*, 98(2), 533–544.
21. Križanac I., Plavec J., Cvjetković B., (2016.): *Glasilo biljne zaštite* 16(3), 301- 302.
22. Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., Xie, B., (2020.): Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* *spp.* against Phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms*, 8(3), 401.
23. Kosalec, I., i Pepeljnjak, S. (2004.): Kemizam i biološki učinci gliotoksina. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 55(4), str. 313-320.
24. Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S. (2008): Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science*, 9(10), 753–763.



25. Khanh, T. D., Xuan, T. D. (2018.): Association and expression of virulence from plasmids of the group b strain in *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*. *Pathogens*, 7(2), 41.
26. Lambert P., Molina E., Stamler R., Fichtner E., Vereecke D., Randall J., (2016): Investigating motility and persistence of PBTS *Rhodococcus* spp. *Phytopathology* 106(12).
27. Morán-Diez M. E., Tranque E., Bettiol W., Monte E., Hermosa R., (2020.): Differential response of tomato plants to the application of three trichoderma species when evaluating the control of *Pseudomonas syringae* populations. *Plants*, 9(5), 626.
28. Nazari M.T., Simon V, Machado B.S., Crestani L., Marchezi G., Concolato G., Ferrari V., Colla L.M., Piccin JS., (2022.): *Rhodococcus*: A promising genus of actinomycetes for the bioremediation of organic and inorganic contaminants. *Journal of Environmental Management*, 323.
29. Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shashkov A.S., (2011.): 6 - cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of gram-positive bacteria. *Methods in Microbiology*, 38, 131-164.
30. Park, J.M., Koo, J., Kang, S. W., Jo, S. H., Park, J.M. (2021). Detection of *Rhodococcus fascians*, the causative agent of lily fasciation in South Korea. *Pathogens*, 10(2), 241.
31. Putnam, M.L., Miller, M.L. (2007): *Rhodococcus fascians* in Herbaceous Perennials. *Plant disease*, 91(9), 1064–1076.
32. Pradhan S., Mailapalli D., (2020.): Nanopesticides for pest control. *Sustainable Agriculture Reviews* 40, 43-74.
33. Ramachander Turaga, V.N. (2020.): Peptaibols: Antimicrobial Peptides from Fungi. *Bioactive natural products in drug discovery*, 713-730.
34. Rodríguez-Moreno L., Jiménez A. J., Ramos C., (2009.): Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microbial biotechnology*, 2(4), 476–488.
35. Rupa, D. S., Reddy, P. P., Reddi, O. S. (1991): Reproductive performance in population exposed to pesticides in cotton fields in India. *Environmental research*, 55(2), 123–128.
36. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010.): The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5).

37. Sawada, H., Takeuchi, T., Matsuda, I., (1997.): Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (argK) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Applied and environmental microbiology*, 63(1), 282–288.
38. Stes E., Vandeputte O.M., El Jaziri M., Holsters M., Vereecke D., (2011.): A successful bacterial coup d'état: How *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annual Review of Phytopathology* 49(1), 69-86.
39. Schuster, A., Schmoll, M. (2010.): Biology and biotechnology of Trichoderma. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787–799.
40. Singh A.K., Shahid, M., Srivastava M., Sonika P., Ey, Sharma, A., Kumar V. (2013.): Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology & Mycology*, 3, 1-7.
41. Silva R.N., Steindorff A.S., Monteiro V.S., (2014): Metabolic diversity of *Trichoderma*. *Biotechnology and biology of Trichoderma*, 363-376.
42. Sowmiya C., Sankarganesh E., (2019.): Pesticide resistance and its management in insect pests. *Agrobios Newslettter*, 8. 82-83.
43. Tyśkiewicz R., Nowak A., Ozimek E., Jaroszuk-Ściseł J., (2016.): *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329.
44. Tampakaki A.P., Hatziloukas E., Panopoulos N.J., (2009.): Plant Pathogens Bacterial. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, 655-677.
45. Vereecke D., Burssens S., Simón-Mateo C., Inzé D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M., (2000.): The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* 210(2) 241-51.
46. Xin XF., Kvitko B., He, S., (2018.): *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* 16, 316–328.
47. Yao X., Guo H., Zhang K., Zhao M., Ruan J., Chen J., (2023.): *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in microbiology* 14, 1160551.
48. Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2003.): Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

- in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Applied and environmental microbiology, 69(12), 7343–7353.
49. Zhang Y.Q., Zhang S., Sun ML., Su HN., Li HY., Kun-Liu, Zhang YZ., Chen XL., Cao HY., Song XY., (2022.): Antibacterial activity of peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum* SMF2 against gram-negative *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causal agent of bacterial leaf blight on rice. Frontiers in microbiology 13:1034779.
50. Znaor D., 1996., Ekološka poljoprivreda, Nakladni zavod Globus, Zagreb, 469, 211-218.

### **Mrežni izvori:**

1. <https://www.canr.msu.edu/grapes/uploads/images/pesticResist.gif> (31.8.2023.)
2. [https://www.researchgate.net/publication/339216512\\_Nanopesticides\\_for\\_Pest\\_Control](https://www.researchgate.net/publication/339216512_Nanopesticides_for_Pest_Control) (31.8.2023.)
3. [https://www.adelaide.edu.au/mycology/sites/default/files/styles/ua\\_image\\_landscape/public/media/images/2021-09/trichoderma.jpg?h=11824060&itok=81Z\\_GAOJ](https://www.adelaide.edu.au/mycology/sites/default/files/styles/ua_image_landscape/public/media/images/2021-09/trichoderma.jpg?h=11824060&itok=81Z_GAOJ) (27.8.2023.)
4. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs00253-013-5344-5&psig=AOvVaw2m5QBM5XgfIPpEyIfVIFo&ust=1694079219201000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBAQjRxqFwoTCOin84LXIYEDFQAAAdAAAAABAE> (24.8.2023.)
5. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/75/Rhodococcus\\_fascians.jp](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/75/Rhodococcus_fascians.jp) (21.7.2023.)
6. [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pseudomonas\\_syringae\\_SEM.jpg](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pseudomonas_syringae_SEM.jpg) (21.7.2023.)
7. <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5606052> (28.8.2023.)
8. <https://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5602270> (28.8.2023.)