

# Učinkovitost suzbijanja patogenih bakterija roda *Pseudomonas* primjenom benefitne gljive *Trichoderma viride* u laboratorijskim uvjetima

---

Cerovac, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*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:151:895653>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-18**



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 U OSIJEKU

Tena Cerovac

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

**UČINKOVITOST SUZBIJANJA PATOGENIH BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS*  
PRIMJENOM BENEFITNE GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE* U LABORATORIJSKIM  
UVJETIMA**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tena Cerovac

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

**UČINKOVITOST SUZBIJANJA PATOGENIH BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS*  
PRIMJENOM BENEFITNE GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE* U LABORATORIJSKIM  
UVJETIMA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Dr.sc. Jurica Jović, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Doc.dr.sc. Sanda Rašić, član

Osijek, 2019.

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE .....  | 3  |
| 2.1. Patogene vrste roda <i>Pseudomonas</i> .....  | 3  |
| 2.1.1. <i>Pseudomonas syringae</i> .....   | 4  |
| 2.1.2 <i>Pseudomonas solanacerum</i> / <i>Ralstonia solanacearum</i> .....   | 9  |
| 2.1.3 <i>Pseudomonas savastanoi</i> .....  | 12 |
| 3. Rod <i>Trichoderma</i> spp.....   | 14 |
| 3.1 Sekundarni metaboliti gljivice roda <i>Trichoderma</i> spp.....  | 17 |
| 3.2 <i>Trichoderma viride</i> .....  | 20 |
| 4. SUZBIJANJE PATOGENE BAKTERIJE RODA <i>PSEUDOMONAS</i> PRIMJENOM<br>BENEFITNE GLJIVE <i>TRICHODERMA VIRIDE</i> ..... | 22 |
| 5. ZAKLJUČAK.....  | 24 |
| 6. LITERATURA .....  | 25 |
| 7. SAŽETAK.....  | 29 |
| 8. SUMMARY .....   | 30 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....  | 32 |
| BASIC DOCUMENTATION CARD.....  | 33 |

## 1. UVOD

Biljke predstavljaju bogat izvor nutrijenata za mnoge patogene te su, kako bi se obranile od njih, razvile sofisticirane mehanizme obrane. Ishod interakcije između biljaka i patogena jeznačajan i za čovjeka, koji ovisi o biljkama za hranu, jer u rastućoj ljudskoj populaciji hrana nam je sve više potrebna. Glavni izazovi s kojima će se u narednim desetljećima suočiti svjetska poljoprivreda su proizvodnja 70% više hrane za rastuću svjetsku populaciju, učinkovitije korištenje rijetkih prirodnih resursa i prilagodba klimatskim promjenama (FAO, 2009).

Zaraza biljaka patogenima predstavlja veliki problem jer onemogućuje postizanje visokih prinosa i optimalne kvalitete poljoprivrednih kultura. Danas je poznat veliki broj biljnih patogena (virusi, bakterije, gljive, viroidi, nematode i oomicete), a procjenjuje se da bolesti uzrokovane navedenim patogenima godišnje u svijetu uzrokuju gubitke od 40 milijardi dolara (Syed Ab Rahman i sur., 2018).

Kako bi zaštitili našu opskrbu hranom moramo prvenstveno shvatiti načine kojim se biljke brane od raznih patogenai kako bi razvili visoko otporne biljne vrste. Upravo iz tog razloga su znanstvenici posvetili pažnju otkrivanju proteina i gena otpornosti koji sudjeluju u mehanizmima obrane biljaka, i upravo nam ta saznanja pomažu u sprječavanju negativnih učinaka koji su rezultat djelovanja patogenih bakterija u biljci.

Biljke ne mogu izbjeći ekološke izazove, stoga se kod njih javlja biotički stres koji je rezultat potencijalnih patogena kao što su bakterija, nematoda, gljiva ili insekti koji sprječavaju fotosintezu i virusa koji se na račun domaćina repliciraju. Iz tog su razloga biljke razvile mehanizme koji otkrivaju prisutnost patogena dok su patogeni razvili efektorske proteine koji mogu potisnuti obrambene odgovore domaćina.

Patogeni konstantno razvijaju otpornost na postojeće biljne gene otpornosti isto tako i na pesticide i druge kemikalije kojima se biljni usjevi tretiraju. Često razviju mehanizme kojima nadvladaju biljni obrambeni sustav, što rezultira njihovom kolonizacijom biljke. Tada zaražene biljne vrste postaju domaćini patogenu. Unatoč tome, tijekom evolucije neki su kultivari razvili mehanizme prepoznavanja određenih sojevaili vrsta patogena, i u skladu s tim proizveli učinkovite odgovore koji vode ka specifičnojotpornosti određenog kultivara ili vrste (Hammond-Kosack i Jones, 1996).

U interakciji s biljkama veći dio mikroorganizama izaziva bolesti, s druge strane biljke su otporne na većinu patogena. Biljke su u stalnom doticaju sa patogenima, ali bolesti su rijetke stoga tu otpornost biljaka se naziva i otpornost širokog spektra. Na pitanje zašto bi biljke bile neprikladne kao domaćin postoje brojna objašnjenja. Kao prvo, biljke nisu u mogućnosti podržati okupatorski način života i s toga nisu dobar supstrat za njihov rast i razvoj. Konstitutivne barijerne sprječavaju invaziju i širenje patogena i prepoznavanjem patogena koji biljku napada aktivira se višekomponentni obrambeni sustav biljke (Hammond-Kosack, 1996).

U ovom radu ćemo više pažnje posvetiti samo jednoj vrsti patogena, a to su patogene bakterije roda *Pseudomonas*. Bakterije roda *Pseudomonas* pripadaju najzastupljenijim rodovima pronađenih u rizosferi mnogih biljaka, uz bakterije roda *Bacillus* i *Streptomyces*, (Sharma,2014) stoga ne čudi kako se upravo ove bakterije koriste u biološkoj kontroli. Patogenih bakterija roda *Pseudomonas* ima preko 190 vrsti koje se najčešće nalaze u što toplijim i vlažnijim mjestima što im, naravno, omogućuje razmnožavanje. Bakterije iz roda *Pseudomonas* su gram-negativni, aerobni, nefermentativni, pokretni, i oksidaza-pozitivni bacili duljine 1,5-5  $\mu\text{m}$  i širine 0,5-1  $\mu\text{m}$ . Mogu se pojavljivati pojedinačno, u parovima ili su složeni jedan pored drugoga. Karakteristika ove bakterije su kolonije koje su bijele boje i parazitiraju uglavnom podzemne organe ili tkiva u unutrašnjosti domaćina. *Pseudomonas* i druge srodne nefermentativne bakterije čine složenu skupinu oportunističkih patogena ljudi, životinja i biljaka prisutnih u svim medijima poput tla, vode, vegetacije i materijalu nastalom organskim raspadom.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Patogene vrste roda *Pseudomonas*

Bolesti koje uzrokuju bakterije, bakterioze, različite su po svome djelovanju na određenu kulturu: trulež korijena i mrlje, izrasline i tumori.

Bakterije roda *Pseudomonas* uzrokuju truljenje korijena i rak. Znaci bolesti mogu se vidjeti na svim dobro vidljivim dijelovima stabala: na granama, listovima, deblu, plodovima.

Morfologija:

Stanice su ravne šipke bez kapsule, veličine 0.3-0.5 x 0.8-2.5  $\mu\text{m}$ , a pokreću se pomoću 1-4 polarne flagele. Bakterioze na krumpiru razvijaju se sporo i postaju vidljive tek nakon dva ili tri dana. Bakterioze (kolonije) su bijele, ispravno zaobljene te okružene uskim polu providnim rubom. Površina im je sjajna, rub glatak. Temperatura rasta je od 25 do 35 °C.

Na stablu šljive (trup i grana) bakterioze tvore rak ili ravnu površinu često s pukotinama. Listovi šljive postaju blijedo zelene boje sa primjesama žutosti i najčešće se suše. Konačni ishod je smrt stabla.

Kod marelice lišće uslijed bakterioze dobivaju oblik opeklina a na trešnji dolazi do gubitka tkiva lista te je taj predio žućkaste boje. I kod marelice i trešnje dolazi do oštećenja pupova i cvatova koji se na kraju suše i umiru. Sve ovo navedeno ovisi i o osjetljivosti biljke i o čimbenicima okoliša. Na primjer, bakterioza krastavca u staklenci se razvija samo ukoliko ima vlage u tekućini i ako je temperatura zraka od 19 do 24 °C. Ukoliko prozračujemo staklenku i temperatura se podiže iznad 24 °C moguće je i zaustaviti razvoj bolesti.

Bakterije prodiru kroz biljke na razne načine: kroz puževe putem lišća, nektar cvijeća, pore u lišću i slično. Razvoj bakterioze podupire i nedostatak fosfora i kalija, visoki pH tla, te prisutnost vodenih kapljica.

Najčešći izvor infekcija su sjemenke. Sjeme kad klija može zaraziti sadnice te putovati kroz biljke i zaraziti odrasle biljke tijekom vegetacije. Također oboljelo sjeme može širiti infekciju i doći na područja gdje prije nije bilo. Još jedan od primjera su reznice zelene biljke gdje je bakterija sačuvana i prenesena na potpuno novo područje. Dakle jedan od glavnih izvora infekcije su ostaci oboljelih biljaka puno više nego npr. tlo koje nije jako opasno.

Istraživanja su pokazala da bakterije koje ulaze u tlo brzo umiru jer dolazi do samočišćenja tla.

Osim oboljelih biljaka neke vrste kukaca mogu biti izvor infekcije, a najveći dio opasnosti su kapljice kiše s ostacima čestica oboljelih biljaka. Na taj način (vjetrom i zračnim strujama) bakterioze se mogu prenositi na velike udaljenosti.

Hiperplastična bakterioza je bolest povezana s rastom tkiva. Ova skupina bakterija uzrokuje ubranu slučajnu staničnu diobu popraćenu i povećanjem veličine pri čemu nastaju tumori koji se nalaze u mnogim drvenastim biljkama.

Najvažnije vrste patogenih bakterija roda *Pseudomonas*:

- Bakterijski rak trešnje i višnje ( *Pseudomonas syringae* )
- Rak rajčice, krumpira i duhana ( *Pseudomonas solanacearum* ili *Ralstonia solanacearum* )
- Rak jasena ( *Pseudomonas fraxini* )
- Poprečni rak hrastovog debla ( *Pseudomonas quercus* )
- Tuberkuloza maslina ( *Pseudomonas savastanoi* )

### **2.1.1. *Pseudomonas syringae***

Domen: *Bacteria*

Tip: *Proteobacteriaceae*

Klasa III: *Gammaproteobacteria*

Porodica: *Pseudomonadaceae*

Rod: *Pseudomonas*

Bakteriju *Pseudomonas syringae* prvi je put opisao van Hall u Nizozemskoj 1902. godine na jorgovanu ( *Syringavulgaris* L.) po čemu je dobila i ime. Prva istraživanja, prema literaturi, vezane za bakterioze košticevinih voćaka potiču iz 19. stoljeća u Europi.

Biljni patogen širokog kruga domaćina koji uključuje tatarske, povrtarske i ukrasne biljke i voćke. Ova bakterija čini sve veće štete, te je do sada potvrđen kao parazit kruške, trešnje, kajsije, višnje, šljive i maline.



Kao patogenom voćaka *Pseudomonas syringae* se smatra ekonomski štetnom u cijelom svijetu jer je dosta rasprostranjena. Prema patogenu najosjetljivijom vrstom pokazale su se kajsija, trešnja, kruška i višnja. (Arsenijević, 1997; Sobiczewski, 1984; Sobiczewski and Jones, 1992; Scortichini, 2003)

Ova bakterija je heterogena grupa koju čini oko 57 patogenih varijeteta (Gardan et al., 1997). Prema produkciji različitih fitotoksina moguće je lako, a opet pouzdano utvrditi detekciju gena odgovornih za produkciju pojedinih toksina. Na taj način ćemo utvrditi o kojoj se točno patogenoj varijaciji radi iako dva različita patogena mogu izazvati slična oboljenja na istim biljkama npr. patogen *syringae* i *morsprunorum* koji izazivaju rak rane na drvenastim dijelovima koštičavog voća (Bultreys i Gheysen 1999.god.).

*Pseudomonas syringae* izlučuje fitotoksine syringomicin, siringotoksin i siringostatin kao sporedne produkte metabolizma a koji djeluju otrovno na široki spektar različitih biljaka (Bultreys i Gheysen 1999.god.) U Hrvatskoj *Pseudomonas syringae* najveće šteta radi u voćnjacima, maslinicima. Višnje i trešnje se u Hrvatskoj uzgajaju na nešto više od 3500 ha, a urod je oscilirao od 10825 do 16980 tona u razdoblju od 2010. do 2014. godine (Anonim 2015). nepovoljne klimatske prilike i napadi štetnih organizama utjecale su na neujednačenost uroda što je doveo do smanjenog uroda (Vončina i sur. 2014).



Slika 1. Shematski prikaz životnog ciklusa bakterije *Pseudomonas syringae*

Izvor: Miličević, Glasilo biljne zaštite

Bakterijski rak trešnje uzrokuju dva patovara bakterije *Pseudomonas syringae*: pv. *syringae* van Hall i pv. *morsprunorum* (Wormald) Young et al. Oba patogena varijeteta uzrokuju slične simptome koji mogu varirati ovisno o virulentnosti soja, vremenu infekcije, starosti stabla i osjetljivosti kultivara. Jače zaraze su često povezane s duljim hladnim i vlažnim razdobljima, kasnim proljetnim mrazovima ili olujnom kišom koja oštećuje cvat i listove. Bolest se češće javlja na teškim zbitim tlima, koja nisu idealna za uzgoj koštićavih voćaka, a i na tlima s nedostatkom kalija. Da bi se sa sigurnošću identificirala vrsta i patogeni varijetet bakterije, potrebno je koristiti više metoda i kombinirati njihove rezultate da bi se postavila konačna dijagnoza.

Najčešće se koriste klasične mikrobiološke tehnike (uzgoj bakterijske kulture na hranjivoj ili selektivnoj podlozi, biokemijski i nutritivni testovi) u kombinaciji s brzim serološkim ili molekularnim metodama i testom patogenosti.

Süle i Seemüller (1987) navode *P.syringae* kao bakteriju koja je glavni uzročnik pjegavosti lista višnje. Tijekom proljetnih mjeseci na mladim listovima ova bakterija dovodi do velikih ekonomskih šteta jer je uzročnik prijevremenog opadanja lišća.

*Pseudomonas syringae* jest Gram-negativna bakterija koja pripada rodu *Pseudomonas sensu stricto* u  $\gamma$  podrazredu proteobakterija. Jedna je od najvažnijih fitopatogenih bakterija, velike raznolikosti, širokoga kruga biljaka domaćina koji uključuje brojne vrste voćaka, povrća i ukrasnoga bilja. Bakterija je aerobna, štapičasta i pokreće se spomoću jednog ili nekoliko polarnih bičeva.

Simptomi bolesti mogu se pojaviti na gotovo svim vidljivim dijelovima stabla: izbojcima, granama, deblu, listovima i plodovima. Simptomi ovise o sorti, starosti stabla, soju bakterije i drugim čimbenicima. Rak-rane mogu nastati na stablu i granama. Najčešće nastaju na mladicama, i to na mjestu na kojem je cvjetna stapka pričvršćena za izbojak. Na mjestu infekcije kora zaraženih mladica i grana puca i nastaju rak-rane. Na mjestu rak-rana pojavljuje se smola kao reakcija tkiva na prisutnost patogena (slika 2) dok provodno tkivo ispod kore mijenja boju i nastaje nekroza floema.



Slika 2. Smola iznad rak rane

Izvor: Miličević, Glasilo biljne zaštite



Slika 3. Bakterijski rak trešnje

Izvor: Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo

Glavni simptomi koji pokazuju da je biljka zaražena bakterijom *Pseudomonas syringae*:

- Cvijet i/ili cvijetni pupoljak promjeni boju iz smeđe u crnu
- Mrtvu pupoljci, česti na trešnjama i marelicama
- Nekrotične mrlje na listovima
- Bezojne i/ili pocrnjelevene listova i peteljke proizlaze iz infekcije
- Pojavljuju se točke i mjehurići/plikovi na voću
- Rak stabljike, zaražena područja na kori koja tamni s godinama. Gljivična supstanca često izlazi iz čireva na plodonosne i svjetajuće plodove. Ako se čirevi nastave povećavati, napadaju cijelu stabljiku i tako dolaze do grane i cijele biljke i ubijaju je. Ako se vanjska tkiva čirovitih područja odrežu, tkivo ispod njih pokazuje crvenkasto-smeđu boju, ova promjena boje može se pojaviti i kao vertikalne pruge u vaskularnom tkivu.

### 2.1.2 *Pseudomonas solanacerum* / *Ralstonia solanacearum*

Domen: *Bacteria*

Porodica: *Burkholderiales*

Klasa: *Betaproteobacteria*

Viša klasifikacija: *Pseudomonas*

Tip: *Proteobacteriaceae*

*Ralstonia solanacerum*, znana kao, *Pseudomonas solanacerum* prvenstveno je bila opisana od strane Smith (1896.) kao uzročnik bakterijskog uvenuća biljke pomoćnice (*solanaceus*). Bakterija je ubrzo postala jedna od vodećih patogenih bakterija koje napadaju biljke, a njezina rasprostranjenost se proteže od Europe pa do Sjeverne Amerike.

Bakterijsko venuće rajčice i trulež gomolja koje se manifestira smeđom bojom uzrokuje bakterija imenom *Ralstonia solanacerum* (Smith) Yabucchi et.al. Problem kod te bakterije je što nisu vidljivi simptomi zaraze. Najčešće se prenosi gomoljem sjemenskog krumpira, a širi se i kontaminiranom vodom za navodnjavanje. Temperature od min 15°C pa sve do 35 °C uz veliku vlažnost tla su uvjeti najpogodniji za razvoj bakterije.

Unutar vrste poznate su 3 rase od kojih krumpir i rajčicu uglavnom napada treća rasa. Rasa 1 i 2 patogene su za banane i duhan. Rasa 3 se prilagodila nižim temperaturama te je 90-tih godina zabilježena u mnogim europskim zemljama pa tako i u Hrvatskoj. Ova bakterija ulazi u biljku kroz rane na stabljici ili korijenu, a širi se unutar biljke provodnim snopovima koji se povećavanjem temperature ubrzavaju. S obzirom da bakterija začepљуje te snopove dolazi do uvenuća biljke. Na zaraženim gomoljima krumpira se može primijetiti sluzav i ljepljiv iscjedak. Ukoliko prerežemo zaraženi gomolj biti će nam vidljiv smeđi prsten do kojeg je došlo zbog nekroza provodnih snopova. Slične simptome na gomoljima može uzrokovati i herbicidi ali i neke gljivice (*Fusarium* spp, *Verticilium* spp.).

S obzirom da je bakterija polifagna na taj način može živjeti kao parazit na oko 200 domaćina. Osim krumpira napada i rajčicu, papriku i patliđan. Ostali važniji domaćini mogu

biti ukrasne vrste iz roda *Pelargonium* te korovne vrste *Solanum* (npr. *Solanumdelcamara* i *Solanumnigrum*). Ovu bakteriju je jako teško iskorijeniti upravo zbog načina širenja bolesti i velikog broja domaćina.

Sjemenski krumpir ni slučajno ne smije potjecati iz zaraženih područja. U Hrvatskoj se kontinuirano kontrolira upravo iz tog razloga uvoz sjemenskog i merkantilnog krumpira.

Nakon pojave bolesti mjera zaštite ne postoje osim uništavanja zaražene biljke, te zabrane sadnje biljke domaćina te bakterija na površinama gdje je bakterija mogla ostati prisutna u tlu.

Postoji Pravilnik o provođenju sustavnog istraživanja i mjera za sprječavanje širenja i suzbijanja smeđe truleži gomolja krompira i bakterijskog venuća krumpira i rajčice koju prouzrokuje bakterija *Ralstonia solanaceum* (Smith) Yabuuchi et.al. (Narodne novine 119/06).

## KRUMPIR

Prvi vidljivi simptomi na gornjem dijelu krumpira se vidi pred cvatnju i u vrijeme cvatnje kada lišće počinje mijenjati boju; postaje žuto i gubi turgor (unutarnju napetost stanice). Gubitak turgora se najviše vidi za najtoplijih dnevnih sati, dok se tijekom noći biljke oporave ali jedno kratko vrijeme, nakon nekog vremena ipak propadnu.

Donji dio (nadzemni) krumpira posmeđi a prilikom stiska iz njega izlazi sluzavi iscjedak. Ovo ćemo najbolje vidjeti ukoliko odrežemo dio stabljike i stavimo okomito u posudu s vodom. Bakterija začepљуje provodne snopove i dolazi do venuće biljke. Na zaraženim gomoljima krumpira se može primijetiti sluzav i ljepljiv iscjedak na kojeg se vežu čestice zemlje i prašine što katkada može maskirati zarazu. Izvana gomolj može izgledati potpuno zdravo a tek presječeno će se vidjeti smeđi prsten.

Neke gljive (*Fusarium* spp i *Verticilium* spp.) kao i herbicidi i fiziološke promjene također mogu uzrokovati promjene u boji provodnih snopova ali ne i pojavu sluzi. Da je krumpir napadnut ovom bakterijom znamo po pojavi sluzi. Ako je gomolj zaražen vidimo na presjeku promjenu boje. Isto tako stavimo li zaraženi gomolj u komoru sa visokom vlagom na vrijeme

od 24-48 sati pojavit će se žućkasti iscjedak. Sadnja ovakvog gomolja ne daje novu biljku. Gomolj će istrnuti ali će doći do kontaminacije tla. U rijetkim slučajevima takav gomolj će se razviti u biljku koja će također biti zaražena.



Slika 4. Štete na krumpiru uzrokovane *Ralstonia solanacearum*

Izvor: <http://pinova.hr/media/>

## RAJČICA

Prve simptome bolesti vidjet ćemo pri kraju cvatnje na najmlađem lišću koje vene i propada. U vrijeme kada je temperatura tla oko 25°C i velika vlažnost biljka počne venuti s jedne ili obje strane te u roku nekoliko dana potpuno propadne. Ukoliko je temperatura tla niža od 21°C na stabljici se može razviti čupavo tj. adventivno korijenje. Provodno tkivo u stabljici poprima smeđu boju, a ukoliko je prerežemo vidljive su kapljice bijele i žućkaste bakterijske sluzi.



Slika 5. štete na listovima i stabljici rajčice uzrokovane *Ralstonia solanacearum*

Izvor: <http://pinova.hr/media/>

### 2.1.3 *Pseudomonas savastanoi*

Domen: *Bacteria*

Red: *Pseudomonadales*

Obitelj: *Pseudomonadaceae*

Viša klasifikacija: *Pseudomonas*

Ova patogena bakterija uzrokuje rak masline, bolest koja je kod nas proširena i prisutna je u svim zemljama koje uzgajaju masline. Bolest se prvi put opisala u četvrtom stoljeću prije nove ere (Teofrast). Patogenost uzročnika dokazao je L. Savastano 1886-1889 pa komu je bakterija dobila atribut „*savastanoi*“. Bakterija koja uzrokuje rak masline je mijenjala nazive od *Bacterium savastanoi*, *Pseudomonas savatanoi*, *Pseudomonas syringae* pv. *svastanoi*, *P. s. subsp. savastanoi* i na kraju *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. U tu vrstu ubrajaju se patovari *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. savastanoi* pv. *glycinea* i *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (Gardan i sur.1992).

*Pseudomonas savastanoi* je jedna od gram-negativnih bakterija, aerobna je bakterija te je veličine  $0.4-0.8 \times 1.0-3.0 \mu\text{m}$ . Temperature optimalne za razvoj ove bakterije su 25-30°C.

Bakterija izlučuje indol octenu kiselinu i citokinin (Surico i sur.1985), što kod sporednih ne inficiranih stanica utječe na povećanje njihovih dimenzija i abnormalnu diobu. Istovremeno dolazi do diferencijacije stanica u ksilemskih i floemskih elemenata (Marchi i sur.2009). Posljedica takvog djelovanja su tumoraste izrasline.

Ono što je značajno kod ove bakterije je da među sortama postoje razlike u osjetljivosti, dokazano je da ista sorta pokazuje drugačija oboljenja na raznim lokacijama. Na pojavu bolesti utječe: sortna osjetljivost, klimatski čimbenici, numerički prag infekcije, mehanička oštećenja. Na cjelokupan razvoj stabala utječu zaraze, dok na kvalitetu plodova i urod utječe broj tumorastih izraslina na biljci ali i postotak osušenih grana i izboja. Zaraženi plodovi imaju kisel, slan ili užegao okus, dok je zaraza korijena rijetka. Kad dođe do takvog slučaja biljka slabo napreduje što se odražava na kakvoću plodova.



Značajne štete mogu nastati u rasadniku, kada se tumori pojave na mjestu cijepa ili u njegovoj neposrednoj blizini. Kod jakih zaraza u rasadniku prirast je manji, a može doći i do sušenja mladica (Kačić i sur. 1994.).

Simptomi bolesti se pojavljuju na nadzemnim dijelovima biljke: listu, cvijetu, peteljci ploda, plodu, granama, deblu i korijenu. Na deblu i granama, nakon što dođe do infekcije, možemo vidjeti plitko udubljenje koje je nastalo zbog kolapsa napadnutih stanica.

Zbog bujanja tkiva nastaju pojedinačne ili čak u skupinama okruglaste kvržice promjera nekoliko milimetara, koje se katkad formiraju u skupinama jedna do druge duž grane. U početku su kvržice svjetlo zelene boje, glatke površine i ne jako tvrde. Starenjem kvržice postaju hrapavije, na njima nastaju duboke bore i pukotine. Porastom kvržice poprimaju smeđu boju postaju drvenaste, s izraženim šupljinama. Kvržice se potpuno povećavaju dosežući od 3 do 5 centimetara u promjeru. Na mjestima nastanka kvržice ostaju duže vrijeme, a nakon nekog vremena ako se ne odstrane počinju se raspadati. Kora na tim mjestima raspuca cijelom dužinom na kojoj su bile rak rane, pa su grane oslabljene, a ponekad se i osuše. ( Cvjetković i Krizanac 2012).

Osim vidljivih znakova bolesti na granama i deblu, simptomi se pojavljuju i na listovima gdje možemo primjetiti bradavičaste izrasline, najčešće uz glavnu žilu i one su manje od onih na granama i deblu. Ono što se rijetko napada su plodovi, najčešće se inficira samo temeljni dio ploda na kojemu je vidljiva samo jedna ili ponekad više bradavičastih izraslina. Ako i dođe do infekcije ploda, plod raste neujednačeno i deformira se.

Za vrijeme intenzivnog porasta biljke, pri optimalnim uvjetima, inkubacija je najkraća i traje 10-14 dana. U manje povoljnim uvjetima inkubacija se može produžiti i do tri mjeseca (Ercolani 1968).

Kod jesensko- zimskih infekcija simptomi se u pravilu javljaju tek u proljeće. Bakterija očito miruje u biljci i nakon pojave prvih tumora mogu se pojaviti i sekundarni tumori na određenoj udaljenosti od primarnog tumora (Penyaler i sur. 2006). Prenosenje bakterije sjemenom nikadan nije dokazano. Petri je dokazao da bakterija *Pseudomonas savastanoi* može biti prisutna u probavnom traktu maslinine mušice (*Bactocera oleae*), kao simbiot koji pomaže u probavi. Međutim nema znanstvenih dokaza da je maslinina mušica vektor bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Quesenda i sur. 2012).



Slika 6. Bakterijski rak masline

Izvor: <https://www.semanticscholar.org/>

### 3. ROD *Trichoderma* spp.

Rod *Trichoderma* se prvi puta spominje 1794. godine kao zelena plijesan koja raste na oštećenim granama i supstratima (Persoon, 1794). vrlo je važno za znati da se radi o aseksualnoj saprofitskoj gljivi s telomorfnim stadijem koje pripadaju redu *Hypocreales* i porodici *Hypocreaceae*. Do kraja 60-ih godina se mislilo kako u rodu *Trichoderma* postoje samo dvije vrste: *Trichoderma viride* i *Trichoderma koningii*.

Većina gljivica roda *Trichoderma* morfološki je vrlo slična i dugi niz godina sve se svrstavalo pod jednu, *Trichoderma viride* (Bisby, 1939.) Kasnije je Rifai, točnije 1969.godine, opisao devet vrsta s obzirom na morfologiju konidija, karakteristike fijaspora, rasporeda fijaspora i grananja konidiofora. Nakon toga je sredinom 90-ih godina prošlog stoljeća došlo do nove klasifikacije i podjele roda *Trichoderma*, oni se dijele u rodove *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* i *Hypocreanum*. Do danas je potvrđeno i opisano preko 100 različitih vrsta. Rod *Trichoderma* je od iznimne važnosti za poljoprivredu jer pogoduju poticanjem razgradnje ostataka biljaka u tlu. Osim

toga, od iznimne je važnosti *Trichoderma reesei* jer proizvodi enzim za razgradnju celuloze, te je zbog toga zastupljena u biotehnološkoj industriji (Kubicek i Panttila, 1998).

Neki članovi roda *Trichoderma* imaju biofungicidalno djelovanje kao na primjer *T. harzianum*, *T. asperellum* itd. (Papavizas, 1985). oni djeluju po principu mikroparazitizma tijekom kojeg sintetiziraju enzime koji imaju sposobnost razgradnje stanične stijenke patogenih gljiva, također proizvode neke antibiotike, te ulaze u kompeticiju sa patogenima za prostor i hranjive tvari. Stanište ovog reda uglavnom je tlo, dok neki žive na posebnim staništima.

Benefitna svojstva gljivice roda *Trichoderma* dobro su znana preko 70 godina, ali su se tek nedavno počele koristiti u komercijalne svrhe. Gljivice ovog roda su efikasne kada su u pitanju patogene gljivice kao što su predstavnici roda: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monilla*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium* (Lumsden et al., 1993.; Monte, 2001).

Vrste roda *Trichoderma* su pokazale dobar rast na različitim temperaturama. Većina *Trichoderma* vrsti je fotoosjetljiva te proizvode konidije u razdoblju svjetlosti. Optimalna temperatura za rast kolonije je 25 - 31 °C. (Singh i sur. 2014.).

Tipično za rod *Trichoderma* su grananja nalik na drvo ili piramidu (konidiofori). Konidiofori nose kratke filijale koje rastu pojedinačno ili u grupi. Mogu biti skupljene u hrpu koju čini 10 - 20 konidija pri čemu su jednostanične, veličine od 2,5 do 4 μm grubo zrnate membrane (Kumar, 2009.).

*Trichoderma* spp. 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.).

Pozitivan učinak gljivica ovog roda na biljke predmet su brojnih znanstvenih istraživanja u kojima je istražena učinkovitosti ovih gljiva u kontroli bolesti brojnih poljoprivrednih i povrtlarskih kultura, ukrasnog bilja, te pri uzgoju voća (Harman, 2000.; Howell, 2003.; Benitez i sur., 2004.; Smolinska i sur., 2007.).



Slika 7. *Trichoderma* spp.

Izvor: <https://mycology.adelaide.edu.au/>

U većini zemalja kao glavni proizvodi za biološku kontrolu koriste upravo mikroorganizmi roda *Trichoderma*. Osim što smanjuju razvoj bolesti, stimuliraju rast biljaka, povećavaju otpornost biljaka na stres, te potiču bržu razgradnju komposta čime biljke brže dolaze do hranjivih nutrijenata (Harman, 2000.).

Prema Monte - u (2001.) korištenjem *Trichoderme* spp. reducira se upotreba kemijskih fungicida čime se povećava zdravlje biljke, te postiže čitav niz pozitivnih učinaka na okoliš u cjelini.

Primjenom u vrijeme sjetve postiže se kolonizacija površine sjemena koji supresira naseljavanje patogena na kutikulu sjemena te otežava kontaminaciju (Samuels i sur. 2006.).

Poznat je izuzeto veliki broj vrsta gljiva koje pokazuju određeno antagonističko djelovanje na različite biljne patogene. Do sada je istraženo i za komercijaliziranu primjenu iskorišteno

12 vrsta antagonističkih gljiva, kao npr.: *Candida oleophila*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Gliocladium virens* i dr. Najveću primjenu u zaštiti bilja od bolesti za sada imaju antagonističke vrste iz roda *Trichoderma*. Na slici 9. dat je prikaz komercijaliziranih bioloških pripravaka (mikofungicida) na osnovi antagonističkih gljiva te fitopatogenih gljiva koje suzbijaju (Miličević, 2006.).

| Vrsta antagonističke gljive                                  | Nazivi komercijaliziranih pripravaka                        | Biljni patogeni koje suzbijaju   |
|--|---|--|
| <i>Trichoderma harzianum</i>                                 | Root Pro, Trianum-P, Trianum-G, RootShield, Trichodex i dr. | <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Botrytis cinerea</i> i dr.                             |
| <i>Trichoderma harzianum</i> i <i>Trichoderma polysporum</i> | Binab T i dr.   | Gljive razarači drva   |
| <i>Trichoderma viride</i>                                    | Trieco i dr.  | <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Fusarium</i>  |
| <i>Trichoderma harzianum</i> i <i>Trichoderma viride</i>     | Trichopel, Trichoject, Trichodowels, Trichopseal i dr.      | <i>Armillaria spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> , i dr. |
| <i>Trichoderma spp.</i>                                      | Trichoderma 2000, Bio-Fungus i dr.                          | <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i>                               |
| <i>Trichoderma harzianum</i> i <i>Gliocladium virens</i>     | GlioGard i dr.  | <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Pythium spp.</i> i dr.  |

Slika 8. Komercijalizirani biološki pripravci na bazi antagonističkih gljiva  
Izvor: Miličević (2006.)

### 3.1 Sekundarni metaboliti gljivice roda *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* spp. proizvodi velik broj antibiotika, koje uključuju acetaldehid gliotoksin i viridin, alfa – pirone, terpene, poliketide, derivate izocijanida, piperacine i kompleks sličnih peptaibola. Mnogi od ovih antibiotika djeluju sinergijski u kombinaciji sa različitim degradirajućim staničnim enzimima gljivica roda *Trichoderma*. U ovoj kombinaciji, antibiotici imaju jak inhibitorski učinak na brojne biljne patogene. Inhibitorska aktivnost kemijskih fungicida apliciranih na patogene gljive roda *Botrytis* i druge biljne patogene može biti snažnija ukoliko u isti dodamo *Trichodermine* degradirajuće stanične enzime.

Za razliku od kemijskih sredstava *Trichodermini* degradirajući stanični enzimi nisu opasni za čovjeka, kao niti za životinje, te u okolišu stvaraju korisne rezidue u tlu što je pokazano u EPA-inom testu pri registraciji dvije *Trichodermine* vrste u biološkoj zaštiti u SAD-u.

Niskomolekularni spojevi i antibiotici (hlapivi i ne hlapivi) koje luče gljivice roda *Trichoderma* ometaju kolonizaciju štetnih mikroorganizama uključujući i nematode koje se nalaze u zoni korijena (Eapen and Venugopal, 1995).

Većina gljivica roda *Trichoderma* proizvode hlapive i ne hlapive toksične metabolite. U nekim slučajevima, proizvodnja antibiotika korelira sa biološkom kontrolom, te tako pročišćeni antiobiotici imaju efektivnije djelovanje. Hlapive supstance koje proizvode gljivice ovog roda djeluju inhibitorno na rast micelija *Macrophomina phaseolina* i to od 22-51% (Angappan, 1992).

Hlapivi antibiotici koji nastaju kao metaboliti gljivice roda *T. harzianum* i *T. atroviride* značajno usporavaju razvoj gljivičnih patogena koji su karakteristični za topolu, a to su *Cytospora chrysosperma* i *Dothiorella gregaria*. S druge strane ne hlapivi sekundarni metaboliti gljive *Trichoderme* spp. Djeluju inhibitorno na linearno povećanje patogena (Deshmukh and Pant, 1992; Pandey, 1988).

Postoje također i primjeri gdje pretjerano lučenje antibiotika kao što je gliovirin od gljivice roda *T. virens*, koji u normalnim količinama štiti pamuk od *Phythium ultimuma* u ovom slučaju ima „kontra“ učinak. *Trichoderma* spp. također proizvode ugljični monoksid, amonijak, karbonilne komponente i acetaldehide koji mogu poboljšati aktivnost antagonista u tlu ( Robinson and Park, 1966.).

Poznato je više od 180 sekundarnih metabolita koji predstavljaju različite klase kemijskih spojeva (Gams and Bisset, 1998.; Reino et al., 2008.), a možemo ih podjeliti u skupine kao što su: hlapivi antibiotici, te spojevi topivi u vodi. *T. viride*, *T. harzianum* i *T. koningii* su u stanju proizvesti 6PP (6-pentil- $\alpha$ -piron) koji pripada skupini hlapivih antibiotika i od iznimne je važnosti u biokontroli vrsta kao što su *B. cinerea*, *R. solani* i *Fusarium oxysporum*.

Gljivice roda *Trichoderma* osim što proizvode spojeve koji su dobri u borbi sa patogenima također proizvode i zeaksantin i giberelin, odnosno spojeve koji ubrzavaju klijavost. Mnogo sojeva proizvode i kiseline kao što su glukonska, limunska i kumarinska, što uzrokuje oslobađanje fosfora, odnosno njegovih iona i mikroelemenata koji će kasnije biti dostupni biljkama (Harman et al., 2004).

Ovo je potvrđeno na primjeru krastavca, koji je nakon primjene *T. harzianum* povećao masu korijena i nadzemnog dijela biljke, no osim mase utvrđen je veći udio mikroelemenata. Osim kod krastavaca potvrđeno je pozitivno djelovanje roda *Trichoderma* na prinos jagoda (Porrasu et al., 2007.).

Gljivice roda *Trichoderma* također potiču sustavni otpor u biljkama. Brojne studije pokazuju da različite skupine metabolita mogu igrati ulogu elicitora odnosno nastajanje tzv. inducirane otpornosti u interakcijama *Trichoderme* s biljkama (Harmann et al., 2004.).

Možemo slobodno reći i da proizvode enzime i brojne sekundarne metabolite, antibiotike, zbog čega su važni mikroorganizmi gledano sa stajališta poljoprivrede, ekologije i industrije.

Sekundarne komponente i antibiotici koje proizvodi *Trichoderma* spp. Od iznimne su važnosti u biološkoj kontroli ovoga antagonista (Vinale et al., 2008; Ajitha & Lakshmidivi, 2010). Sivasithamparam i Ghisalberti (1998.) ustanovili su kako *Trichoderma* spp. proizvodi nekoliko sekundarnih metabolita u koje spadaju antibakterijski i antifungalni antibiotici kao što su poliketidi, pironi i terpeni. Sekundarni metaboliti, uključujući metabolite, koji nisu direktno vezani uz rast biljke, razvitak ili reprodukciju su po kemijskom sastavu znatno razlikuju od prirodnih komponenti mogu imati značnu ulogu u simbiozi, transportu metala, razlikovanju i stimulaciji ili inhibiciji formiranja spora (Demain&Fang, 2000; Vinale et al.,2008.).

Antibiotici su često povezivani sa biološkom kontrolom. Paracelsin je prvi sekundarni metabolit okarakteriziran kao antibiotik koji proizvodi *Trichoderma* spp. (Bruckner & Graf, 1983.; Bruckner et al., 1984.).

### 3.2 *Trichoderma viride*

*Trichoderma viride* korisna je u biološkoj borbi protiv najznačajnijih fitopatogenih gljiva kao što su *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Armillaria*, *Fusarium* i mnoge druge ekonomski značajne vrste patogena. Primjenom u vrijeme sjetve, postiže se kolonizacija površine sjemena ovim antagonistom koji supresira naseljavanje patogena na kutikulu sjemena i tako otežava gljivičnu kontaminaciju (Samuels i sur. 2006.).

Karakteristična je po brzom rastu kolonije u pogodnim toplim i vlažnim uvjetima. Optimalne temperature za rast micelija se kreću od 20 °C do 28 °C. Optimalna pH vrijednost za ovu vrstu je u rasponu od 4,5 do 5,5. Optimalna temperatura za proces klijanja konidija iznosi od 10 °C do 35 °C. Najpogodnija relativna vlažnost zraka iznosi 95% (Cavalcante i sur. 2006.).

Kolonizacija korijena vrstom *Trichoderma viride* stimulira rast korijena, povećava usvajanje i upotrebu hraniva što dovodi do bujnijeg rasta. Danas se smatra kako je utjecaj *T. viride* od velike važnosti za poljoprivrednu proizvodnju kao i shvaćanje uloge *Trichoderma* vrsta u ekosustavu (Topolovec - Pintarić i sur. 2013.).

Kolonije *T. viride* imaju karakterističnu smaragdno zelenu boju. Zbog činjenice da spada u diurnalne vrste pri izmjeni dana i noći formira karakteristične koncentrične krugove zelene do tamnožute boje. Konidije su maslinasto zelene boje veličine od 2,5-4 µm. Vrsta *T. viride* rijetko stvara hlamidospore, ako nastanu najčešće su jajolike te prozirne do blijedožute boje (Samuels i sur 2006.).

Povećavajući otpornost biljke naspram bolesti, *Trichoderma* vrste štite biljku od infekcija od strane fitopatogenih gljiva te je korijen koji je u mikorizi s vrstom *T. viride* bujniji što direktno dovodi do povećanja prinosa (Hermosa i sur 2012.).

Micel *T. viride* može proizvesti razne enzime, uključujući celulaze i kitinaze koji mogu degradirati celulozu i kitin. Kalup može izravno rasti na drvo, koje se uglavnom sastoji od celuloze, i na gljivama, čiji se stanični zidovi uglavnom sastoje od kitina. Parazitsizira micelije i plodonosna tijela drugih gljiva, uključujući kultivirane gljive, zbog toga ga nazivamo i "zelena plijesan bolesti gljiva". Pogođene gljive su iskrivljene i neprivlačne u izgledu, a usjev se smanjuje.



*Trichoderma viride* stimulira rast korijena, povećava usvajanje i upotrebu hranjiva što dovodi do bujnijeg rasta. Danas se smatra kako je utjecaj *T. viride* od velike važnosti za poljoprivrednu proizvodnju kao i shvaćanje uloge *Trichoderma* vrsta u ekosustavu (Topolovec - Pintarić i sur. 2013.).



Slika 9. *Trichoderma viride*

Izvor: <https://www.projectnoah.org/>

*Trichoderma viride* je prepoznatljiva i po svom brzom rastu u uvjetima optimalne temperature od 20°C do 28°C. Gljiva se nalazi u tlu te poboljšava klijavost sjemena cvjetnica, povećava unos fosfora i proizvodi enzime koji degradiraju celulozni poljoprivredni otpad na alkohol (Samuels i sur. 2006).

Fungicidna aktivnost čini *T. viride* korisnim kao biološku kontrolu protiv biljnih patogenih gljiva. Kada se primjenjuje istodobno sjemenom, ona kolonizira površinu sjemena i ubija ne samo one patogene prisutne na kutikuli, nego pruža i zaštitu od patogena koji se nalaze.

#### 4. SUZBIJANJE PATOGENE BAKTERIJE RODA *PSEUDOMONAS* PRIMJENOM BENEFITNE GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE*

*Trichoderma* spp. su gljive koje su prisutne u gotovo svim poljoprivrednim zemljištima i drugim sredinama. Antigljivične sposobnosti ovih mikroorganizma su poznate još od 1930. godine i od tada se veliki napori ulažu za njihovo uvođenje kao biofungicida u zaštitu bilja. Ove gljive rastu trofički prema hifama drugih gljiva, obavijaju se oko njih uz pomoć lecitina, razgrađuju zid ciljnog gljivičnog organizma sekrecijom različitih litičkih enzima (Grahovac i sur. 2009.).

*Trichoderma viride* osim što će suzbiti fitopatogenu vrstu, ona će ujedno povoljno djelovati na poboljšanje otpornosti biljke na bolesti. *T. viride* se danas u svijetu uspješno koristi u biološkoj borbi te je na temelju nje napravljen velik broj pripravaka.

Gljivice roda *Trichoderma* osim što proizvode spojeve koji su dobri u borbi sa patogenima također proizvode i zeaksantin i giberelin, odnosno spojeve koji ubrzavaju klijavost. Mnogo sojeva proizvode i kiseline kao što su glukonska, limunska i kumarinska, što uzrokuje oslobađanje fosfora, odnosno njegovih iona i mikroelemenata koji će kasnije biti dostupni biljkama (Harman et al., 2004).

Ovo je potvrđeno na primjeru krastavca, koji je nakon primjene *T. harzianum* povećao masu korijena i nadzemnog dijela biljke, no osim mase utvrđen je veći udio mikroelemenata. Osim kod krastavaca potvrđeno je pozitivno djelovanje roda *Trichoderma* na prinos jagoda (Porrasi et al., 2007.).

Ove gljive mogu potencijalno ograničiti štetu od patogena koloniziranjem korijenskih površina, prodiranjem u korijenje, oslobađanjem metaboličkih spojeva i induciranjem sistemske otpornosti biljaka, poboljšavajući na taj način opće zdravlje i rast biljaka. Kod biljka kojemu je korijenje kolonizirano od strane *Trichoderma* spp. mogu puno brže i intenzivnije reagirati na napad patogena.

Da bismo identificirali obećavajuće izolate *Trichoderme* za kontrolu *Pseudomonas syringae*, dobili smo korijensku endofitičnu *Trichodermu* širokog spektra zdravih biljnih vrsta u područjima s visokom učestalošću *Pseudomonas syringae*.

U laboratorijskim testovima, mladih kivi sadnica različitih sorti su inokulirane sa odabranim izolatima. Sadnice s *P. syringae* po probod inokulacije ostavljena identifikaciju nekoliko obećavajući *Trichoderma* smjesa i pojedinačnih sojeva. U voćnjacima zaraženih od strane

*P. syringae* potvrdila se učinkovitost najboljih tretmana (pojedinačno i u kombinaciji s drugim mikroorganizmima) da smanje simptome bakterije *P. syringae*. Kada se *Trichoderma* izolira na kraju laboratorijskih testova, biljke koje nisu primile kombinaciju *Trichoderma* i drugih tretmana, prije bude izložene *P. syringae*. Pronađen je značajno veći broj *Trichoderma* izolata u korijenu tretiranih biljaka u usporedbi sa netretiranim kontrolama.

Rezultati pokazuju da jedna inokulacija *Trichodermom*, tijekom razvoja biljaka ima značajan učinak na zdravlje biljnog svijeta i promiče uspostavu jake endofitične *Trichoderma* zajednice, koja pridonosi kontroli *Pseudomonas syringae* ne samo na mlade biljke već i kod starijih biljaka koje su inficirane ovom patogenom bakterijom.

## 5. ZAKLJUČAK

Benefitna gljiva *Trichoderma* u posljednje je vrijeme dobila veliku značajnost na području biološke zaštite jer se koriste kao biokontrolni agensi protiv gljivičnih, ali i bakterijskih uzročnika bolesti biljaka. Prisutna je u gotovo svim tipovima tla i preferira područja s velikom količinom zdravog korijenja koje ujedno potiče i rast. Različiti mehanizmi uključuju antibiozu, parazitizam, induciranje otpornosti domaćina i biljke, te konkurenciju *Trichoderma* vrste mogu istovremeno putem više različitih mehanizama spriječiti razvoj patogena. To ovisi i o uvjetima okoline ( temperatura, vlaga i ostali čimbenici). Zahvaljujući tim mehanizmima, *Trichoderma* vrste mogu spriječiti klijanje spora raznih patogena te tako spriječiti razvoj infekcije. (Kortekamp i sur., 2013). *Trichoderma* vrste u suradnji sa bakterijom *Pseudomonas fluorescens* se jako dobro slažu u borbi protiv patogenih gljivica. Upotreba antagonističkih gljiva i bakterija u biološkoj kontroli brojnih uzročnika bolesti predstavlja važnu alternativu kojom bi se mogli zamijeniti kemijski pesticidi ili u što većoj mjeri smanjiti njihova primjena.

## 6. LITERATURA

1. Agrios, G. N. (2005.): Plant Pathology (5th ed.). Elsevier Academic Press, USA
2. Aldon, D. i sur. (2000.): A bacterial sensor of plant cell contact control of transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. US national library of medicine , 19(10):2304-14.
3. Baron, C. I Zambryski, P.C. (1995.): The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme, Annual review of genetics, 29:107-129.
4. Beattie, G.A. i Freeman, B.C. (2008.): An overview of plant defenses against pathogens and herbivores, Iowa state University.
5. Bloemberg, G.V. i Dekkers, L. i Bloemberg, G.V. (2001.): Molecular determinants of rhizosphere colonization by pseudomonas, annual reviews, 39:461-490.
6. Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codom A.C. (2004.): Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains, 7(4): 249-260.
7. Bozkurt, I.A., Soyul, S., Mirik, M., Ulubas Serce, C., Baysal. (2014.): Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate ( *Punica granatum* L.) trees: A new host of the pathogene, US national library, 59(5):520-7.
8. Braun, A. (2010.): Plant malformations, Britannica.
9. Brian, P.W. (1944.): Production of Gliotoxin by *Trichoderma viride*, Science direct, p: 211-218.
10. Brotman, Y., Liseć, J., Meret, M., Chet, I., Willmitzer, L., i Viterbo, A. (2012.): Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*, Microbiology, 158, 139-146.
11. Caballo-Ponce, E., Murillo, J., Martinez-Gil, M., Moreno-Perez, A., Pintado, A. i Ramos, C. (2017.): Knots unitie: Moecular determinants involved in knot formation induced by *Pseudomonas savastanoi* in woody hosts, US library, 8:1089.
12. Cvjetković, B. (2010.): Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze, Zrinski d.d., Čakovec.

13. Dangl, J.L. (1994.): Bacterial pathogenesis of plants and animals: Molecular and cellular mechanisms
14. Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M. I Rekanović, E. (2003.): Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive, Pesticidi, 18(2): 69-75.
15. Gams, W. I Bisset, J. (2015.): Morphology and identification of Trichoderma. Pest management on horticultural ecosystems, 21:194-202.
16. Grahovac, M. I sur. (2009.): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi, Pesctic. Fitomed.,24(4):245-258.
17. Hammond-Koscak, K.E. i Jones, J.D.G. (1996.): Resistance gene-dependent plant defense responses.
18. Harman G. (2006). Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. Phytopathology.
19. Harris, S. (2018.): Pseudomonas infection.
20. Hill, R., Stark, C., Cummings, N., Elmer, P. i Hoyte, S. (2013.): Use of beneficial microorganisms and elicitors for control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit (*Actinidia* spp.), International society for horticultural science.
21. Heromsa, R., i sur. (2012.): Plant beneficial effects of Trichoderma and of its genes. Microbiology, 158:17-25.
22. Howell C.R. (2003.): Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases; the history and evolution of current concepts, Plant Dis. 87(1):4-10.
23. Jurković, D. (2009.): Fitopatologija I. Poljoprivredni fakultet u Osijeku
24. Katalinić, M. (2013.): Rak masline
25. Križanac, I. (2016.): Bakterijski rak trešnje i višnje
26. Kubicek, CP. I Penttilä, M.E. (1998.): Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by Trichoderma, Taylor and Francis, pp. 49-71.
27. Kumar, A. i sur. (2017.): Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease managment, Sci. Food. Agric. 89:2643-2649.
28. Kvitko, B., Xin, XF. I He, Sy. (2018.): *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen, US national library, 16(5):316-328.
29. Maceljski, M., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Igrac, Barčić, J., Pagliarini, N., Oštrec, Lj., Barić, K. i Čizmić, I.(2004.): Štetočinje povrća, Čakovec
30. Maceljski, M. (1999.): Poljoprivredna entomologija, Čakovec, p.p. 441.

31. Martinko K. (2015): Interakcija *Trichoderma viride* i *Fusarium solani* u prisutnosti Raxil TM GEL 206, Diplomski rad, Agronomski fakultet.
32. Marić, I. (2015.): Obrambeni odgovor biljaka na patogene
33. Miličević, T. (2006): Biološko suzbijanje biljnih patogena – Današnje stanje u svijetu i mogućnosti primjene, Glasilo biljne zaštite, 6:310-316.
34. Monte, E. i Llobell, A. (2003.): *Trichoderma* in organic agriculture, Proceedings Vworld Avocado Congress, 725-733.
35. Moore, L.W. i Pscheidt, J.W. (2011.): Diseases caused by *Pseudomonas syringae*, Ornamentals Northwest Newsletter, 12:4-16.
36. Nomura, K. I sur. (2005.): Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interaction, US library, 8(4):361-8.
37. Pradhanang, P.M, Momoi, MT., Olson, SM., Jones, JB. (2007.): Effects of Plant Essential Oils on *Ralstonia solanacearum* Population Density and Bacterial Wilt Incidence in Tomato, US library, 87(4):423-427.
38. Ramos, L.J. i sur. (2002.): Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria, US library, 56:743-68.
39. Rifai, M. A. (1969.): A revision of the genus *Trichoderma*, Mycological Pap., 116:1-56.
40. Romanjek-Fajdetić, N., Vinković, T., Baličević, R., Parađiković, N. (2010.): *Trichoderma* spp. antagonist *Agaricus bisporus*. Zbornik radova 3rd international scientific/professional conference Agriculture in nature and environment protection, Vukovar, Osječki list. Str: 200-204.
41. Rodrigez-Moreno, L. i sur. (2009.): Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knot, Microbial biot.,2(4):476-488.
42. Samuels G. J., Jaklistich W. M., Dood S. L. (2006). *Hypocrea rufa* /*Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia
43. Salanoubat, M. i sur. (2002.): Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*, US library, 415(6871):497-502.
44. Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A. et al. (2014). Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation

45. Smolinska, U., Kowalska, B., Oskiera, M. (2007.): The effectivity of Trichoderma strains in the protection of cucumber and lettuce against Rhizoctonia solani
46. Šubić, M. (2016.): Mogućnosti i ograničenja suzbijanja štetnih organizama trešnje-uzročnici bolesti
47. Topolovec-Pintarić, S., Cvjetković, B. (2003.): Biofungicides - New Solutions for Controlling Plant Diseases, Seminar biljne zaštite, 38(2):670-673.



## 7. SAŽETAK

Bakterije roda *Pseudomonas* pripadaju najzastupljenijim rodovima pronađenih u rizosferi mnogih biljaka. Zaraza biljaka patogenima predstavlja veliki problem jer onemogućuje postizanje visokih prinosa i optimalne kvalitete poljoprivrednih kultura. Danas je poznat veliki broj biljnih patogena: virusi, bakterije, gljive, viroidi, nematode i oomicete. Patogeni konstantno razvijaju otpornost na postojeće biljne gene otpornosti isto tako i na pesticide i druge kemikalije kojima se biljni usjevi tretiraju. Često razvijaju mehanizme kojima nadvladaju biljni obrambeni sustav, što rezultira njihovom kolonizacijom biljke i tada zaražene biljne vrste postaju domaćini patogenu. Što se tiče benefitne gljivice *Trichoderma viride* stimulira rast korijena, povećava usvajanje i upotrebu hranjiva što dovodi do bujnijeg rasta. Danas se smatra kako je utjecaj *T. viride* od velike važnosti za poljoprivrednu proizvodnju kao i shvaćanje uloge *Trichoderma* vrsta u ekosustavu.

## 8. SUMMARY

The bacteria of the genus *Pseudomonas* belong to the most common genera found in the rhizosphere of many plants. Contamination of plants with pathogens is a major problem because it prevents high yields and optimum quality of crops. Today, many plant pathogens are known: viruses, bacteria, fungi, viroids, nematodes and oomycetes. Pathogens are constantly developing resistance to existing plant resistance genes as well as pesticides and other chemicals that are treated by plant crops. They often develop mechanisms that override the plant defense system, resulting in their colonization of plants and then infected plant species become host to the pathogen. As for the beneficial fungus, *Trichoderma viride* stimulates root growth, increases nutrient uptake and use, leading to more robust growth. Today, the influence of *T. viride* is considered to be of great importance for agricultural production as well as to understand the role of *Trichoderma* species in the ecosystem.

## 9. POPIS SLIKA

|  |    |
|--|----|
| Slika 1. Shematski prikaz životnog ciklusa <i>Pseudomonas syringae</i> .....                   | 6  |
| Slika 2. Smola iznad rak rane.....   | 7  |
| Slika 3. Bakterijski rak trešnje.....  | 8  |
| Slika 4. Štete na krumpiru uzrokovane <i>Ralstonia solanacearum</i> .....                      | 11 |
| Slika 5. Štete na listovima i stabljici rajčice uzrokovane <i>Ralstonia solanacearum</i> ..... | 11 |
| Slika 6. Bakterijski rak masline.....  | 14 |
| Slika 7. <i>Trichoderma</i> spp.....   | 16 |
| Slika 8. Komercijalni biološki pripravci na bazi antagonističkih gljiva.....                   | 17 |
| Slika 9. <i>Trichoderma viride</i> .....   | 21 |

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

### UČINKOVITOST SUZBIJANJA PATOGENIH BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS* PRIMJENOM BENEFITNE GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE* U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

Tena Cerovac

Bakterije roda *Pseudomonas* pripadaju najzastupljenijim rodovima pronađenih u rizosferi mnogih biljaka. Zaraza biljaka patogenima predstavlja veliki problem jer onemogućuje postizanje visokih prinosa i optimalne kvalitete poljoprivrednih kultura. Danas je poznat veliki broj biljnih patogena: virusi, bakterije, gljive, viroidi, nematode i oomicete. Patogeni konstantno razvijaju otpornost na postojeće biljne gene otpornosti isto tako i na pesticide i druge kemikalije kojima se biljni usjevi tretiraju. Često razvijaju mehanizme kojima nadvladaju biljni obrambeni sustav, što rezultira njihovom kolonizacijom biljke i tada zaražene biljne vrste postaju domaćini patogenu. Što se tiče benefitne gljivice *Trichoderma viride* stimulira rast korijena, povećava usvajanje i upotrebu hranjiva što dovodi do bujnijeg rasta. Danas se smatra kako je utjecaj *T. viride* od velike važnosti za poljoprivrednu proizvodnju kao i shvaćanje uloge *Trichoderma* vrsta u ekosustavu.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Mentor: Prof.dr.sc. Suzana Kristek

Broj stranica: 36

Broj slika: 9

Broj literaturnih navoda: 47

Ključne riječi: bakterije, *Pseudomonas*, *Trichoderma viride*, patogen

Datum obrane: 30.9.2019.

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Dr. sc. Jurica Jović, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Doc.dr.sc. Sanda Rašić, član
4. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Osijek  
thesis

Graduate

Faculty of Agriculture in Osijek University graduate study Plant nutrition

### THE EFFECTIVENESS OF COMBATING PATHOGENIC BACTERIA OF GENUS *PSEUDOMONAS* APPLICATION OF BENEFICIAL FUNGUS *TRICHODERMA VIRIDE* IN LABORATORY CONDITIONS

Tena Cerovac

The bacteria of the genus *Pseudomonas* belong to the most common genera found in the rhizosphere of many plants. Contamination of plants with pathogens is a major problem because it prevents high yields and optimum quality of crops. Today, many plant pathogens are known: viruses, bacteria, fungi, viroids, nematodes and oomycetes. Pathogens are constantly developing resistance to existing plant resistance genes as well as pesticides and other chemicals that are treated by plant crops. They often develop mechanisms that override the plant defense system, resulting in their colonization of plants and then infected plant species become host to the pathogen. As for the beneficial fungus, *Trichoderma viride* stimulates root growth, increases nutrient uptake and use, leading to more robust growth. Today, the influence of *T. viride* is considered to be of great importance for agricultural production as well as to understand the role of *Trichoderma* species in the ecosystem.

The work was created at: Faculty of Agriculture

Mentor: PhD. Susan Kristek

Pages: 36

Number of photos: 9

Number of references: 47

Keywords: bacteria, *Pseudomonas*, *Trichoderma viride*, pathogen

Date of defense: 30.9.2019.

Commission for evaluation and defense of thesis:

1. PhD Jurica Jović, predsjednik
2. PhD Suzana Kristek, mentor
3. PhD Sanda Rašić, član
4. PhD. Drago Bešlo, zamjenski član

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