

Antifungalna učinkovitost *Trichoderma* sp.

Kovaček, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:424610>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



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

Ivan Kovaček

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Antifungalna učinkovitost *Trichoderma sp.*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ivan Kovaček

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Antifungalna učinkovitost *Trichoderma sp.*

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, član
3. prof. dr. sc. Irena Rapčan, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Završni rad

Ivan Kovaček

Antifungalna učinkovitost *Trichoderma* sp.

Sažetak: Gljive roda *Trichoderma* zbog svojih antifungalnih osobina posljednjih godina sve više se koriste kao zamjena za kemijska sredstva koja degradiraju i ekološki onečišćuju tlo. *Trichoderma* sp. svojom prisutnošću brane biljku od patogenih mikroorganizama, pospješuju usvajanje hranjiva što povoljno utječe na njezin rast i razvoj, a ujedno ne djeluju štetno na ekosustav odnosno čovjeka i okoliš. *Trichoderma* sp. posjeduju različite biotske mehanizme uz pomoću kojih usporavaju razvoj patogenih mikroorganizama. Cilj ovog rada bio je istražiti i utvrditi učinkovitost *Trichoderma* sp. u inhibiciji rasta različitih sojeva *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides*. Rezultati su pokazali kako navedeni soj inhibira micelijski rast navedenih *Fusarium* vrsta za 16-40% međutim nedovoljno kako bi se dokazala statistički opravdana značajnost. Daljnja istraživanja trebaju ići u smjeru reizolacije novih autohtonih sojeva roda *Trichoderma* koji bi imali djelotvorniji antifungalni učinak.

Gljučne riječi: gljive, *Trichoderma* sp. , biljka, inhibicija , *Fusarium* spp.

21 stranica, 9 slika, 4 tablica, 4 grafikona i 22 literaturna 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 Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant Production

BSc Thesis

Ivan Kovaček

Antifungal efficacy of *Trichoderma* sp.

Summary: Over the past few years, due to their antifungal characteristics, the Fungi of the genus *Trichoderma* have increasingly been used as a substitute for chemicals that have degraded and ecologically polluted soils. Through their presence *Trichoderma* sp. protect the plant from pathogenic microorganisms, improve the absorption of nutrients, which favourably affects its growth and development, and at the same time does not do any harm to the ecosystem, i.e., to the mankind and the environment. *Trichoderma* sp. possesses various biotic mechanisms by the help of which it slows down the development of pathogenic microorganisms. The aim of this study was to investigate and determine the efficacy of *Trichoderma* sp. in inhibiting the growth of different strains of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. The results showed that the named strain inhibited the mycelial growth of the named *Fusarium* species by 16-40%. However, that was insufficient to justify the statistical significance. Further research should follow the path of re-isolation of new indigenous strains of the genus *Trichoderma* that would have a more antifungal effect.

Key words: fungi, *Trichoderma* sp. , plant, inhibition, *Fusarium* spp.

21 pages, 9 photos, 4 tables, 4 graphs and 22 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. Opće osobine o <i>Trichoderma</i> sp. | 1 |
| 1.2. Enzimi i sekundarni metaboliti roda <i>Trichoderma</i> sp. | 3 |
| 1.3. Rod <i>Fusarium</i> | 5 |
| 1.3.1. Fuzarijske bolesti | 6 |
| 1.3.2. Mikotoksini | 6 |
| 2. MATERIJAL I METODE | 7 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 9 |
| 3.1. <i>Trichoderma</i> sp. i patogene gljive | 9 |
| 3.1. Antifungalno djelovanje <i>Trichoderma</i> sp. na <i>F. graminearum</i> 110250 i FRC R-057969 | |
| 3.1.1. <i>Trichoderma</i> sp. i <i>F. graminearum</i> 110250 | 9 |
| 3.1.2. <i>Trichoderma</i> sp. i <i>F. graminearum</i> FRC R-05796 | 11 |
| 3.2. Antifungalno djelovanje <i>Trichoderma</i> sp. na <i>F. verticillioides</i> M-7075 i M1325 | 14 |
| 3.2.1. <i>Trichoderma</i> sp. i <i>F. verticillioides</i> M-7075 | 14 |
| 3.2.2. <i>Trichoderma</i> sp. i <i>F. verticillioides</i> M-1325 | 15 |
| 4. ZAKLJUČAK | 18 |
| 5. POPIS LITERATURE | 19 |

1. UVOD

Gljive roda *Trichoderma* su saprofitske gljive. Poznato je da *Trichoderma* parazitira druge gljive i na taj način djeluje kao antifungalni biokontrolni čimbenik (Singh i sur., 2013.). Biokontrola biljnih patogena rodom *Trichoderma* u različitim istraživanjima je dokazala da su pojedini izolati ove gljive potencijalna alternativa kemijskoj kontroli usjeva (Harman i sur., 2004.). Litički enzimi koje oslobađaju izolati roda *Trichoderma* vrlo su važni u biokontroli gljiva korijena truleži poput *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* i *Phytium* vrsta (Singh i sur., 2013.). Dakle, svojim prisustvom u tlu osiguravaju zaštitu biljke od patogenih gljiva. Samim tim pospješuju rast i razvoj biljne vrste koja se nalazi u neposrednoj blizini. Neki sojevi su visoko kompetentni za rizosferu, tj. sposobni su kolonizirati i rasti na korijenju kako se razvijaju (Harman, 2000.). Najjače kompetentne vrste za rizosferu mogu se dodati bilo kojom metodom inokluacije u tlo ili na sjeme. Jednom kada dođu u kontakt s korijenom, koloniziraju površinu korijena ili korteks, ovisno o soju (Harman, 2000.). *Trichoderma* je razvila različite mehanizme poput mikoparazitizma i antibioze kako bi opstala u tlu (Kubicek i sur., 2001.). Mikoparazitizam je zasnovan na odnosu micelija antagonista i patogena nakon čega izlučevine enzima obavljaju degradaciju staničnog zida domaćina (Kubicek i sur., 2001.). Antibioza je zaseban vid antagonizma koji se događa između dvije ili više vrsta različitih mikroorganizama. *Trichoderma* je poznata po tome što u nepovoljnim uvjetima brzo zauzima veliku površinu prostora i hranjivih tvari. Tim postupkom direktno sprječava naseljavanje patogenih mikroorganizama. S obzirom na koristi roda *Trichoderma* cilj ovoga rada bio je utvrditi učinkovitost autohtonog izolata roda *Trichoderma* u inhibiciji rasta različitih fitopatogenih sojeva *Fusarium spp. in vitro*.

1.1. Opće osobine o *Trichoderma sp.*

U biološkoj zaštiti bilja gljive roda *Trichoderma sp.* smatraju se najzastupljenijom skupinom mikroorganizama. Prema nekim istraživanjima smatra se da je gotovo 90% gljiva ovog roda naklonjeno antagonizmu (Benitez i sur., 2004.). Mikroorganizmi roda *Trichoderma* koriste se kao glavni proizvodi za biološku kontrolu u većini zemalja. Osim što povećavaju otpornost biljaka na stres, stimuliraju rast biljaka, potiču bržu razgradnju komposta čime biljke brže dolaze do hranjivih elemenata (Harman, 2000.).

Rod *Trichoderma* se prvi puta spominje 1794. godine kao zelena plijesan koja raste na oštećenim granama i supstratima (Persoon, 1794., cit. Schuster i Schmoll, 2010.). Može se opisati kao aseksualna saprofitska gljiva s telomorfnim stadijem koja pripada redu *Hypocreales* i porodici *Hypocreaceae* (Kubicek i Panttila, 1998.). Podjela se sastoji od 5 rodova: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Saturnisporum* i *Hypocreanum* (Kubicek i Panttila, 1998.). Od 90-ih godina prošlog stoljeća do danas potvrđeno je preko 100 različitih vrsta (Kubicek i Panttila, 1998.). Rod *Trichoderma* ima bitnu ulogu, s ostalom mikroflorom tla, u procesima humifikacije i dehumifikacije. Također od iznimne je važnosti *Trichoderma reesei* jer proizvodi enzim za razgradnju celuloze, te je zbog toga zastupljena u biotehnološkoj industriji (Kubicek i Panttila, 1998.).

U proteklim godinama poljoprivreda u svijetu se intenzivno okreće biološkoj proizvodnji. Prevelika primjena kemijskih sredstava negativno utječe na biološku ravnotežu mikroorganizama u tlu te se zbog toga nastoji smanjiti upotreba sredstava za zaštitu bilja poput pesticida, herbicida i fungicida. Kao alternativa traži se prirodni neprijatelj patogenim organizmima. U takvim okolnostima rod *Trichoderma* (Slika 1.) pronalazi svoje mjesto u sustavu obrane biljaka te se zbog toga sve više istraživanja provode u navedenom smjeru.

Gljive ovog roda su izrazito djelotvorne kada su u pitanju patogene gljive rodova: *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium*, *Macrophomina*, *Monilla*, *Nectria*, *Phoma* (Monte, 2001.).



Slika 1. *Trichoderma* sp.

Izvor: (<https://dehs.umn.edu/trichoderma-spp>)

Pri različitim istraživanjima vrste roda *Trichoderma* su pokazale izrazito dobar rast na različitim temperaturama. Velika većina *Trichoderma* vrsta proizvodi konidije u razdoblju svjetlosti zato što su fotoosjetljive, dok je za rast kolonije optimalna temperatura između 25 - 31 °C (Singh i sur., 2014.).

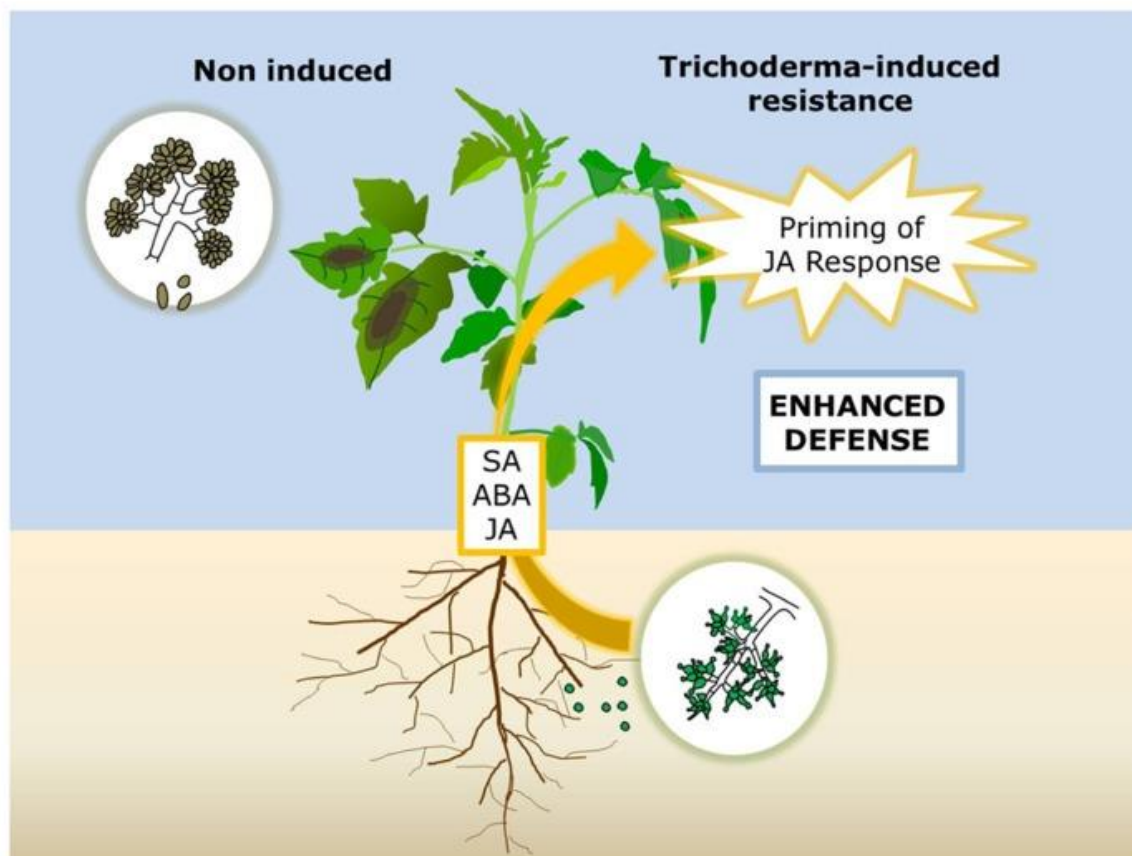
Konidiofori roda *Trichoderma* u fazi razvoja poprimaju izgled grananja nalik na drvo ili piramidu (Slika 1.) , oni rastu pojedinačno ili u grupi, a na sebi nose kratke filijale koje mogu biti skupljene u hrpu koju čini deset do dvadeset konidija pri čemu su jednostanične, veličine od 2,5 do 4 µm grubo zrnate membrane (Kumar, 2009.).

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

1.2. Enzimi i sekundarni metaboliti roda *Trichoderma* sp.

Rod *Trichoderma* proizvodi enzime koji svojim djelovanjem pomažu pri razgradnji stanične stijenke patogena, a to su: ksilanaza, proteaza, celulaza, amilaza, pektinaza, lipaze,

arabinaza i glukonaza (Strakowska i sur., 2014.). Neki sojevi roda *Trichoderma* proizvode siderofore koje djeluju inhibitory na micelij određenih gljiva kao što je *Botrytis cinerea* (Slika 2.), koja zbog siderofora ne dobiva dovoljno hraniva te ne postoji mogućnost njenog daljnjeg rasta i razvoja na kulturi (Benitez i sur., 2004.). Nadalje, u rizosferi *Trichoderma* može stvoriti kiselu sredinu koja je izrazito nepovoljna za razvoj drugih patogena (Benitez i sur., 2004.).

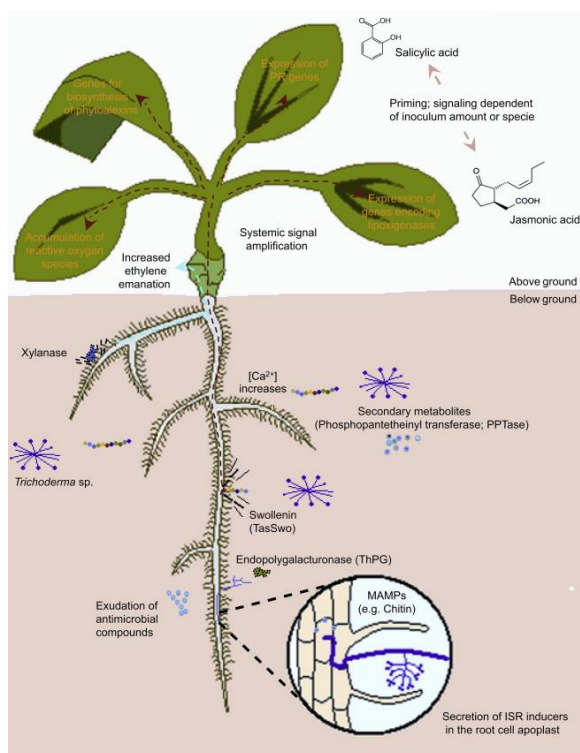


Slika 2. Model koji prikazuje induciranu otpornost roda *Trichoderma* protiv *Botrytis cinerea* u rajčici

Izvor: (https://www.researchgate.net/figure/Model-for-Trichoderma-induced-resistance-TISR-against-Botrytis-cinerea-in-tomato-Root_fig5_242334471)

Mnogi sojevi 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 i sur., 2004). Oslobađanjem fosfora u fazi kada je biljci potreban dolazi se do zaključka da će biljka koja je u međusobnom kontaktu s gljivama

iz roda *Trichoderma* imati kvalitetniji i brži prirast kako u nadzemnim organima tako i u podzemnim organima biljke (Slika 3.).



Slika 3. Pojačani imunitet biljaka pomoću roda *Trichoderma*

Izvor: (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444595768000369>)

1.3. Rod *Fusarium*

Prema Ćosić i sur. (2006.) gljive roda *Fusarium* pripadaju razredu *Hyphomycetes*, redu *Hyphales*. Rod se sastoji od velikog broja vrsta koje su većinom saprofiti, a ostatak pripada u fitoparazitne vrste koje pripadaju grupi fakultativnih parazita (Ćosić i sur., 2006.). *Fusarium* vrste napadaju velik broj biljaka iz različitih porodica i izazivaju različite tipove bolesti: palež klijanaca, trulež korijena, lukovica i gomolja, palež klasova, te trulež klipa i stabljike (Ćosić i sur., 2006.).

1.3.1. Fuzarijske bolesti

Fuzarijska oboljenja pšenice dijele se u tri glavne grupe: sniježna pljesan, fuzarijska trulež korijena, fuzarijska trulež stabljike i palež klasova (Tomasović i sur., 1994.).

Trulež korijena i stabljike pojavljuje se u sličnom intenzitetu kod strnih žitarica i kukuruza. Trulež se razvija tijekom čitave vegetacije, a simptomi se javljaju poslije klasanja prijevremenim ugibanjem biljaka (Tomasović i sur., 1994.). Gljive koje uzrokuju fuzariozu korijena i stabljike su: *Fusarium culmorum*, *Fusarium roseum (graminearum)* (Tomasović i sur., 1994.).

Palež klasova je jedan od problema današnjice u proizvodnji strnih žitarica. Svojom pojavom u urodu ostavlja dalekosežne posljedice u vidu smanjene kvalitete i kvantitete zrna. Do zaraze dolazi u periodu između cvjetanja, pa do kraja vegetacije (Ćosić i sur., 2006.). Najveće štete nastaju u godinama kada je visoka temperatura (iznad 25°C) i relativna vlažnost zraka (iznad 85%) u fazi cvjetanja (Ćosić i sur., 2006.). Simptomi zaraze su vidljivi u obliku narančaste ili ružičaste prevlake u bazi klasića, ako je relativna vlažnost zraka visoka (Ćosić i sur., 2006.).

1.3.2. Mikotoksini

Mikotoksini su gljivični toksični proizvodi koji uzrokuju plijesni (Ćosić i sur., 2006.). Toksini su različitog kemijskog sastava i uglavnom imaju različita djelovanja na biljke, životinje i čovjeka (Ćosić i sur., 2006.). Trenutno je poznato 200 gljivičnih vrsta koje proizvode mikotoksine (Ćosić i sur., 2006.).

2. MATERIJAL I METODE

U pokusu je korištena čista kultura *Trichoderma* sp. iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Korištene su čiste kulture *Fusarium graminearum* 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska), *Fusarium graminearum* FRC R-05796 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD), *Fusarium verticillioides* M-7075 i *Fusarium verticillioides* FRC M-1325 (Fusarium Research Center, Department of Plant Pathology, Penn State University, SAD). Gljive su nacijepljene (Slika 4.) na krumpir-dekstrozni agar (Biolife, Italija) (Slika 5.) i inkubirane na temperaturi od $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ kroz tjedan dana.



Slika 4. Nalijevanje krumpir-dekstroznog agara u petrijeve zdjelice (Izvor: Autor)



Slika 5. Petrijeve zdjelice ispunjene hranjivom podlogom (Izvor: Autor)

Postavljen je dual culture *in vitro* pokus odnosno nacijepljene (Slika 6.) su dvije čiste kulture u petrijevu zdjelicu jedna nasuprot drugoj. Inokulacija je provedena micelijskim diskom s rubova kolonije čistih kultura (*Trichoderma* nasuprot patogenih gljiva) promjera 4 mm.



Slika 6. Nacijepljivanje gljiva na hranjivu podlogu (Izvor: Autor)

Tretmani su postavljeni u četiri ponavljanja, a inkubacija je provedena na $25^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ u laboratorijskom termostatu (Termo Medicinski aparati, BTS-M).

Kontrola nije sadržavala nacijepljene patogene gljive. Rast micelija gljive je kroz 13 dana praćen mjerenjem dva promjera kolonije gljive. Navedeni micelijski rast je upotrebljen za izračun dnevne stope rasta. Dobiveni rezultati su statistički analizirani Studentovim t-testom, a za analizu podataka korišteni su Microsoft Excel (2013.) i Statistica 13.5 (Tibco Software Inc.).

3. REZULTATI I RASPRAVA

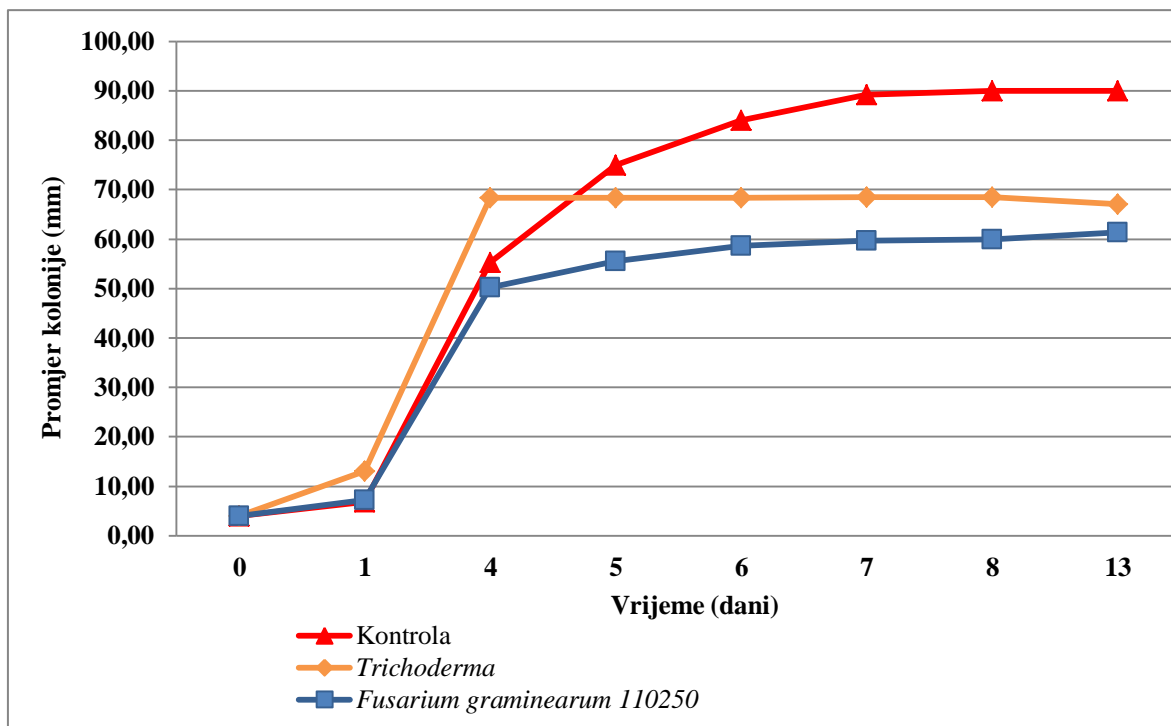
3.1. *Trichoderma* sp. i patogene gljive

Jedan od vodećih problema u proizvodnji hrane su patogene gljive koje mogu drastično smanjiti prinose kultura koje se uzgajaju. Sve većim spoznajama o štetnosti korištenja kemijskih sredstava u poljoprivredi sve se više istražuju korisnosti i efikasnosti korisnih mikroorganizama odnosno konkretno roda *Trichoderma*. U intenzivnoj proizvodnji ne smije biti oscilacija u prinosu kroz godine, te je zbog toga potrebna adekvatna zaštita usjeva kako ne bi došlo do strahovitih financijskih gubitaka. Osim što je na tržištu bitna kvaliteta proizvoda, sve većim brojem stanovništva na planetu Zemlji potrebno je osigurati velike količine proizvoda prvenstveno žitarica. Zbog svega navedenog znanstvenici vrše različita istraživanja koja su temeljena na biološkoj kontroli uz pomoć mikroorganizama. Temeljem različitih istraživanja utvrđeno je kako biokontrolni sustavi ne suzbijaju patogene, nego ih dovode u prirodnu ravnotežu (Aghigi i sur., 2004., cit. Dhingra i Sinclair, 1995.). Biološkom kontrolom postiže se dugotrajnija efikasnost, ali i jeftiniji način zaštite.

3.1. Antifungalno djelovanje *Trichoderma* sp. na *F. graminearum* 110250 i FRC R-05796

3.1.1. *Trichoderma* sp. i *F. graminearum* 110250

U ispitanom tretmanu (Grafikon 1.) zabilježena je inhibicija (Slika 7.) micelijskog rasta *F. graminearum* 110250 od 28% u odnosu na kontrolu međutim nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitanog tretmana i kontrole (Tablica 1.).

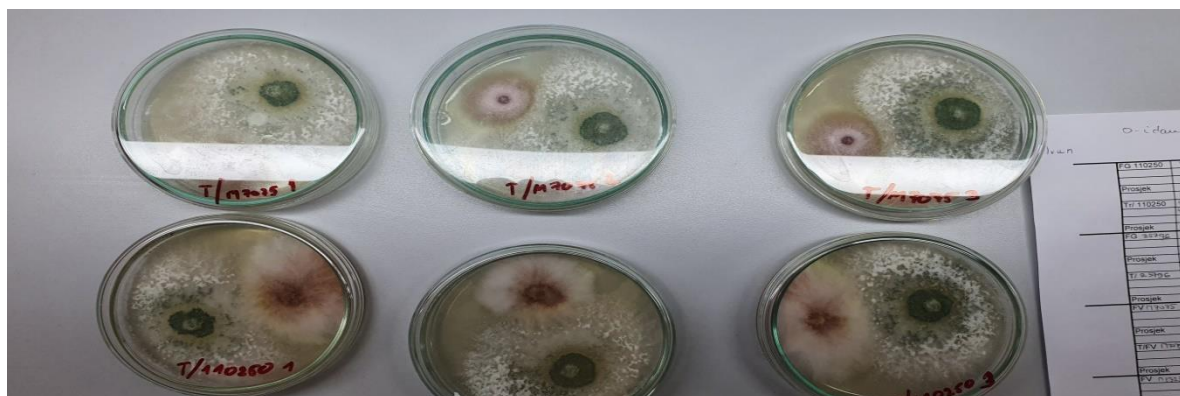


Grafikon 1. Micelijski rast *Trichoderma* i *F. graminearum* 110250

Tablica 1. Statistička analiza *Trichoderma* sp. i *F. graminearum* 110250

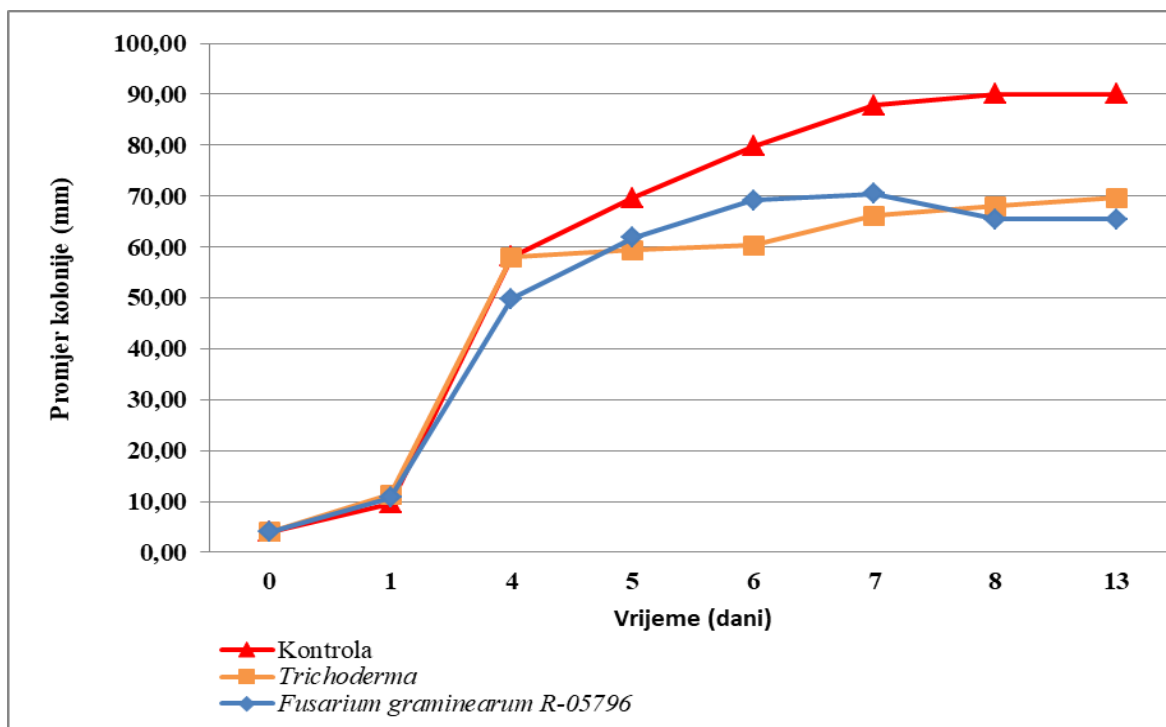
| Tretman | stopa rasta (mm/dan) | p |
|-----------------------------|-------------------------|----|
| kontrola | 4,75 | |
| <i>F.graminearum</i> 110250 | 3,42 | ns |

ns- not significant



Slika 7. Tretman *Trichoderma* i *F. graminearum* 110250 četvrtog dana od postavljanja (10.2. 2020.) (Izvor: Autor)

3.1.2. *Trichoderma* sp. i *F.graminearum* FRC R-05796



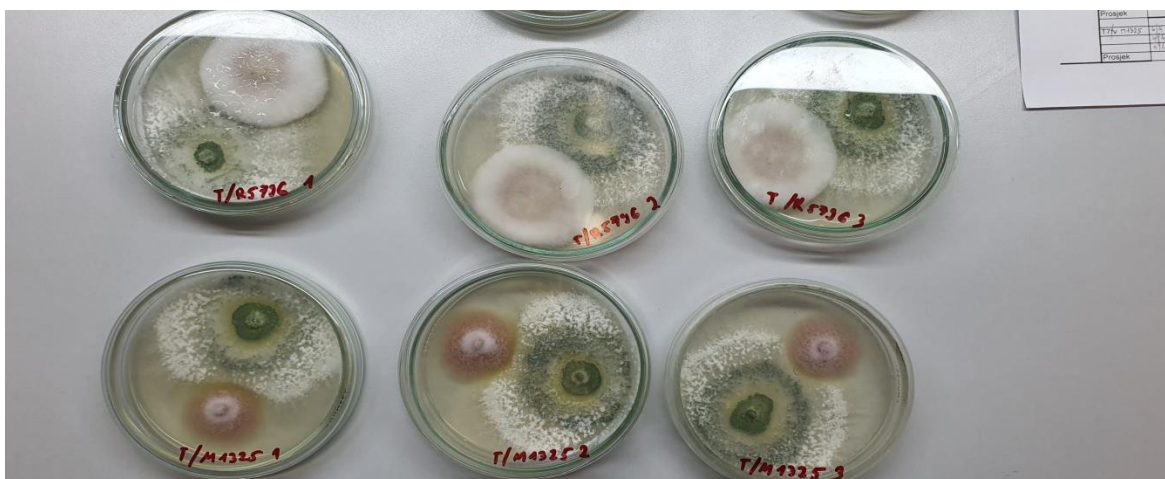
Grafikon 2. Micelijski rast *Trichoderma* i *F. graminearum* FRC R-05796

U ispitivanom tretmanu (Grafikon 2.) zabilježena je inhibicija (Slika 8.) micelijskog rasta *F. graminearum* FRC R-05796 od 16% u odnosu na kontrolu pri čemu nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitivanog tretmana i kontrole (Tablica 2).

Tablica 2. Odnos *Trichoderma* sp. i *F. graminearum* FRC R-05796

| Tretman | stopa rasta (mm/dan) | p |
|-----------------------------------|-------------------------|----|
| kontrola | 4,70 | |
| <i>F. graminearum</i> FRC R-05796 | 3,91 | ns |

ns- not significant



Slika 8. Tretman *Trichoderma* i *F. graminearum* FRC R-05796 četvrtog dana od postavljanja (10.2. 2020.) (Izvor: Autor)

Rezultati drugih istraživanja slične problematike su utvrdili da određene vrste roda *Trichoderma* imaju uspješniju antifungalnu djelotvornost (Akram i sur., 2011; Li i sur., 2016; Saravanakumar i sur., 2017; Tian i sur., 2018). Fuzarijska trulež stabljike uzrokovana *F. graminearum* značajno utječe na produktivnost zrna kod strnih žitarica i kukuruza (Ćosić i sur., 2006.). Prema podacima Ćosić i sur. (2006.) ako su klasovi pšenice zaraženi u punoj cvatnji gljivom *F. graminearum* masa 1000 zrna može biti manja do 55,10%, a klijavost zrna između 54,00 i 66,75%. U tom pogledu uporaba sredstva za biokontrolu je alternativa agrokemijskim sredstvima (Saravanakumar i sur., 2017.). Izbor roda *Trichoderma* kao sredstva za biokontrolu je usko specifičan. Sam odabir ovisi o vrsti domaćina na kojem se patogen nalazi (Saravanakumar i sur., 2017.). Isti autori u svom istraživanju ispitali su *in vitro* antifungalni učinak 100 izolata roda *Trichoderma* u odnosu na *F. graminearum*. Primjenom *Trichoderma harzianum* (CCTCC-RW0024) u stakleničkim pokusima proučavan je utjecaj na promjene mikrobioma kukuruza u rizosferi i biokontrole fuzarijske truleži stabljike (Saravanakumar i sur., 2017.). Navedeni soj pokazao je visoku antagonističku aktivnost (96,30%). Korijska kolonizacija navedenim sojem potvrđena je eGFP (zelenim fluorescentnim proteinom) označavanjem i qRT-PCR (lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu) analizom (Saravanakumar i sur., 2017.). Istraživanje je pokazalo da je egzogena inokulacija ispitivanog soja u rizosferi kukuruza povećala rast biljaka tako što se bolje razvio korijen i stabljika, pri čemu je utvrđen porast broja acidobakterija (18,4%), a smanjenje *F. graminearum* za 66% (Saravanakumar i sur.,

2017.). Saravanakumar i sur. (2017.) pretpostavili su da je transkripcijski kofaktor FgSWi6 potreban za virulenciju i patogenost *F. graminearum* 24 na temelju ranijih izvještaja eksperimenata koji su provedeni. Saravanakumar i sur. (2017.) zaključili su da su metaboliti ovog soja mogli komunicirati s transkripcijskim kofaktorom FgSWi6 povezanim s patogenošću i tako pridonijeti njegovoj inhibiciji. Zaključeno je da je soj *T. harzianum* CCTCC-RW0024 potencijalno biokontrolno sredstvo fuzarijske truleži stabljike (Saravanakumar i sur., 2017.).

Li i sur. (2016.) proveli su istraživanje o antifungalnom djelovanju *Trichoderma asperellum* na fitopatogenu gljivu *F. graminearum* Schwabe (CGMCC No. 304598). U istom istraživanju učinkovitost sedam sojeva *T. asperellum* prikupljenih s polja u Južnoj Kini procijenjeno je u odnosu na *F. graminearum*, uzročnika truleži stabljike kukuruza *in vitro* i *in vivo*. Ključnim čimbenicima koji pokreću aktivnost antagonista pripisano je ukupno 13 faktora, uključujući enzime koji razgrađuju staničnu stijenku (himnazu, proteazu i β -glukanaze) i sekundarne metabolite (Li i sur., 2016.). Model linearne regresije pokazao je da interakcija enzima i sekundarnih metabolita vrste *T. asperellum* soja ZJSX5003 povećava aktivnost antagonista protiv *F. graminearum* (Li i sur., 2016.). Nadalje, ovaj soj pokazao je smanjenje bolesti za 71% u biljkama kukuruza koje su inokulirane s *F. graminearum* u usporedbi s negativnom kontrolom (Li i sur., 2016.). Ističući kako je navedeni soj *T. asperellum* ZJSX5003 potencijalni izvor, zaključili su da je kompatibilan za razvoj biokontrolora protiv truleži stabljike kukuruza (Li i sur., 2016.).

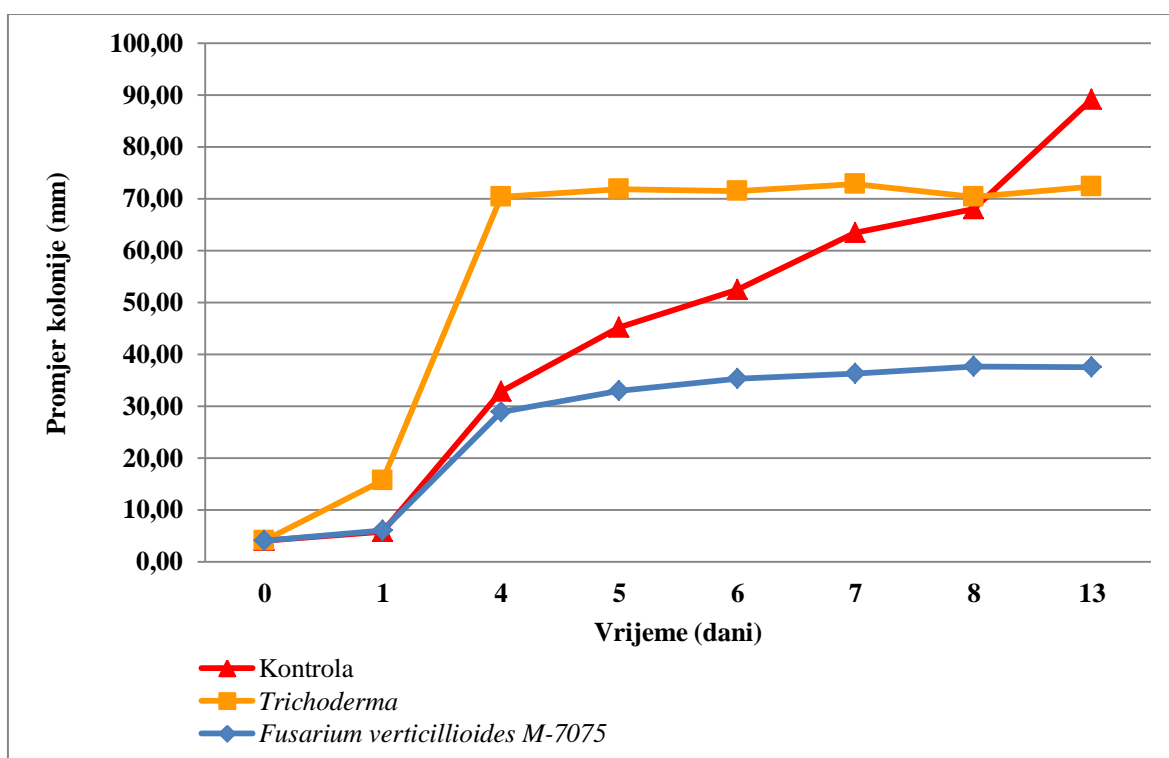
Tian i sur. (2018.) proveli su istraživanje o antifungalnom odnosu između roda *Trichoderma* i *F. graminearum* u *in vitro* istraživanju. *Trichoderma* je brzo zauzela životni prostor i inhibirala micelijsko širenje *F. graminearum* zbog svojih antagonističkih aktivnosti (Tian i sur., 2018.). Nadalje, sedam testiranih izolata roda *Trichoderma* uspjelo je značajno suzbiti rast micelija *F. graminearum* F1. Nadalje, *T. harzianum* Q710613, *Trichoderma atroviride* Q710251 i *Trichoderma asperellum* Q710682 pokazali su djelotvorne inhibitorne učinke (Tian i sur., 2018.).

U Azerbajdžanu, Akrami i sur. (2011.) proveli su istraživanje biološkog suzbijanja fuzarijske truleži korijena leće. U testu dualne kulture, svaka testirana *Trichoderma*

različito je ograničavala rast kolonije patogena (*Fusarium oxysporum*) i različito se razvijala (prerastala) koloniju patogena u usporedbi s njihovim razvojem. Za ispitivanje hlapivih metabolita koristile su se aktivne kulture *F. oxysporum* i *Trichoderma*. Rastuće kolonije subkultivirane su na krumpir- dekstroznoj hranjivoj podlozi i inkubirane u uvjetima bez svjetlosti na 25° C. Nakon 48 sati, otvorile su se petrijeve zdjelice u kojima su se nalazile kolonije *F. oxysporum*, a zatim su bilo premještene na 24 sata staru koloniju *Trichoderma*. Rast patogena mjereno je svakodnevno u oba testa. Inhibitorni postoci su izračunati po Abbottovoj formuli i procijenjeni pomoću softvera SAS. U ranijim testovima na isparljive metabolite, svi izolati značajno su smanjili rast kolonije patogena, dok je maksimalno smanjenje rasta zabilježeno u *Trichoderma harzianum* T149 i *Trichoderma asperellum* T90 (P <0,01). Maksimalni hiperparazitizam zabilježen je kod *Trichoderma harzianum* T149 i *Trichoderma asperellum* T90, što je bilo značajno u usporedbi s kontrolnim tretmanom (P <0,01) (Akrami i sur., 2011.).

3.2. Antifungalno djelovanje *Trichoderma* sp. na *F. verticillioides* M-7075 i M1325

3.2.1. *Trichoderma* sp. i *F. verticillioides* M-7075



Grafikon 3. Micelijski rast *Trichoderma* i *F. verticillioides* M-7075

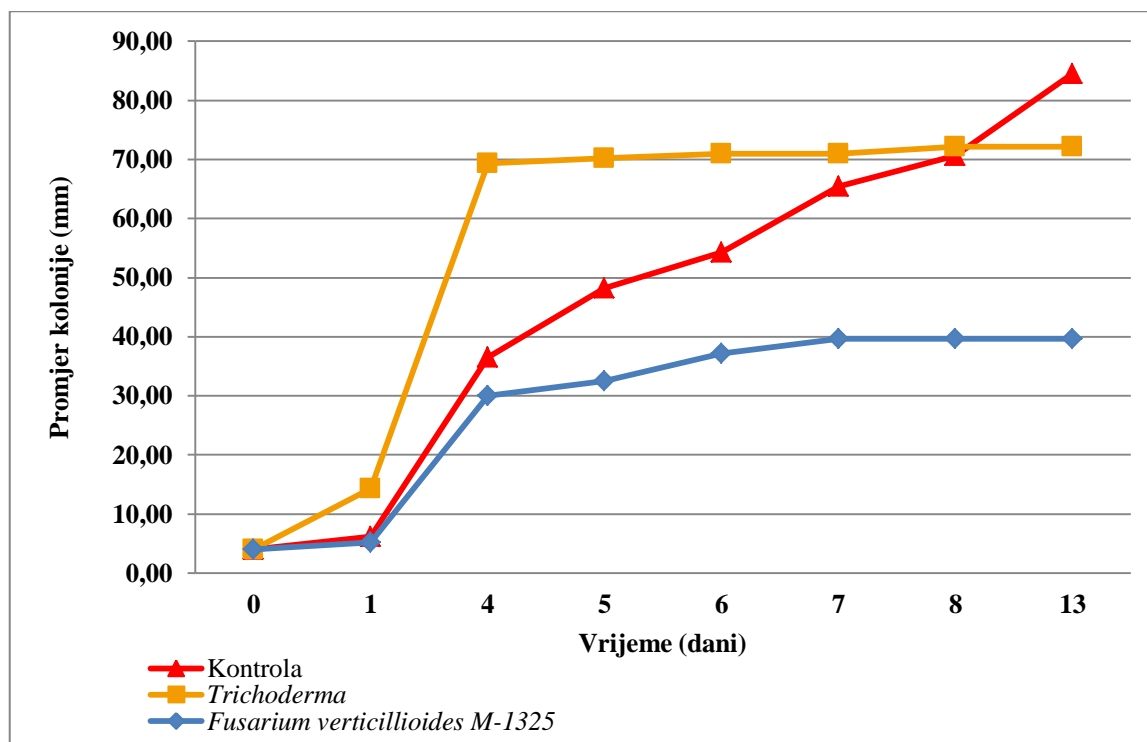
U trećem tretmanu (Grafikon 3.) ispitan je utjecaj roda *Trichoderma* na *F. verticillioides* M-7075. U ispitanom tretmanu zabilježena je inhibicija micelijskog rasta *F. verticillioides* M-7075 od 40% u odnosu na kontrolu iako nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitanog tretmana i kontrole (Tablica 3).

Tablica 3. Odnos *Trichoderma* sp. i *F. verticillioides* M-7075

| Tretman | stopa rasta (mm/dan) | p |
|----------------------------------|-------------------------|----|
| kontrola | 3,47 | |
| <i>F. verticillioides</i> M-7075 | 2,10 | ns |

ns- not significant

3.2.2. *Trichoderma* sp. i *F. verticillioides* M-1325



Grafikon 4. Micelijski rast *Trichoderma* i *F. verticillioides* M-1325

U ovom ispitanom tretmanu (Grafikon 4.) zabilježena je inhibicija micelijskog rasta *F. verticillioides* FRC M-1325 od 39% u odnosu na kontrolu iako nije utvrđena statistički značajna razlika između ispitanog tretmana i kontrole (Tablica 4).

Tablica 4. Odnos *Trichoderma* sp. i *F. verticillioides* M-1325

| Tretman | stopa rasta (mm/dan) | p |
|---------------------------------|--------------------------------|----------|
| kontrola | 3,56 | |
| <i>F.verticillioides</i> M-1325 | 2,15 | ns |

ns- not significant



Slika 9. Tretman *Trichoderma* i *F. verticillioides* M-1325 7 dana od postavljanja

(13.2. 2020.) (Izvor: Autor)

Rezultati drugih istraživača utvrdili su značajnu antifungalnu aktivnost ispitivanih rodova *Trichoderma* u odnosu na *F. verticillioides* (Saravanakumar i sur., 2016.; Galletti i sur., 2019.) Saravanakumar i sr. (2016.) proveli su istraživanje inhibicije rasta *F. oxysporum* f. *sp. cucumerinum* uz pomoć roda *Trichoderma*. Krastavac (*Cucumis sativus* L.) važna je povrtna kultura koja se uzgaja u cijelom svijetu, međutim, njegova je produktivnost u velikoj mjeri potisnuta navedenim fitopatogenom. Isti autori ispitali su 100 izolata roda *Trichoderma* kao potencijalna sredstva biokontrole. Korištene su i *in vitro* i *in vivo* metode, nakon čega je uslijedila analiza sinergističkog učinka enzima koji razgrađuju staničnu

stijenku i njegovih sekundarnih metabolita. Od 100 ispitivanih izolata roda *Trichoderma* odabrano je 10 izolata s više od 85% stope inhibicije za *in vivo* pokus antagonizma u stakleniku (Saravanakumar i sr., 2016.). Utvrđeno je kako *T. asperellum* soj CCTCC-RW0014 ima dobar potencijal biokontrole s visokim postotkom smanjenja bolesti od 71,67%. U ovom radu zaključeno je da je *T. asperellum* CCTCC-RW0014 veoma potencijalni soj za kontrolu *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* i pri čemu je poželjna daljnja studija mehanizma interakcije između spojeva koji su dobiveni iz roda *Trichoderma* i biljaka-domaćina (Saravanakumar i sr., 2016.).

Galletti i sur. (2019.) proveli su istraživanje o antifungalnom učinku roda *Trichoderma* na fitopatogenu gljivu *F. verticillioides*. Primjena sredstava za biološku kontrolu, poput antagonističkih i/ili mikroorganizama koji induciraju rezistenciju, opcija je koja donosi smanjenje gljivične infekcije i onečišćenja zrna na održiv i ekološki prihvatljiv način (Galletti i sur., 2019.). Dobro je poznato da su vrste *Trichoderma* nepatogene gljive koje mogu antagonizirati biljne patogene i izazvati sistemsku rezistenciju kod biljaka (Galletti i sur., 2019.). Cilj navedenog rada bio je provjeriti utječe li *Trichoderma spp.*, primijenjena na zrnu kukuruza, na rast biljake i utječe li antifungalno na *F. verticillioides*. Dva izolata *Trichoderma gamsii* (IMO5 i B21) i jedan izolat *Trichoderma afroharzianum* (B75), odabrani kako zbog antagonizma, tako i zbog sposobnosti smanjenja infekcija korijena (infekcija gljivama roda *Fusarium*), značajno su smanjili razvoj patogena, u usporedbi s kontrolom (Galletti i sur., 2019.). Galletti i sur. (2019.) spoznali su da su mehanizmi djelovanja specifični za soj, s IMO5 povećava se razina transkript marker gena inducirane sistemske rezistencije (ZmLOX10, ZmAOS i ZmHPL), dok B21 pojačava markere gena sistemske stečene rezistencije (ZmPR1 i ZmPR5), što se pokazalo prilikom njihovih mjerenja. Štoviše, IMO5 je pospješio rast biljaka, dok je B21 uspio značajno smanjiti sadržaj fumonizina. Rezultati ovog rada daju nove dokaze da je tretiranje sjemena gljivom *T. gamsii* obećavajući alat za suzbijanje *F. verticillioides* koji se uklapa s uzgojem žitarica (Galletti i sur., 2019.).

4. ZAKLJUČAK

Gljive roda *Trichoderma* posjeduju različite mehanizme kojima povoljno utječu na rast i razvoj kultiviranih biljaka. Svojim djelovanjem pospješuju razvoj biljke, štite je od patogenih gljiva i umanjuju stresne uvjete. Svojom sposobnošću mikoparazitizma, antibioze i kompeticije djeluju na patogene mikroorganizme. U ovom istraživanju je utvrđeno kako *Trichoderma* sp. iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju nema značajni utjecaj u suzbijanju patogena kao što su: *F. graminearum* 110250, *F. graminearum* FRC R-05796, *F. verticillioides* M-7075 i *F. verticillioides* FRC M-1325. Međutim potrebno je uložiti daljnji napor u reizolaciji drugih autohtonih vrsta i sojeva roda *Trichoderma* koji bi potencijalno imali veću djelotvornost od zabilježenih u ovome istraživanju.

5. POPIS LITERATURE

1. Aghighi, S., Shahidi Bonjar, G. H., Rawashdeh, R., Batayneh, S., Saadoun, I. (2004.): First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(4), 463-471.
2. Akrami, M., Golzary, H., Ahmadzadeh, M. (2011.): Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, 10 (14), 2653-2658.
3. Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codom A.C. (2004.): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7, 249-260.
4. Błaszczyk L., Strakowska, J., Chełkowski J., Gąbka-Buszek A., Kaczmarek J. (2016.): *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. *Journal of Applied Genetics*, 57, 397-407.
5. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2006.): Praktikum iz fitopatologije, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
6. Galletti, S., Paris, R., Chianchetta, S. (2019.): Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. *Microbiological Research*. Wendland, J. (ur.), Elsevier GmbH., Munich, Njemačka, 233, 126406
7. Gams, W., Bissett, J. (2015.): Morphology and identification of *Trichoderma*. *Pest management in horticultural ecosystems*, 21, 194-202.
8. Harman, G. E., (2011): *Trichoderma* for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to Commercialized Products. Cornell University, Geneva, New York 14456
9. Harman, G. E. (2006.): Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 96, 190-194.
10. Kubicek C. P., Penttilä M. E. (1998.): Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. Taylor and Francis Ltd., London, 2, 49-72.

11. Kumar A., R., Shukla P., Singh A. K., Singh N.K., Dubey A. (2009.): Use of essential oil from *Mentha arvensis L.* to control storage moulds and insects in stored chickpea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2643-2649.
12. Li, Y., Sun, R., Yu, J. et al. (2016): Antagonistic and Biocontrol Potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 Against the Maize Stalk Rot Pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 56, 318-327.
13. Monte, E. i Llobell, A. (2003.): *Trichoderma* in organic agriculture. *Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate)*, 725-733.
14. Persoon, C.H. (1794): *Disposita methodica fungorum*. *Neues Magazin für die Botanik*, 1, 81–128.
15. Saravanakumar, K., Chuanjin, Y., Chen, J., Dou, K., Wang, M., Li, Y. (2016.): Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological control*. Desneux, N., Eubanks, M.D., Hoffmann, J.H., Lewis, E.E., Liu, J., Melnick, R., Michaud, J.P., Pell, J.K. (ur.), Elsevier Inc., Amsterdam, Nizozemska, 37-46.
16. Saravanakumar, K. i sur. (2017): Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific Reports*, 7, 1771.
17. Schuster, A., Schmoll, M. (2010.): Biology and biotechnology of *Trichoderma* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 787-799.
18. 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. *Virology & Mycology*, 3, 1.
19. Smolinska, U., Kowalska, B., Oskiera, M. (2007.): The effectivity of *Trichoderma* strains in the protection of cucumber and lettuce against *Rhizoctonia solani*. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 67, 81-93.
20. Strakowska J., Błaszczuk L., Chełkowski J. (2014.): The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *Journal of Basic Microbiology*, 54 (Suppl. 1), S2–13.
21. Tian, Y. i sur. (2018): Antagonistic and Detoxification Potentials of *Trichoderma* Isolates for Control of Zearalenone (ZEN) Producing *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2710.

22. Tomasović, S., Vlahović, V., Sesar, B. (1994.): Fuzarioze pšenice sa težištem na zarazu klasa. Sjemenarstvo 11, 6, 517-546.