

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Klasan

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

Smjer Ekološka poljoprivreda

UTJECAJ ENDOFITNE GLJIVE *Fusarium verticillioides* NA PORAST PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Klasan

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

UTJECAJ ENDOFITNE GLJIVE *Fusarium verticillioides* NA PORAST PŠENICE

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Klasan

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

UTJECAJ ENDOFITNE GLJIVE *Fusarium verticillioides* NA PORAST PŠENICE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Endofitne gljive	3
2.2. Biologija i ekologija	4
2.3. Rasprostranjenost	5
2.4. Ekološka uloga	5
2.5. Rod <i>Fusarium</i>	6
2.5.1. <i>Fusarium verticillioides</i>	7
2.6. Tradicionalne metode korištene u istraživanjima endofita	8
2.7. Uzorkovanje	9
2.8. Molekularne metode za istraživanje endofita	11
2.8.1. Molekularna identifikacija sterilnog micelija	12
2.8.2. Molekularna identifikacija izolirane zajednice	12
2.8.3. Molekularna detekcija endofita unutar biljnog tkiva	12
2.8.4. Visokopropusno sekvenciranje u istraživanjima endofita	13
2.8.5. DNK crtični kod (eng. barcode) za endofitne gljive	14
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. Uzgoj endofitnih gljiva	16
4. REZULTATI	21
4.1. Mjerenje	21
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA	29
8. SAŽETAK	31
9. SUMMARY	32
10. POPIS SLIKA, TABLICA I GRAFIKONA	33
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Endofitne gljive su važna komponenta svih poznatih biljnih vrsta i imaju značajnu ulogu u prirodnom okolišu. Nažalost, naše poznavanje raznolikosti endofita ograničeno je tradicionalnim tehnikama koje se koriste u istraživanjima raznolikosti endofita (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

U ekološkoj proizvodnji sve se više primjenjuju endofitni organizmi, to su najčešće gljive i bakterije koje se apliciraju na biljke kao biološka sredstva za poboljšanje rasta i otpornosti na biljne bolesti (Jelenić i Ilić, 2019.). Mikrobiološki inženjering predstavlja unošenje mikroorganizama u biljke kako bi poboljšao razvoj i otpornost na nepovoljne uvjete okoliša i štetne organizme.

Pojam mikrobiom predstavlja zajednicu mikroorganizama unutar biljke. Organizme koje se nalaze u biljci, ali ne izazivaju simptome biljnih bolesti nazivamo endofitima. Smatra se da u prirodi ima preko milijun vrsta endofitnih organizama. Endofiti potiču rast biljaka kroz poboljšanje fiksacije dušika, proizvodnju fitohormona, solubilizaciju fosfata te poticanje tolerancije na abiotske i biotske stresove (Jelenić i Ilić, 2019.).

Endofitne mikrobne populacije sintetiziraju velik broj sekundarnih metabolita te spojeve s antifungalnim, antibakterijskim i insekticidnim svojstvima. Endofite možemo pronaći u svim dijelovima biljke i u svim biljkama (Jelenić i Ilić, 2019.).

Pojam endofit odnosi se na sve organizme koji se javljaju unutar biljnog tkiva, a razlikuju se od epifita koji žive na površini biljke. Endofiti su mutualisti koji koloniziraju zračne dijelove živih biljnih tkiva i ne uzrokuju simptome bolesti što iz endofita isključuje patogene i mikorizne gljive.

Međutim, latentni patogeni za koje je poznato da žive u tkivima domaćina bez uzrokovanja bilo kakvih simptoma, također su endofiti. Endofiti su naveliko proučavani u raznim zemljopisnim i klimatskim zonama zbog svoje sveprisutnosti u širokom rasponu rodova i vrsta uključujući i

raznolike ekosustave poput mahovine, paprati, trave, četinjača i lišajeva. Endofitne gljive uglavnom čine pripadnici *Ascomycote*, *Basidiomycote*, *Zygomycote* i *Oomycote* koji mogu proizvesti razne bioaktivne spojeve, promovirati rast domaćina i otpornost na okolišni stres te razlagati otpadne tvari zbog čega endofitne gljive imaju ključnu ulogu u recikliranju materijala i energije.

Kako su biljna tkiva višeslojna te prostorno i vremenski raznolika, podržavaju raznolike endofitne mikrobiote koje onda stvaraju specijaliziranu zajednicu s raznim biljnim vrstama (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

Neki endofiti koloniziraju biljku, nalaze se unutar njezinog tkiva i uzimaju joj nutrijente, biljka dobiva sposobnost za obranu na način da proizvodi određene funkcionalne metabolite. Biljke koje su zaražene endofitima rastu brže od onih koji nisu zaraženi. Postoje i endofiti koji pozitivno djeluju na adaptibilnost biljke, na način da povećavaju njezinu toleranciju na negativne učinke okoliša, te povećavaju otpornost na fitopatogene (Ižaković, 2017.).

Neki endofiti sposobni su pružiti biljci zaštitu od sisavaca, nematoda, insekata i dr. Kako bi se spriječila ili ublažila pojava biljnih bolesti koriste se različiti pristupi, a jedna od njih je biološka kontrola koja označava upotrebu entomopatogenih nematoda, mikrobnih patogena ili živih grabežljivih insekata. U biološkoj kontroli koriste se i prirodni proizvodi koji su ekstrahirani ili fermentirani iz različitih živih organizama (Ižaković, 2017.).

Do danas je opisano više od 1 000 000 različitih vrsta gljiva. Možemo ih pronaći u vodi, zraku, zemlji, u biljkama, životinjama i u čovjeku. Dijelimo ih na saprofite, nekrofite, simbionte i parazite te su oni najpoznatiji uzročnici biljnih bolesti (Pusztahelyi i sur., 2015).

Većina gljiva nastala je reprodukcijom spora. Tijelo im se sastoji od mikroskopskih cjevastih stanica koje nazivamo hife. Spadaju u heterotrofe te ugljik prikupljaju iz drugih organizama. Neke gljive parazitiraju na drugim biljkama te uništavaju zdrave stanice biljke i hrane se njihovim nutrijentima, njih nazivamo nekrofiti (Carris i sur., 2012.).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Endofitne gljive

Tan i Zou, 2001. utvrdili su da endofitni organizmi, najčešće bakterije i gljive koji cijeli svoj život ili samo dio života provedu kolonizirajući inter ili intracelularne dijelove zdravog tkiva biljke u cijelosti borave unutar tkiva biljke, stabljike ili lišća te nastaju spore biljaka ili uzrokuju starenje tkiva biljke.

Redecker i sur., 2000. utvrdili su da dokazi koji su pronađeni o mikroorganizmima koji su povezani sa biljkama u fosiliziranim tkivima lišća i stabljika, upućuju da se odnos endofita i biljke razvijao još od vremena kada su se više biljke prvi put pojavile na zemlji.

Matić i sur., 2020. utvrdili su da brojnost unutar roda *Fusarium* i njihova raznolikost čine ovaj rod neiscrpnim područjem istraživanja. Četiri vrste roda *Fusarium* nalaze se među deset najvažnijih biljnih parazita na temelju njihova ekonomskog značenja.

Stone i sur., 2004. utvrdili su da endofitne gljive karakteristično pokazuju prolongirano, latentno razdoblje u kojem rast i kolonizacija privremeno prestaju nastavljajući se nakon fizičke ili sazrijevujuće promjene u domaćinu. Ovaj epizodni rast definirajuća je značajka endofita.

Ilić i sur. 2012. godine su determinirali *Fusarium* vrste izolirane sa korova koji rastu na poljoprivrednim tlima te ispitali patogenost za pšenicu 30 odabranih *Fusarium* izolata. U istraživanju je utvrđeno da jedan dio izolata pozitivno djeluje na zrna pšenice. Ti su izolati korišteni u svrhu daljnjih istraživanja.

Više biljke nastanjuju prostorno i vremenski raznolika staništa, a podržavaju brojne zajednice mikroorganizama. Gljive su dominantne komponente tih skupova, a koloniziraju folijarne površine (epifiti), unutarnja tkiva lišća (folijarni endofiti), koru (endofiti kore) i drvo (endofiti ksilema i razgrađivači drveta). Sve veći interes za neobjašnjeno nastanjivanje unutarnjih tkiva zdravih biljaka endofitnim gljivama, budi saznanje da u višim biljkama vjerojatno postoji rezervoar neotkrivenih gljiva (Stone i sur., 2004.).

Tijekom posljednjih 30 godina, pojmovi endofit i endofitne gljive često su se pojavljivali u mikološkoj literaturi kako bi opisali unutarnje gljive živih biljaka. Iako podrijetlo ovih pojmova seže još u 19. stoljeće, njihovo suvremeno značenje razlikuje se od izvornog. Danas se pojmovi često povezuju s određenom vrstom domaćina, taksonomskom skupinom ili vrstom tkiva (npr. endofiti kore, endofiti trave) (Stone i sur., 2004.).

Općenito, pojam endofitne gljive primjenjuje se na gljive sposobne kolonizirati živo i zdravo biljno tkivo bez izazivanja negativnih učinaka. Ova definicija uključuje gotovo cijeli spektar simbiotskih interakcija između gljiva i biljaka: parazitizam, komenzalizam i mutualizam. Kod trave domaćina (primarno *Poaceae*), riječ endofit korištena je za označavanje određene vrste sustavne, nepatogene simbioze (Stone i sur., 2004.).

Endofiti trave pružaju svojim domaćinima brojne pogodnosti kao što su zaštita od biljojeda i patogena. Taksonomski, endofitne gljive su prvenstveno *Neotyphodium anamorphs of Balansiae (Clavicipitaceae)*, a koloniziraju tkiva lista, vrha i korijena tijekom hladnih sezona i prenose se u sjemenu njihova domaćina (Stone i sur., 2004.).

2.2. Biologija i ekologija

Mnoge gljive koje se obično klasificiraju kao endofiti, šumski patolozi smatraju manjim ili sekundarnim patogenima. Njihova pojava, kako u zdravom tako i u bolesnom tkivu, stvara nesigurnost u granici razdvajanja endofita, fakultativnih patogena i latentnih patogena. Razlike u ponašanju između endofitnih gljiva i latentnih patogenih gljiva su neznatne.

Naime, patogene gljive sposobne za okupiranje domaćina bez simptoma ili sojeve s oštećenom virulencijom možemo smatrati endofitima. Endofitne gljive karakteristično pokazuju prolongirano, neupadljivo razdoblje u kojem rast i kolonizacija privremeno prestaju nastavljajući se nakon fizičke ili sazrijevajuće promjene u domaćinu. Ovaj epizodni rast definirajuća je značajka endofita (Stone i sur., 2004.).

2.3. Rasprostranjenost

Gljivična ispitivanja tijekom posljednjih 20 godina pokazala su da je endofitska kolonizacija zemljišnih biljaka sveprisutna. Endofiti su prisutni na biljkama koje rastu u tropskim, umjereno hladnim i sjevernim šumama, a javljaju se u mahovinama, papratima, brojnim kritosjemenjačama i golosjemenjačama uključujući tropske palme, širokolisna stabla, raznolike zeljaste jednogodišnje biljke te mnoge listopadne i zimzelene trajnice (Stone i sur., 2004.).

Endofitne gljive mogu biti raznolike u izuzetno malim razmjerima. Jedna iglica četinjača može ih sadržavati nekoliko desetaka vrsta. Prisutnost endofitnih gljiva očituje se unutarnjim, mikroskopskim hifama, a vidljiva je izvana samo kada sporuliraju. Nedostatak osnovnih taksonomskih podataka glavna je prepreka ekološkim istraživanjima endofitnih gljiva. Endofiti su fiziološki mirni tijekom života listopadnih i zimzelenih tkiva domaćina i uglavnom se nalaze u većem broju u starijim tkivima. Mlado lišće uobičajeno je manje kolonizirano (Stone i sur., 2004.).

2.4. Ekološka uloga

Ekološke uloge endofitnih gljiva su raznolike. Endofiti su opisani kao mutualisti koji štite i trave i četinjače protiv biljojeda. Također, mnoge od tih gljiva proizvode biološki aktivne sekundarne metabolite. Više od 30 % endofitskih izolata pokazalo je antibakterijsko ili protugljivično djelovanje. Često proizvode spojeve s visokom biološkom aktivnošću, uključujući citohalazine i indol alkaloide.

Endofiti koji ne nastanjuju trave, proizvode antimikotike ili antibakterijske tvari kao i insekticidne spojeve, *in vitro*. Međutim, nije poznato proizvode li se ovi metaboliti u biljkama tijekom razdoblja mirnog zauzimanja tkiva domaćina od strane endofita ili u dovoljnim koncentracijama da iskoriste domaćina u zaštitnom mutualizmu (npr. odvrćanjem insekata biljojeda).

Prožimajuća sistemska kolonizacija tkiva domaćina endofitnim hifama osigurava da biljojedi, bilo sisavci bilo mali člankonošci, susretnu gljivične metabolite u obroku. Zaključno, opća uloga endofita u zaštiti domaćina još uvijek nije određena (Stone i sur., 2004.).

2.5. Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* obuhvaća heterogenu skupinu gljiva važnih u poljoprivredi, medicini te prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Ove vrste prisutne su svuda i dijelimo ih na saprofite, endofite i patogene. Pripadaju patogenima velikog broja biljaka. Neke *Fusarium* vrste proizvode sekundarne metabolite koji uključuju mikotoksine, a to su trihoteceni, fumonizini i zearalenoni. Mikotoksini su neophodni za rast gljiva (Ižaković, 2017.).

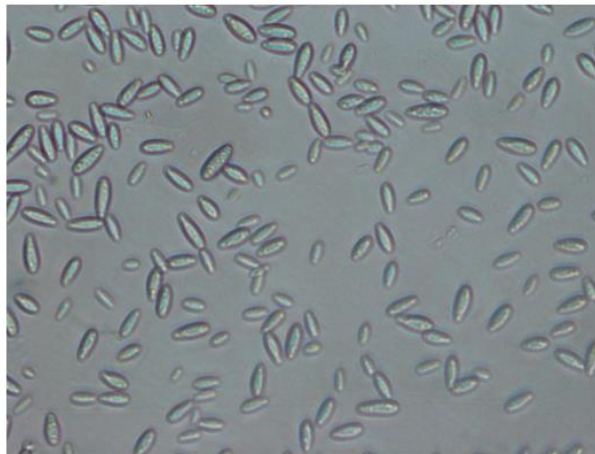
Rod *Fusarium* sadrži važne agronomske patogene, proizvođače mikotoksina i patogena ljudi. Većina ih se može klasificirati kao hemibiotrofi, jer infekcija u početku nalikuje na infekciju biotrofnih patogena, oni se hrane živim tkivom, a kasnije ubijaju i konzumiraju stanicu domaćina te postaju nekrofiti. Postoje nekoliko načina preživljavanja ovog roda, a neka od njih su brz kapacitet za promjenu (morfološku i fiziološku).

Razlikujemo patogene i nepatogene oblike. Nepatogeni oblici mogu kolonizirati korteks korijena biljaka bez simptoma bolesti te preživljavaju u živom tkivu. Fitopatogene vrste mogu izazvati velik broj biljnih bolesti, neke od njih su trulež korijena, venuće provodnih tkiva, žućenje i lisna nekroza (Ižaković, 2017.).

2.5.1. *Fusarium verticillioides*

Na PDA podlozi u početku razvija bijeli micelij, nakon nekog vremena može postati ljubičast. Boja podloge može biti bezbojna, siva, svijetlo ljubičasta te crna. Također se mogu razviti i crne sklerocije. Na CLA podlozi stvara svijetlo narančaste sporodohije. *Fusarium verticillioides* producira većinom jednostanične, rjeđe dvostanične, ovalne ili na jednom kraju sužene mikrokonidije.

Jednostanične mikrokonidije veličine su 5,0-11,7 x 1,6-3,5 μm , s jednom septom 6,9-14,1 x 1,8-3,2. Nastaju na monofijalidama, u nizovima ili rjeđe u lažnim gljivicama. Mogu sadržavati tri do sedam septi, najčešće tri i pet septi. Veličina makrokonidija s tri septe se kreće od 26,1-34,6 x 3,2-3,8, a s pet septi od 28,0-41,9 x 3,0-4,2. Najčešće ih teško pronalazimo. *F. verticillioides* ne stvara hlamidiospore, a neki izolati mogu stvoriti proširenja u hifama koje mogu zamjeniti za hlamidiospore (Poštić, 2012.).



Slika 1. Mikrokonidije *F. verticillioides* (Izvor: Poštić, 2012.)

U istraživanje koje je provedeno 2012. godine izolirane su *Fusarium* vrste sa korova koji rastu na poljoprivrednim tlima te je odabrano 30 *Fusarium* izolata za pšenicu na osnovu koje se ispitala njihova patogenost. U istraživanju je utvrđeno da jedan dio izolata pozitivno djeluje na zrna pšenice. Ti su izolati korišteni u svrhu daljnjih istraživanja (Ilić i sur., 2012.).

2.6. Tradicionalne metode korištene u istraživanjima endofita

Tradicionalno, endofitne gljive unutar biljnih tkiva mogu biti prepoznate kroz dvije osnovne tehnike; metodu izravnog promatranja i metodu ovisnu o uzgoju. Kod metode izravnog promatranja, endofitne gljivične strukture unutar biljnog tkiva izravno se ispituju pod svjetlosnim i elektronskim mikroskopom koji može pokazati sve endofitne mikrobiote, a posebno biotrofne gljive koje se ne mogu uzgajati na uobičajenim podlogama. Međutim, većina endofitnih gljiva unutar biljnog tkiva ima samo hifalnu strukturu, stoga ih se ne može taksonomski identificirati prema morfologiji zbog nedostatka struktura za stvaranje spora i seksualnih/aseksualnih spora (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

Također, endofitni izolati ne mogu se dobiti kao mikrobnii izvor za daljnju upotrebu, zato se ova metoda obično ne koristi u istraživanju raznolikosti endofita. Za razliku od metode izravnog promatranja, metode ovisne o uzgoju rutinski se koriste u studijama raznolikosti endofita. Kod metode ovisne o uzgoju, izolacija je kritičan i značajan korak. Živa biljna tkiva podvrgavaju se serijskom postupku površinske sterilizacije kako bi se uklonili svi organizmi s površine biljke. Gljive iz unutrašnjosti izoliraju se inkubacijom biljnih uzoraka na hranjive podloge (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

Metode ovisne o uzgoju uključuju (1) temeljito pranje biljnog tkiva vodom iz slavine kako bi se uklonile prijanjajuće čestice tla, krhotine i veliki epifiti, (2) sterilizaciju biljnog tkiva radi eliminiranja svakog mikroorganizma na površini domaćina, (3) izolaciju endofitnih gljiva koje izrastaju iz uzoraka na hranjivom agaru, (4) pročišćavanje i sporulaciju endofitnih izolata pod različitim uvjetima inkubacije i (5) identifikaciju endofitnih gljiva na temelju morfoloških značajki.

Kako bi bio učinkovit, proces izolacije mora biti prilagođen vrsti biljke, odnosno gljive. Preporuča se koristiti različite podloge kao što su standardni agar dekstroze i krumpira, agar s ekstraktom slada, kao i medij s biljnim tkivom ili ekstraktom. Za povećanje gljivične raznolikosti, sterilizirano biljno tkivo reže se na sitne segmente (promjera oko 5 mm), macerira se ili melje, zatim se prebacuje na hranjivi agar za inkubaciju što može otkriti brzo i sporo

rastuće gljive. Također, veličina tkiva i broj biljnih uzoraka mogu utjecati na uočenu raznolikost gljiva i sastav zajednice (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

Metode za proučavanje obrazaca infekcije i kolonizacije endofitnim gljivama u osnovi su identične metodama za proučavanje gljivičnih biljnih patogena. Pokazalo se da je učestalost infekcije za određene domaćine povezana sa starosti lista. Metoda koja se najčešće koristi za otkrivanje i kvantificiranje endofitnih gljivica je izolacija iz površinski steriliziranog tkiva domaćina. Ova metoda trenutno je najpraktičniji pristup, iako određene skupine mogu ostati neotkrivene. Na identifikaciju organizama iz prirodnih supstrata utječu postupci uzorkovanja, metode izolacije, sastav medija i fiziološke prilagodbe gljiva (Stone i sur., 2004.).

Druga metoda za identifikaciju je molekularna taksonomija i temelji se isključivo na izolacijskim podacima. Metode izolacije mogu dati približni prikaz strukture gljivične zajednice, no izravno mikroskopsko ispitivanje često otkriva da je prisutno mnogo više pojedinačnih infekcija (Stone i sur., 2004.).

2.7. Uzorkovanje

Vrsta domaćina, interakcije domaćin-endofit, interspecifične i intraspecifične interakcije endofita, vrsta tkiva i starost tkiva, stanište i rasprostranjenost vrste te kolonizacija endofita utječu na učinkovitost uzorkovanja za otkrivanje endofitnih gljiva (Stone i sur., 2004.).

Bissegger i Sieber (1994.) podijelili su dijelove tkiva floema u 25 jedinica te zabilježili obrazac rasta gljivica sa svake jedinice. Vidljiva je okupacija osam vrsta endofita koja ukazuje na diskontinuiranu raspodjelu pojedinih skupina unutar uzorka.

Što je jedinica uzorkovanja manja, to je veći oporavak različitih vrsta genotipova i obratno. Što je veća jedinica uzorkovanja, to je veći potencijal za propustiti rijetke ili sporo rastuće vrste i oporaviti mješovite genotipove iste vrste (Stone i sur., 2004.).

Starije lišće vjerojatno će sadržavati veću raznolikost vrsta od mlađeg lišća. U tom slučaju, u višegodišnjim vrstama očekuje se veća raznolikost nego u jednogodišnjim biljkama. Tako će biljke sa zimzelenim lišćem vjerojatno sadržavati veću raznolikost od listopadnih biljaka.

Relativna postojanost mikrobiote domaćina u njezinom geografskom rasponu i među dobnim razredima sugerira da se uzorkuje mnogo različitih vrsta domaćina na jednom području. Ne preporuča se opsežno uzorkovati jednog domaćina u cijelom svom rasponu (Stone i sur., 2004.).

Domaćin će nerijetko imati jedan do nekoliko endofita koji su jedinstveni za tog, određenog domaćina. Tako biološka raznolikost endofitnih gljiva također može biti funkcija broja različitih vrsta uzorkovanih domaćina (Stone i sur., 2004.).

Brze promjene u kolonizaciji endofita vjerojatno se neće javiti odmah nakon skupljanja. Ipak, važno je pažljivo postupati s uzorcima te ih obraditi što je brže moguće nakon skupljanja, obično u roku od 48 sati. Uzorke treba osušiti na zraku te ukloniti svu površinsku vlagu prije transporta i skladištenja (Stone i sur., 2004.).

Tijekom transporta, uzorke treba držati hladne i suhe. Preporuča se držati uzorke u vrećama za prikupljanje pamuka ili papira. Ukoliko se koriste plastične vrećice, potrebno ih je ostaviti otvorenima radi cirkulacije zraka i sprječavanja kondenzacije te eventualnog rasta plijesni (Stone i sur., 2004.).

Veličina jedinica za uzimanje uzoraka i postupci površinske sterilizacije razlikuju se prema preferencijama ispitivača, vrsti domaćina i vrsti uzorkovanog tkiva domaćina. Površinska sterilizacija biljnog materijala obično podrazumijeva tretiranje biljnog materijala jakim oksidansom ili dezinfekcijskim sredstvom na kratko, nakon čega slijedi ispiranje kako bi se uklonio ostatak sredstva. 2-10 % otopina izbjeljivača na bazi klora iz kućanstva, najčešće se koristi kao površinski sterilan (Stone i sur., 2004.).

Slični tretmani s oksidantima uključuju 3% H₂O₂, 2% KMnO₅ ili 0,03% octenu kiselinu. Učinkovitost površinske sterilizacije često se poboljšava kombiniranjem sa sredstvima za

vlaženje. 70-95 % etanol najčešće je korišteno sredstvo za vlaženje, ima ograničenu antibiotsku aktivnost i ne smije se koristiti sam kao sredstvo za dezinfekciju površine. Tkivo je potrebno ispirati 1 minutu u sterilnoj vodi ili 70-95 % etanolu nakon tretmana kako bi se uklonilo sredstvo za sterilizaciju (Stone i sur., 2004.).

Srebrov nitrat (1%) obično se koristi za površinsku sterilizaciju korijena i stabljike trava za izolaciju *Gaeumannomyces graminis*. Srebrov nitrat može se istaložiti nakon tretmana ispiranjem u 5% natrijevom kloridu. Živin klorid rijetko se koristi kao sterilant budući da je toksičan i opasan po prirodu (Stone i sur., 2004.).

Formalin (30-50%), također je nedjelotvorno sredstvo za površinsku sterilizaciju. Propilen oksid i etilen oksid zbog spore stope prodiranja korisni su za sterilizaciju prirodnih medija, sterilizaciju opreme i površinsku dezinfekciju drvenastih biljnih tkiva. Oba su materijala eksplozivna i otrovna te s njima treba rukovati krajnje oprezno (Stone i sur., 2004.).

Serijsko pranje koristi se za uklanjanje zemlje iz tkiva korijena, za uklanjanje slučajnih spora s površina listova te za uklanjanje površinske kontaminacije u slučajevima kada je poželjna netoksična metoda. To je najbolje postići koristeći veliku posudu tako da voda koja dopire energično miješa uzorak. Serijsko pranje relativno je jednostavna metoda i može se koristiti za proučavanje gljivica koje koloniziraju korijenje i lišće. Ultrazvučno čišćenje u potpunosti uklanja površinsko onečišćenje (Stone i sur., 2004.).

2.8. Molekularne metode za istraživanje endofita

Razvojem molekularne biologije pojavila se nova perspektiva u istraživanju raznolikosti endofita. Primjena molekularnih metoda, kao što su otiskivanje ili senkvencioniranje DNK, može savladati prepreke tradicionalnih metoda (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

2.8.1. Molekularna identifikacija sterilnog micelija

U tradicionalnim metodama ovisnim o uzgoju, izolati gljiva mogu se identificirati pomoću morfoloških karakteristika ako sporuliraju na mediju. Unatoč razvoju različitih metoda za promicanje sporulacije, čak do 54% od ukupnog broja izolata ne sporulira u kulturama. Budući da se klasična klasifikacija gljiva u velikoj mjeri oslanja na reproduktivne strukture, nesporulacijskim sojevima ne mogu se dodijeliti taksonomska imena.

U tom slučaju, izolati koji ne sporuliraju nazivaju se *Mycelia sterilia* i grupiraju se u morfotipove na temelju sličnih kulturnih obilježja, boje kolonija, brzine rasta i teksture. Molekularne metode mogu poboljšati prepoznavanje gljivične raznolikosti u prirodnim ekosustavima, posebno za nesporulirajuće izolate koji se ne mogu identificirati u bilo koju taksonomsku cjelinu na temelju morfologije i gube se u istraživanju raznolikosti ukoliko se koriste tradicionalne metode istraživanja (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

2.8.2. Molekularna identifikacija izolirane zajednice

Zajednica endofitnih gljiva sastoji se od širokog raspona gljivičnih koljena (lat. *phylum*) kao što su *Ascomycota*, *Basidiomycota* i *Zygomycota*. Teško je na temelju morfoloških karakteristika identificirati različite endofitne gljivice i dodijeliti im odgovarajući rod ili vrstu. Iz tog razloga, analize sekvencioniranja DNK povezane su s morfologijom i široko korištene u istraživanju raznolikosti endofita, osobito u ekološkim istraživanjima. Metode sekvencioniranja DNK mogu ubrzati prepoznavanje gljivičnih vrsta u prirodnom ekosustavu, bez obzira na sporulaciju izolata (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

2.8.3. Molekularna detekcija endofita unutar biljnog tkiva

Vrlo je vjerojatno da neke ili čak brojne endofitne gljive nikada nisu niti izolirane zbog ograničenja tradicionalnih metoda izolacije. Na primjer, neke endofitne gljive ne mogu rasti ili rasti sporo na umjetnim podlogama. Kako bi se prevladale potencijalne tehničke poteškoće,

molekularne tehnike primjenjuju se u otkrivanju endofitnih gljiva direktno unutar tkiva domaćina.

Taj postupak uključuje (1) ekstrakciju ukupnog genoma DNK (uključujući gljive i biljke) s površinski steriliziranog biljnog tkiva, (2) umnožavanje fragmenata DNK s gljivičnim primerima, (3) odvajanje produkata polimerazne lančane reakcije denaturirajućom gradijentnom gel elektroforezom (DGGE) i izrezivanje različitih traka koji predstavljaju različite taksone, (4) kloniranje produkata polimerazne lančane reakcije izravno u plazmide i prijenos u *E. coli*, (5) biranje pozitivnih klonova za različite taksone korištenjem metode DNK otiskivanja, (6) sekvenciranje reprezentativnih klonova s različitim uzorcima otiskivanja i DGGE trakama i (7) teorijsko identificiranje nizova u različite taksonomske cjeline na temelju filogenetske analize i uspoređivanja sličnosti (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

2.8.4. Visokopropusno sekvenciranje u istraživanjima endofita

Nedavno razvijeno, visokopropusno sekvenciranje (pirosekvenciranje) omogućuje metagenomske i metagenetske analize. Prednosti ove metode su brzina, relativno niska cijena i oko 100 puta veći protok uzoraka nego kod Sangerove metode, oporavak više vrsta i pružanje nepristrane kvalitativne slike o sastavu mikrobne zajednice u prirodnom ekosustavu.

Ova je metoda uspješno primjenjena u proučavanju raznolikosti gljivica u prirodi, npr. kliničkih gljivica, filofera, gljiva nastanjenih na drvetu, gljiva u tlu, slatkovodnih gljiva i mikoriznih gljiva. Pirosekvenciranje prvi je put korišteno u istraživanju endofitnih gljiva *Atriplex canescens* i *Atriplex torreyi* var. *griffithsii*.

Visokopropusno sekvenciranje predstavlja nevjerojatan tehnološki podvig koji obećava preoblikovanje mikologije, ali jedinstvenu strukturu za obradu i interpretaciju rezultata u taksonomskom smislu potrebno je implementirati i standardizirati (Xiang i Liang-Dong Guo, 2012.).

2.8.5. DNK crtični kod (eng. barcode) za endofitne gljive

DNK sustavi za kodiranje koriste kratku, učinkovitu i standardiziranu gensku regiju za identifikaciju vrsta. Identifikacija je jednostavna kada je slijed jedinstven za jednu vrstu i konstantan unutar svake vrste. U idealnom slučaju, DNK kodiranje trebalo bi biti jedinstveno za sve skupine organizama u svim kraljevstvima. Do danas, DNK kodiranje uspješno se koristi u životinjskom carstvu.

Mikolozi su procijenili različite fragmente gena DNK za gljivično DNK kodiranje. Korištenje DNK crtičnog koda ima mnoge neosporive prednosti, poput velikog broja dostupnih baza podataka, ali i mnoge nedostatke kao što su različite inter- i intra- specifične udaljenosti među različitim grupama gljiva i potencijalno pogrešno imenovanje organizama. Međutim, kodiranje DNK u studijama endofita pokazuje veliki potencijal za istraživanja raznolikosti i ekologije, unatoč određenim ograničenjima u razlikovanju vrsta (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

Endofitne gljive obuhvaćaju raznoliku skupinu vrsta koje postoje u različitim ekosustavima, unutar biljnih tkiva. Geografske razlike u raznolikosti endofita, sastavu zajednice i preferenciji domaćin/tkivo nisu dobro dokumentirani. Veliku većinu endofita tek treba adekvatno okarakterizirati. Mehanizam funkcioniranja endofita još uvijek nije dobro razumljiv.

Raznolikost i sastav zajednice endofitnih gljiva istražuju se metodama ovisnima o uzgoju, ali i molekularnim tehnikama. Međutim, korištene metode mogu ozbiljno utjecati na uočenu raznolikost endofita te je potrebno istaknuti metodološke probleme. Kako bi se dobila kvalitetna slika o sastavu zajednice endofita, potrebno je koristiti obje tehnike – i tradicionalne i molekularne.

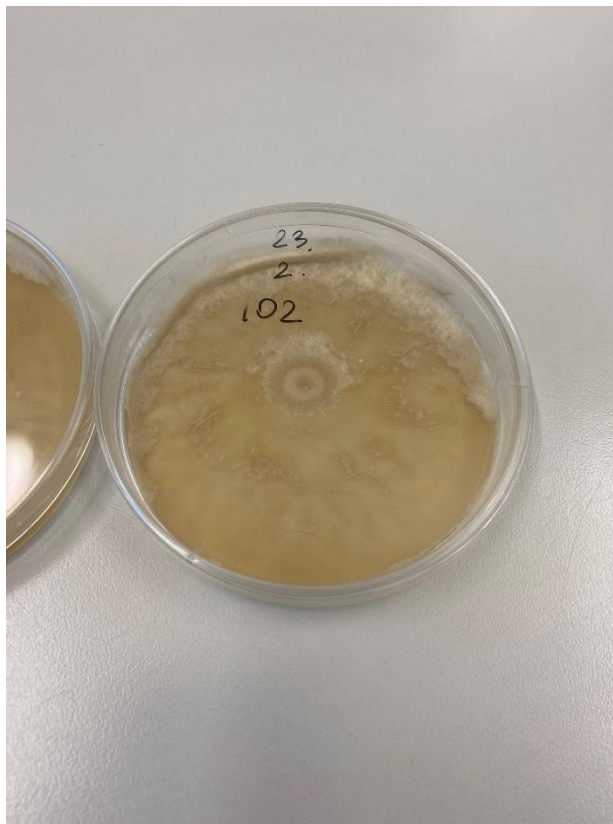
Ipak, najšire primjenjiva trebala bi biti metoda visokopropusnog sekvenciranja koja ima potencijalne prednosti u odnosu na tradicionalnu Sangerovu metodu, u smislu cijene, vremena, protoka uzoraka, oporavka više vrsta i pružanja manje pristrane slike sastava gljivične zajednice.

Visokopropusno sekvenciranje moglo bi biti alat za istraživanje interakcija između biljaka i endofita. U budućnosti, DNK kodiranje bit će središnja i najvažnija metoda za identifikaciju gljivičnih vrsta, iako suvremeni repozitoriji sekvenci nisu optimalno prikladni zbog taksonomske nepouzdanosti i nedovoljnih anotacija u javnim bazama podataka DNK (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

3. MATERIJAL I METODE

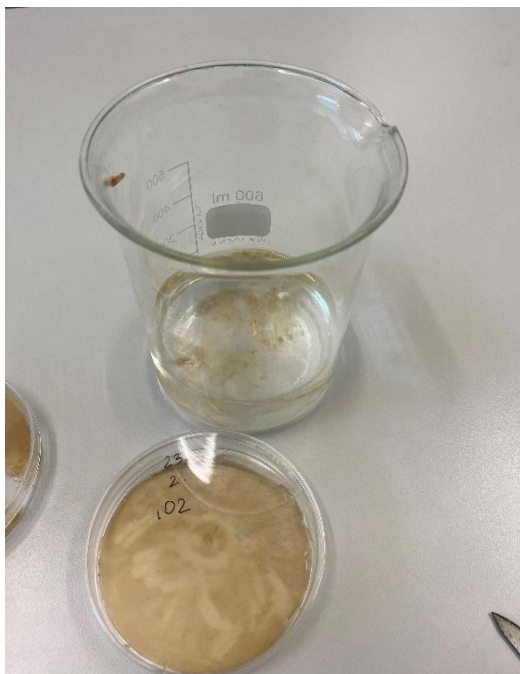
3.1. Uzgoj endofitnih gljiva

Endofitna gljiva *Fusarium verticilliloides* izolat broj 102 je izolirana s korova i prethodno je korištena u istraživanju o utjecaju endofitnih gljiva na kultivirane biljke (Ilić i sur., 2017.). *Fusarium verticilliloides* je nacijepljen sa sterilnom iglom na PDA podlogu (krumpir-dekstrozni agar, Difco) u Petrijevim zdjelicama veličine 9 cm koje su nakon toga stavljene u komoru za uzgoj gljiva s režimom 12 sati dan, 12 sati noć i temperaturom od 22 °C, vlaga 80 %.



Slika 2. *Fusarium verticilliloides* (izolat 102) (Izvor: Autor)

Nakon 7 dana micelij gljive je sastrugan s podloge pomoću skalpela i pomiješan s destiliranom vodom u mikseru kako bi se dobila suspenzija gljive.



Slika 3. Struganje gljive s podloge i miješanje s destiliranom vodom (Izvor: Autor)

Zrna pšenice su površinski sterilizirana s etilnim alkoholom kako bi se smanjila mogućnost razvitka sekundarnih organizama.



Slika 4. Sterilizacija zrna pšenice (Izvor: Autor)

U Petrijeve zdjelice je stavljen filter papir i navlažen te je u svaku stavljeno 10 sjemenki netretirane pšenice. Pokus je urađen dva puta, u 3 ponavljanja plus 3 ponavljanja kontrole. Kontrolna zrna tretirana su samo s destiliranom vodom.



Slika 5. Zrna pšenice u Petrijevim zdjelicama (Izvor: Autor)

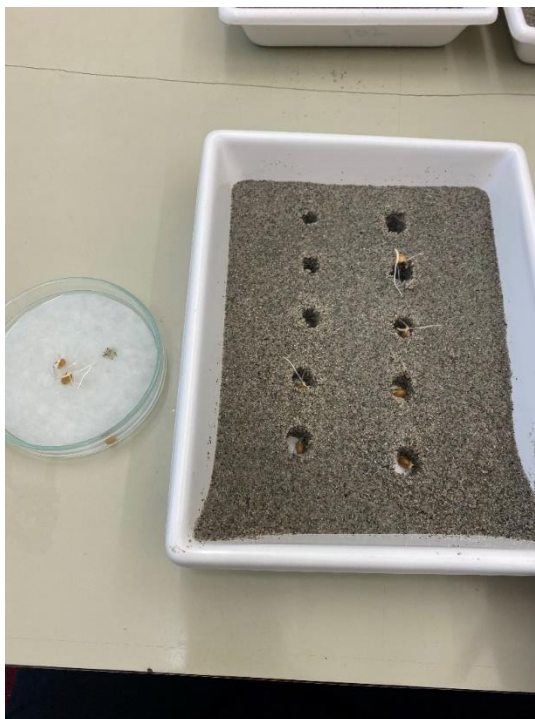
Nakon toga pšenica je stavljena u komore na temperaturu od 22 °C na 24 sata. Poslije toga pšenica je sijana u posude sa steriliziranim pijeskom. Pijesak je steriliziran u sušioniku tijekom 6 sati na temperaturi od 100 °C. Prije dodavanja zrna pšenice pijesak je natopljen vodom, te su probušene rupe u svakoj posudi stavljeno je po 10 zrna pšenice te je pokus uključivao ukupno 6 posuda posijane pšenice.



Slika 6. Priprema za sjetvu zrna pšenice (Izvor: Autor)



Slika 7. Pijesak natopljen vodom (Izvor: Autor)



Slika 8. Bušenje rupa i sjetva zrna pšenice (Izvor: Autor)

Pripremljena pšenica stajala je u komori za uzgoj biljaka 15 dana i redovito je zalijevana. Nakon toga biljke su obrađene tako što je određen broj izniklih zrna, duljina stabljike od mjesta gdje počinje korijen, broj listova i duljina listova te masa svježe tvari. Pokus je ponovljen dva puta i nakon toga vrijednosti su statistički obrađene.

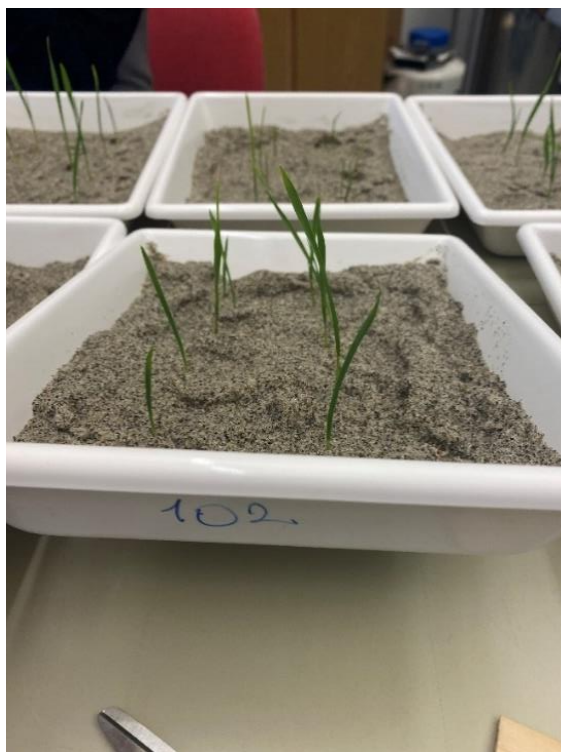


Slika 9. Komora (Izvor: Autor)

4. REZULTATI

4.1. Mjerenje

Nakon što je pšenica 15 dana stajala u komori i redovito zalijevana obavljeno je mjerenje na način da je određen broj izniklih zrna, duljina stabljike od početka korijena, broj listova i duljina listova te masa svježe tvari.



Slika 10. Iznikla pšenica nakon 15 dana stajanja u komori (Izvor: Autor)

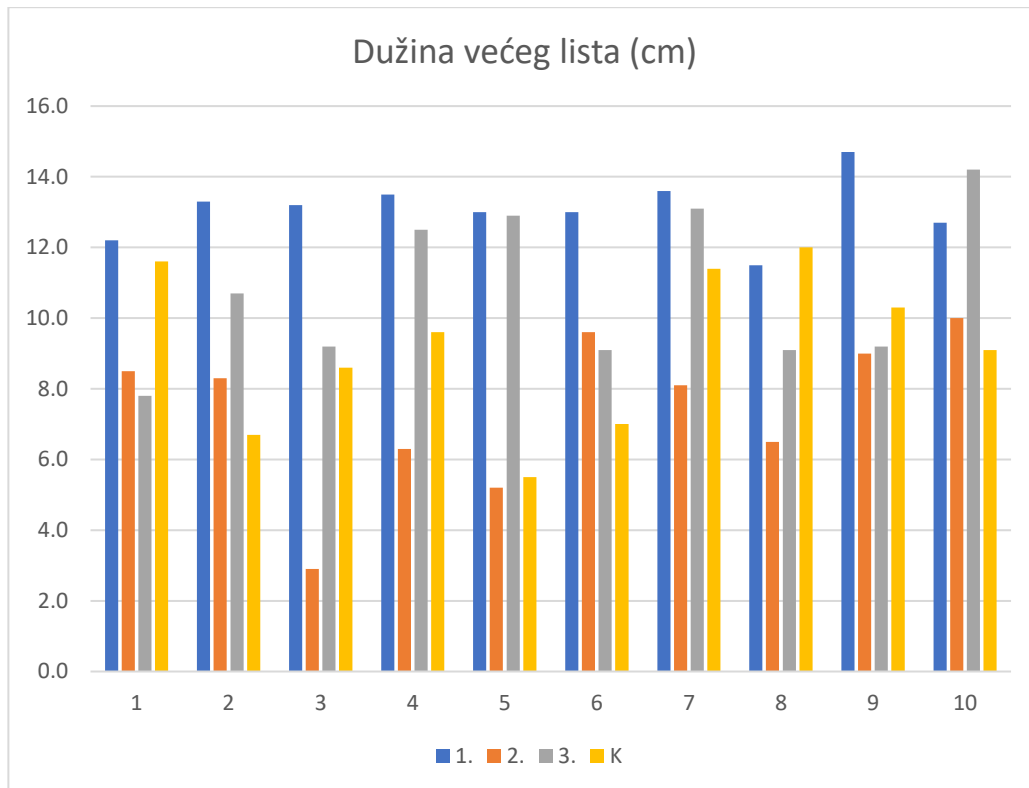


Slika 11. Mjerenje listova pšenice (Izvor: Autor)

Nakon mjerenja utvrđeni su sljedeći rezultati:

Tablica 1. Utjecaj endofitne gljive *F. verticillioides* na porast većeg lista pšenice (cm)

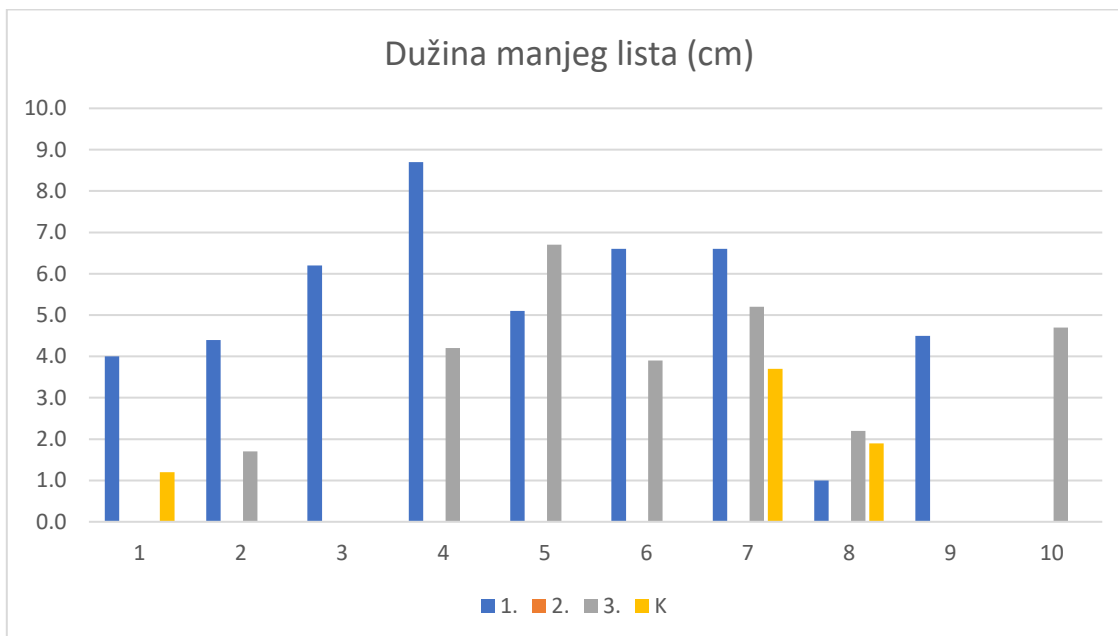
	1. ponavljanje	2. ponavljanje	3. ponavljanje	Kontrola
	12,2	8,5	7,8	11,6
	13,3	8,3	10,7	6,7
	13,2	2,9	9,2	8,6
	13,5	6,3	12,5	9,6
	13,0	5,2	12,9	5,5
	13,0	9,6	9,1	7,0
	13,6	8,1	13,1	11,4
	11,5	6,5	9,1	12,0
	14,7	9,0	9,2	10,3
	12,7	10,0	14,2	9,1
Ukupno	130,7	74,4	107,8	91,8



Grafikon 1. Utjecaj endofitne gljive *F. verticillioides* na porast većeg lista

Tablica 2. Utjecaj endofitne gljive *F. verticillioides* na porast manjeg lista pšenice

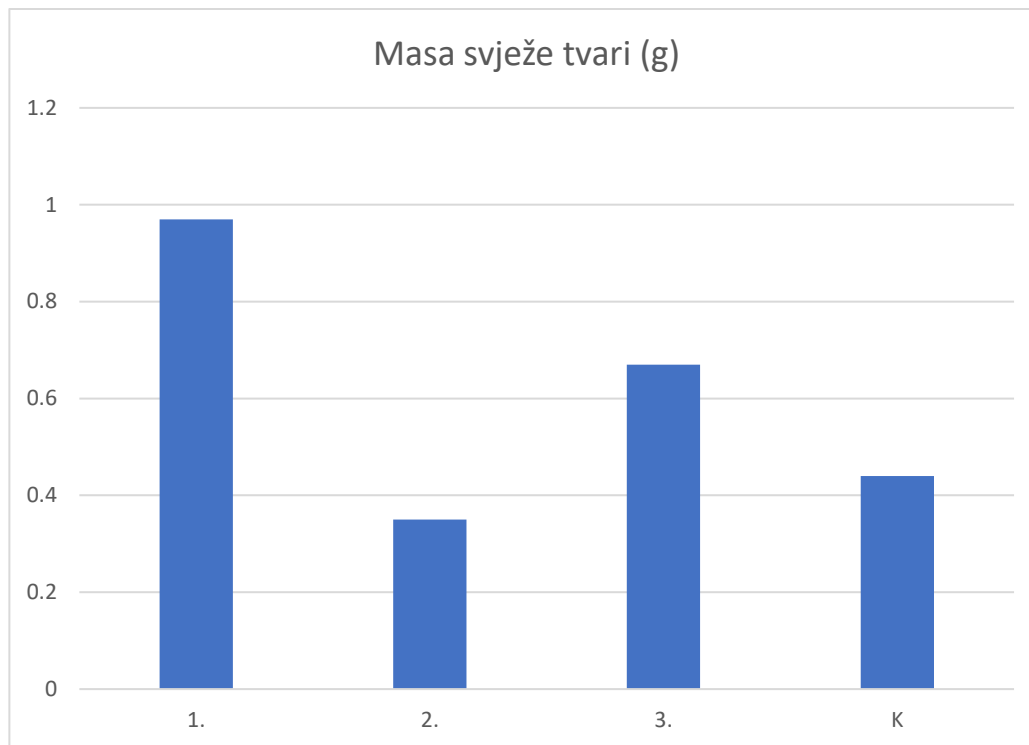
	1. ponavljanje	2. ponavljanje	3. ponavljanje	Kontrola
	4,0	x	x	1,2
	4,4	x	1,7	x
	6,2	x	x	x
	8,7	x	4,2	x
	5,1	x	6,7	x
	6,6	x	3,9	x
	6,6	x	5,2	3,7
	1,0	x	2,2	1,9
	4,5	x	x	x
	x	x	4,7	x
Ukupno	47,1	0	28,6	6,8



Grafikon 2. Utjecaj endofitne gljive *F. verticillioides* na porast manjeg lista pšenice

Tablica 3. Utjecaj endofitne gljive *F. verticillioides* na masu svježe tvari pšenice

1. ponavljanje	2.ponavljanje	3. ponavljanje	Kontrola
0,97	0,35	0,67	0,44



Grafikon 3. Utjecaj endofitne gljive *F. verticilloides* na masu svježe tvari pšenice

Nakon mjerenja utvrđen je pozitivan utjecaj endofitne gljive na porast i masu pšenice. Iako utjecaj nije bio statistički značajan, iz grafikona je vidljivo pozitivno djelovanje na veličinu lista i masu u usporedbi sa kontrolom.

5. RASPRAVA

Istraživanje je potaknuto prijašnjim istraživanjima Ilić i sur. (2017.) o utjecaju endofitnih gljiva na porast biljaka. Utvrdili smo da endofitna gljiva *F. verticillioides* pozitivno djeluje na porast biljaka pšenice, iako utjecaj nije bio statistički značajan. Potrebno je uraditi dodatna ponavljanja kako bi se dobio prosječan rezultat.

U svom istraživanju Ilić i sur. (2017.) utvrdili su pozitivan utjecaj istog izolata na porast trešnje uzgajane u kulturi tkiva. Izdvojena su pet *Fusarium* izolata, a cilj je bio odrediti utjecaj izolata na parametre rasta trešnje uzgojene iz kulture tkiva. Nakon obrade dobivenih rezultata utvrđeno je da većina parametara veća nakon tretiranja endofitom. Provedena su dva tretmana, prvi tretman sastojao se od provedbe inokulacija podloge, a drugi inokulacijom podloge i biljke. U tom je istraživanju najveći pozitivan utjecaj na razvoj trešnje imao izolat *Fusarium solani* 149. Kemijska analiza izolata pokazala je da ima visoku proizvodnju intergracida.

Jelenić i Ilić (2019.) su utvrdili pozitivan utjecaj endofitnih gljiva na porast vinove loze. Korišteni su izolati endofitne gljive *Fusarium solani* uzgajani na PDA podlogama (krumpir-dekstrozni agar) tjedan dana u klima komorama. Sadnice vinove loze sorti Lavallo i Kardinal su posađene u kaliće sa zemljom za cvijeće, a pup je tretiran suspenzijom dva različita izolata endofitnih gljiva roda *F. solani*. Dva mjeseca nakon izmjerila se visina biljke te dimenzije i broj listova. Utvrđeno je da biljke tretirane s endofitnim gljivama imaju značajno veći porast i bujnije listove.

Ivić i sur. (2009.) u svom su istraživanju koristili gljive iz kolekcije Zavoda za fitopatologiju. Odabrano je ukupno 38 monospornih izolata, od čega su 37 izolata *Fusarium* vrste. Utvrđeno je da veći broj *Fusarium* vrsta nije patogen za sjeme i klijance pšenice, rezultat istraživanja potvrđuje da se od ispitanih vrsta negativan utjecaj na klijanje pšenice može pripisati uglavnom vrstama *F. graminearum* i *F. Avenaceum*.

Poštić J. (2012.) u svom je istraživanju izolirala 300 izolata *Fusarium* spp. te je izvršena morfološka i molekularna identifikacija. Ispitivanjem patogenosti 30 odabranih izolata *Fusarium* vrsta utvrđeno je da je velik broj patogen za klijance kukuruza i pšenice te klasove pšenice.

6. ZAKLJUČAK

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj endofitne gljive *Fusarium verticillioides* na razvoj pšenice. Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti da je endofitna gljiva *Fusarium verticillioides* pozitivno utjecala na porast i masu pšenice. Iako pozitivan utjecaj nije statistički značajan možemo zaključiti kako je pšenica tretirana gljivom *F. verticillioides* imala pozitivan utjecaj na veličinu lista i masu svježe tvari u usporedbi sa kontrolom koja je tretirana samo destiliranom vodom.

7. LITERATURA

1. Bissegger, M., Sieber, T. N. (1994.): Assemblages of endophytic fungi in coppice shoots of *Castanea sativa*. *Mycologia*, 86(5), 648-655.
2. Carris, L. M., Little, C., Stiles, C. (2012.): Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor.
3. Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2012.): Pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from weeds and plant debris in eastern Croatia to wheat and maize. *Poljoprivreda*, 18 (2), 7-11.
4. Ilic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Dugalic, K., Pranjin, A., Martin, J. (2017.): Influence of endophytic fungi isolated from symptomless weeds on cherry plants. *Mycosphere*, 8(1), 18-30.
5. Ivić, D., Kuzmanovska, B., Cvjetković, B. (2009.): Utjecaj različitih *Fusarium* vrsta na klijanje sjemena pšenice u in vitro uvjetima. *Sjemenarstvo*, 26(3-4), 143-150.
6. Ižaković E. (2017.): Utjecaj sekundarnih metabolita *Fusarium solani* na patogenu gljivicu *Fusarium culmorum*. Završni rad. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek.
7. Jeffrey K. Stone, Jon D. Polishook, and James D. White, jr. (2004.): Endophytic fungi
8. Jelenić J., Ilić J. (2019.): Primjena endofitnih *Fusarium* gljiva za poboljšanje rasta vinove loze. *Glasnik zaštite bilja* 4/2019.
9. Matić, M., Baličević, R., Novoselović, D., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2020.): Integrirana zaštita pšenice u suzbijanju fitopatogene gljive *Fusarium graminearum*. *Poljoprivreda*, 26 (1), 3-9.
10. Poštić, J. (2012.): Morfološka i molekularna identifikacija *Fusarium* vrsta i njihova patogenost za pšenicu. *Poljoprivreda*, 18 (2), 59-59.
11. Pusztahelyi, T., Holb, I.J., Pócsi, I. (2015.): Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6: 573.
12. Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E. (2000.): Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289(5486): 1920-1921.
13. Tan, R.X., Zou, W.X. (2001.): Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4): 448-459

14. Xiang Sun & Liang-Dong Guo (2012.): Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, *Mycology*, 3:1, 65-76, DOI: 10.1080/21501203.2012.65672

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj endofitne gljive *F. verticilliloides* na rast i razvoj pšenice. Gljiva je prethodno izolirana s korova i nacijepljena na PDA podlogu u Petrijevim zdjelicama. Nakon toga stajala je u komori. Micelij gljive nakon sedam dana sastrugan je s podloge kako bi se dobila suspenzija gljive. Pokus se radio u tri ponavljanja i tri kontrole. Kontrola je tretirana destiliranom vodom. Posijalo se po 10 zrna pšenice u posude s pijeskom. Pšenica je stajala u komori za uzgoj biljaka 15 dana i redovito se zalijevala. Nakon 15 dana iznikla pšenica se mjerila na način da se odredi veličina listova i masa svježe tvari te se pokus radio u dva ponavljanja. Nakon mjerenja utvrđen je pozitivan utjecaj endofitne gljive *F. verticilliloides* na porast lista i masu svježe tvari, iako nije bio statistički značajan u usporedbi sa kontrolom.

Ključne riječi: *F. verticilliloides*, pšenica, endofitne gljive, porast

9. SUMMARY

The aim of the study was to determine the effect of endophytic fungus *F. verticilliloides* on the growth and development of wheat. The fungus was previously isolated from weeds, placed in petri dish on PDA growth medium and left in the chamber for certain amount of time. After seven days mycelium of the fungus was scraped off the substrate to obtain a suspension of the fungus. The experiment consisted of three repetitions and three controls (treated with distilled water). The steps in conducting the experiment were as follows: 10 grains of wheat were sown in sand bowls, the wheat stood in the plant growing chamber for 15 days and was watered regularly, after 15 days the sprouted wheat was measured by determining the size of the leaves and the mass of fresh matter. The experiment was performed in two replicates. After the measurements, a positive effect of the endophytic fungus *F. verticillioides* on leaf growth and fresh matter was found. Although, compared to the control, results was not statistically significant.

Key words: *F. verticilliloides*, wheat, endophytic fungi, growth

10. POPIS SLIKA, TABLICA I GRAFIKONA

Slika 1. Mikrokonidije <i>F. verticillioides</i> (Izvor: Poštić, 2012.)	7
Slika 2. <i>Fusarium verticillioides</i> (izolat 102) (Izvor: Autor)	16
Slika 3. Struganje gljive s podloge i miješanje s destiliranom vodom (Izvor: Autor)	17
Slika 4. Sterilizacija zrna pšenice (Izvor: Autor)	17
Slika 5. Zrna pšenice u Petrijevim zdjelicama (Izvor: Autor).....	18
Slika 6. Priprema za sjetvu zrna pšenice (Izvor: Autor).....	19
Slika 7. Pijesak natopljen vodom (Izvor: Autor).....	19
Slika 8. Bušenje rupa i sjetva zrna pšenice (Izvor: Autor)	20
Slika 9. Komora (Izvor: Autor)	20
Slika 10. Iznikla pšenica nakon 15 dana stajanja u komori (Izvor: Autor)	21
Slika 11. Mjerenje listova pšenice (Izvor: Autor)	22
Tablica 1. Utjecaj endofitne gljive <i>F. verticillioides</i> na porast većeg lista pšenice (cm).....	22
Tablica 2. Utjecaj endofitne gljive <i>F. verticillioides</i> a porast manjeg lista pšenice.....	24
Tablica 3. Utjecaj endofitne gljive <i>F. verticillioides</i> na masu svježe tvari pšenice	25
Grafikon 1. Utjecaj endofitne gljive <i>F. verticillioides</i> na porast većeg lista.....	23
Grafikon 2. Utjecaj endofitne gljive <i>F. verticillioides</i> na porast manjeg lista pšenice.....	24
Grafikon 3. Utjecaj endofitne gljive <i>F. verticillioides</i> na masu svježe tvari pšenice	25

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda, smjer Ekološka poljoprivreda

Utjecaj endofitne gljive *Fusarium verticillioides* (izolat broj 102) na porast pšenice

Ana Klasan

Sažetak:

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj endofitne gljive *F. verticilliloides* na rast i razvoj pšenice. Gljiva je prethodno izolirana s korova i nacijepljena na PDA podlogu u Petrijevim zdjelicama. Nakon toga stajala je u komori. Micelij gljive nakon sedam dana sastrugan je s podloge kako bi se dobila suspenzija gljive. Pokus se radio u tri ponavljanja i tri kontrole. Kontrola je tretirana destiliranom vodom. Posijalo se po 10 zrna pšenice u posude s pijeskom. Pšenica je stajala u komori za uzgoj biljaka 15 dana i redovito se zalijevala. Nakon 15 dana iznikla pšenica se mjerila na način da se odredi veličina listova i masa svježe tvari te se pokus radio u dva ponavljanja. Nakon mjerenja utvrđen je pozitivan utjecaj endofitne gljive *F. verticillioides* na porast lista i masu svježe tvari, iako nije bio statistički značajan u usporedbi sa kontrolom.

Rad je izrađen u: Fakultet Agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Jelena Ilić

Broj stranica: 33

Broj grafikona i slika: 14

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 14

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *F. verticilliloides*, pšenica, endofitne gljive, porast

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnicu fakulteta Agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences

University Graduates studies, Organic agriculture, course Organic agriculture

Influence of endophytic fungi *Fusarium verticillioides* (isolate number 102) on wheat growth

Ana Klasan

Abstract: The aim of the study was to determine the effect of endophytic fungus *F. verticillioides* on the growth and development of wheat. The fungus was previously isolated from weeds, placed in petri dish on PDA growth medium and left in the chamber for certain amount of time. After seven days mycelium of the fungus was scraped off the substrate to obtain a suspension of the fungus. The experiment consisted of three repetitions and three controls (treated with distilled water). The steps in conducting the experiment were as follows: 10 grains of wheat were sown in sand bowls, the wheat stood in the plant growing chamber for 15 days and was watered regularly, after 15 days the sprouted wheat was measured by determining the size of the leaves and the mass of fresh matter. The experiment was performed in two replicates. After the measurements, a positive effect of the endophytic fungus *F. verticillioides* on leaf growth and fresh matter was found. Although, compared to the control, results was not statistically significant.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences

Mentor: izv.prof.dr.sc. Jelena Ilić

Number of pages: 33

Number of figures: 14

Number of tables: 3

Number of references: 14

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Keywords: : *F. verticillioides*, wheat, endophytic fungi, growth

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof.dr.sc. Jasenka Čosić, president
2. izv.prof.dr.sc. Jelena Ilić, mentor
3. prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences , Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.