

Utjecaj endofitne gljive *Fusarium solani* izolirane s korova na porast pšenice

Pilinger, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:151:392868>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-24**



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 JURJIJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Pilinger

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ ENDOFITNE GLJIVE *Fusarium solani* IZOLIRANE S KOROVA NA
PORAST PŠENICE
Diplomski rad**

Osijek, 2021

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJIJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Pilinger

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ ENDOFITNE GLJIVE *Fusarium solani* IZOLIRANE S KOROVA NA
PORAST PŠENICE
Diplomski rad**

Osijek, 2021

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Pilinger

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

**UTJECAJ ENDOFITNE GLJIVE *Fusarium solani* IZOLIRANE S KOROVA 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.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Jeleni Ilić na pomoći, suradnji i vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Posebna zahvala mojoj obitelji koja mi je omogućila život, koja mi je pružala bezuvjetnu podršku, ljubav i neizmjereno vjerovala u moj uspjeh.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Rod <i>Fusarium</i>	3
2.2. <i>Fusarium solani</i>	6
2.3. Endofitni organizmi	9
2.4. Endofitne gljive	11
2.5. Endofitne bakterije	13
2.6. Sekundarni metaboliti	14
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. Priprema PDA podloge	16
4. REZULTATI	22
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČAK	28
7. POPIS LITERATURE	29
8. SAŽETAK	31
9. SUMMARY	32
10. POPIS SLIKA	33
11. POPIS TABLICA	34
12. POPIS GRAFIKONA	35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Endofitne gljive su sveprisutne i javljaju se u gotovo svim biljkama, imaju važnu ulogu u prirodnom okolišu te se s toga često koriste kao zaštita u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji.

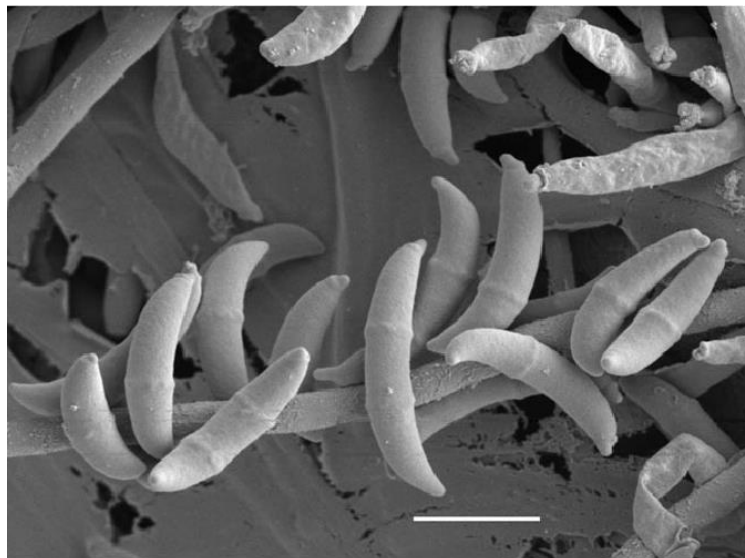
Bary (1966.) je uveo pojam „endofit“ koji se odnosi na sve organizme koji se javljaju unutar tkiva biljke što je s druge strane različito od epifita koji žive na biljnim površinama. S druge strane Carroll (1986.) definirao je endofite kao „organizme“ koje koloniziraju zračne dijelove živih biljnih tkiva i ne uzrokuju nikakve simptome bolesti. Petrini (1991.) predložio je proširenje Carrollove definicije kako bi se obuhvatili svi organizmi koji nastanjuju biljne organe koji se mogu u određenom vremenu kolonizirati unutar biljnog tkiva bez uzrokovanja velikih šteta za domaćina. S toga se pojam endofita definirao na mnogo načina, međutim definicija Petrini (1991.) najčešće se koristi kada je riječ o studijima endofita (Xiang i Liang-Dong, 2012.). Nadalje, *Fusarium solani* uključuje poljoprivredno važne biljne patogene, endofite i saprofite koji mogu pomoći biljci u njenom daljnjem razvijanju. Procjenjuje se da *Fusarium solani* sadrži najmanje 60 filogenetski različitih vrsta (Coleman, 2015.). Snyder i Hansen (1941.) definirali su da je *F. solani* jedina vrsta endofitnih gljiva koja je priznata od strane FSSC-a (Food Safety System Certification).

Endofitne gljive apliciraju se na biljke kako bi poboljšale rast i otpornost biljke na bolesti. Endofiti poboljšavaju fiksaciju dušika, solubilizaciju fosfata i biljka pomoću njih stvara toleranciju na abiotske i biotske stresove. Organizme koji se nalaze u biljci, odnosno njihova zajednica naziva se mikrobiom (Jelenić, Ilić, 2019).

Također, postoje i endofitne bakterije koje se od gljiva razlikuju po fiziologiji i načinu razmnožavanja. Isto tako, gljive imaju jezgru i dvoslojnu membranu dok s druge strane bakterije nemaju. Heterotrofne organizme dijelimo na: saprofite, nekrofite, simbiote i parazite. Oni se razlikuju u načinu prehrane, nekrofiti se hrane nutrijentima koje uzimaju od biljke i također parazitiraju zdrave stanice biljke dok se saprofiti hrane na mrtvoj biljci.

Fusarium vrste napadaju velik broj biljaka i izazivaju različite tipove bolesti kao što su: trulež stabljike, masovno uvenuće. Mogu izazvati uvelost stabljike i žućenje listova kod rajčice

Rod *Fusarium* obuhvaća široku heterogenu skupinu gljiva koje su prisutne svuda, a dijelimo ih na endofite, saprofite i patogene. *Fusarium* sadrži velik broj patogena koji su agronomski važni jer izazivaju štetne biljne bolesti. Osim toga *F. solani* može biti i endofit koji pozitivno utječe na zdravstveno stanje, rast i razvoj biljke. Postoji veliki broj vrsta roda *Fusarium* i većina njih proizvode sekundarne metabolite koji su neophodni za rast gljiva (Ižaković, 2019). Cilj ovog istraživanja je utjecaj endofitne gljive *Fusarium solani* na porast pšenice.



Slika 1. Makrokonidije *Fusarium sp.* gljive slikane elektronskim mikroskopom

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopy-Subcylindrical-monophialides-with-prominent-collaretes_fig2_11160198

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Rod *Fusarium*

Rod gljiva *Fusarium* obuhvaća široku i heterogenu skupinu gljiva koje su prisutne svuda i dijele se na endofite (ljudi), saprofite (biljke) i patogene (životinje). Ime *Fusarium* potječe od latinskog naziva *fustus* što u prijevodu znači vreteno, pripada razredu *Hypohomycetes* i redu *Hyphales* (Poštić i sur., 2012). Općenito rod *Fusarium* pripada patogenima, a isto tako neke vrste mogu proizvoditi sekundarne metabolite koji uključuju mikotoksine. Mikotoksini nisu neophodni za rast gljivica a oni su podskupina veće skupine spojeva koji se nazivaju sekundarni metaboliti (Izzati i sur, 2011.).

Fusarium kao gljiva sadrži puno patogena koji su agronomski važni, također patogen je velikom broju biljaka kao što su: kukuruz, ječam, zob, šećerna trska, šparoge itd. Rod *Fusarium* raspoređen je u regijama koje su odgovorne za re-proizvodnju, virtualnost patogena i primarni metabolizam. S obzirom da je fitopatogen, rod *Fusarium* obuhvaća širok raspon strategija infekcije, velika većina se može klasificirati kao hemibiotrofi jer na početku infekcija slični infekciji biotrofnih patogena koji se hrane na živom tkivu ali kasnije prelazi konzumiranje i ubijanje stanica domaćina i postaje nekrofit. Isto tako rod *Fusarium* ima nekoliko načina preživljavanja, između ostalog je i njihov brz kapacitet za promjenu, morfološku i fiziološku. Mogu biti patogeni i nepatogeni oblici. Fitopatogene vrste izazivaju veliki broj bolesti, neke od njih su; venuće provodnih tkiva, trulež korijena, žućenje listova i lisna nekroza. Često se ovi uzročnici bolesti teško određuju jer u većini slučajeva postoje drugi čimbenici koji utječu na biljku i koji su istodobno zaraženi slabim patogenima ili saprofitima (Ma i sur., 2013.).

Isto tako rod *Fusarium* rasprostranjena je vrsta filamentoznih pljesni, one se nalaze u mikrobnim zajednicama u tlu. Neke od podvrsta *Fusarium* opasne su za zdravlje ljudi jer proizvode mikotoksine koji dopijevaju u prehrambeni lanac čovjeka i životinja. Radi pravovremene kontrole plijesni važno je odrediti kojoj vrsti pripadaju. Postupak razlikovanja podvrsta plijesni vrlo je zahtjevan i dugotrajan.

Postoje razne vrste roda *Fusarium* koje izazivaju različite vrste bolesti kod biljaka.

Fusarium thapsinum (Slika 2.) – trulež stabljike kod biljaka

Fusarium graminearum (Slika 3.) – trulež korijena i plamenjača sadnica

Fusarium oxysporum (Slika 4.) – masovno uvenuće, nekroza, kloroza nadzemnih dijelova biljaka



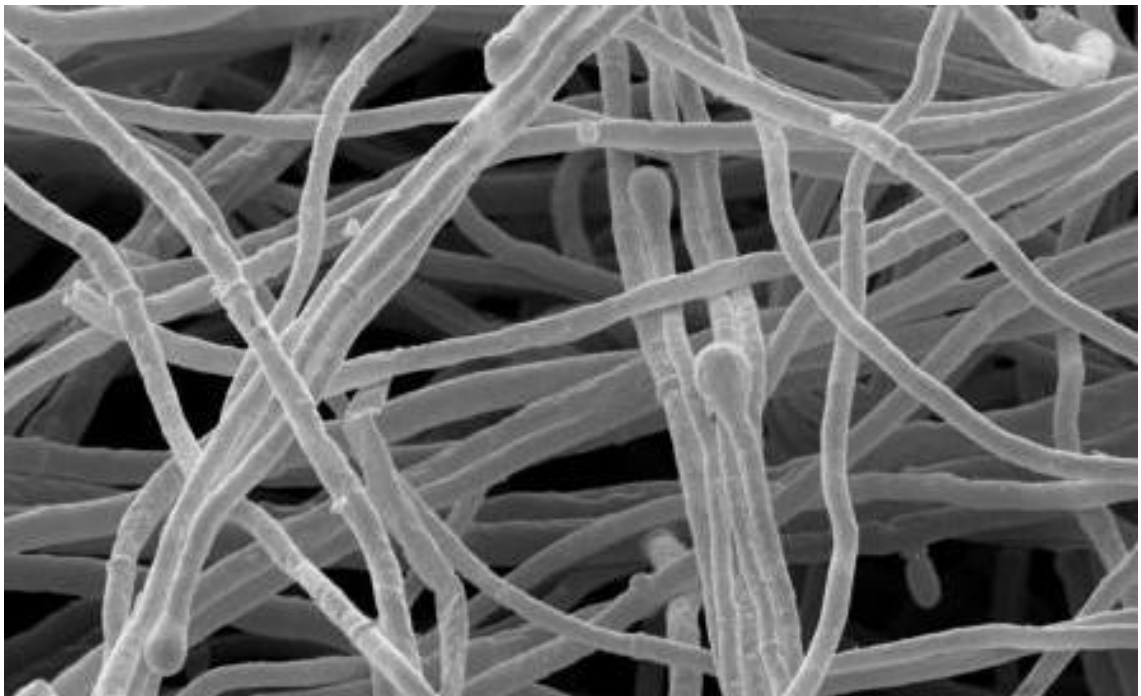
Slika 2. *Fusarium thapsinum*

Izvor: <https://www.jstor.org/stable/3761002>



Slika 3. *Fusarium graminearum*

Izvor: <https://www.researchgate.net>



Slika 4. *Fusarium oxysporum*

Izvor: https://www.musarama.org/photo-343-Fusarium_mycelium

2.2. *Fusarium solani*

Fusarium solani (Slika 5.) pripada saprofitnim gljivama te čini skupinu od nekoliko stotina vrsta. Posjeduje važne biljne patogene, saprofite i endofite koji su sposobni metabolizirati različite patogene. Pretpostavlja se da je rod *F. solani* nastao prije 91,5 milijuna godina. Može kolonizirati mrtvo i živo tkivo biljke. Kroz nodije na stabljici gljiva ulazi u biljku ili uz liniju površine tla, gdje može iskoristiti priliku i napasti biljku na dijelovima gdje je oštećena. Može se naći duboko ispod površine tla, rod je osjetljiv na fungicide koje se nalaze u tlu. *Fusarium solani* je vrsta kod koje korijen i krunica domaćina istrune što na kraju rezultira nedovoljnim i neučinkovitim korijenovim sustavom. Domaćini koje najčešće napada *F. solani* su grašak, krumpir, dinje, bundeve (Leslie i Summerel, 2008.).

F. solani je ekonomski vrlo značajan patogen za veliki broj biljnih vrsta. Primarno stanište mu je tlo, a najčešće uzrokuje trulež sjemena i trulež korijena biljke. S obzirom da mu je područje korijena, najisplativiji način borbe sa *F. solani* je tretiranje sjemena (Medved, 2015).

S druge strane *F. solani* je česti problem u stakleničkom uzgoju i to najčešće na rajčici. Simptomi koji se javljaju na rajčici su žućenje listova, od prizemnog dijela do vrha stabljike. Također posvijetljuje i nervatura lista, infekcija se događa iz zemlje preko korijena biljke. Na biljnim ostatcima parazit se održava i širi gdje može održati vitalnost i do dvije godine (Radman, 1978).

Bijeli micelij stvara se na PDA podlozi koji s vremenom postaje žut, bogat je aminokiselinom kao i nizom raznih masnih kiselina, za rast mu je potreban kalij, *F. solani* proizvodi nespolne mikrokonidije i makrokonidije. Mikrokonidije su jednostanične i ovalnog oblika, mogu imati 1, 2 ili 3 septe. One nastaju na jednostavnim nerazgranatim konidioforima u lažnim glavicama, pojedinačno ili u nizovima. Mikrokonidije *F. solani* su ovalnog oblika, imaju manje stijenke i dosta su šire u odnosu na makrokonidije. Na mikrokonidijima formiraju se monofijalide, mogu biti jednostanične, ovalne i izdužene, njih ne mogu formirati svi izolati. Jednostanične mikrokonidije veličine su 7,3-1236 x 3,4-4,5 µm.

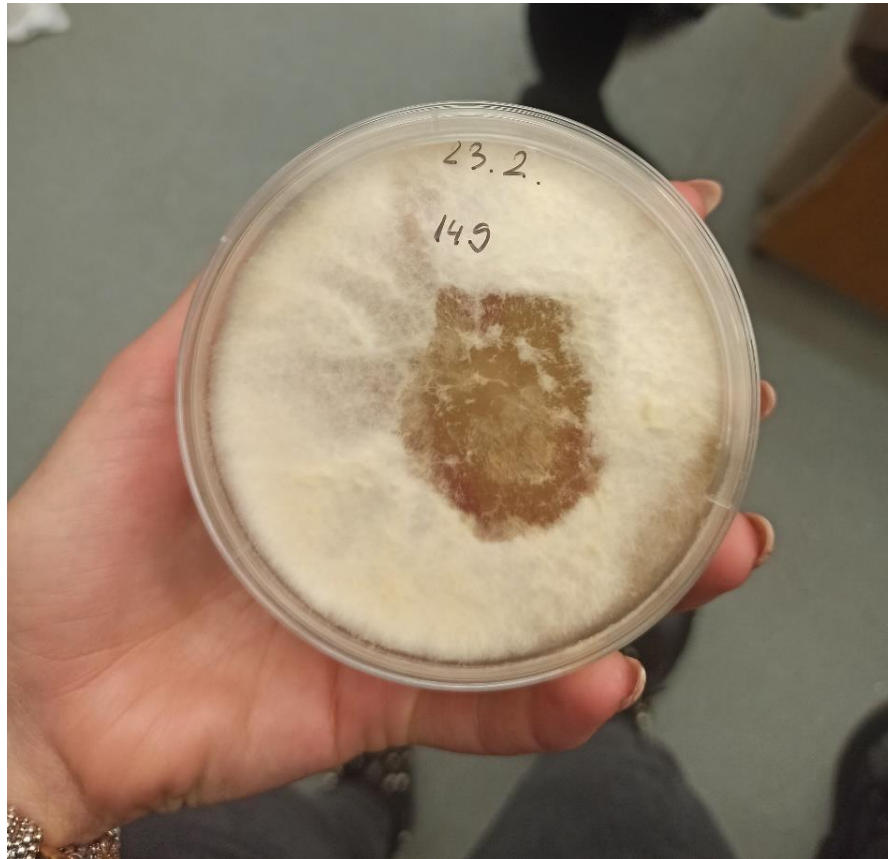
Makrokonidije su srpasto povijene, sa bazalnom i izduženom vršnom stanicom koja ima oblik stopice. Imaju od 3 do 7 septi i uvijek su višestanične, nastaju na razgranatim konidioforima u sporodohijama. Veličina makrokonidija sa 5 septi je 48,0-0,62 x 4,5-6,2 μm . Hlamidiospore formiraju se u velikom broju, njihova veličina kreće se od 9,3-12,2 μm , imaju nadzemne hife koje kasnije stvaraju konidiofore. Nakon toga dolazi do grananja gdje nastaju monofilaide iz kojih nastaju konide (Leslie i Summerel, 2008.).



Slika 5. Mikroskopski prikaz *F. solani*

Izvor: <https://repositorij.fazos.hr/islandora/object/pfos%3A1023/datastream/PDF/view>

Fusarium solani ima genom veličine od 40 Mb i od 5-13 kromosoma. Micelij *F. solani* (Slika 6.) bogat je nizom masnih kiselina kao što su: oleinska, linolenska, također bogat je aminokiselinom alanin. Optimalan pH pod kojim može izgraditi celulozu je 6,5, a za rast zahtjeva kalij.



Slika 6. Micelij *F. solani*

Izvor: Nikolina Pilinger

2.3. Endofitni organizmi

Endofitni organizmi se sve češće primjenjuju u ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji. Bakterije i gljive se apliciraju na zrna biljaka kako bi poboljšale rast biljke i otpornost biljke na bolesti. Za razliku od genetskog inženjerstva koje pretpostavlja skup metoda kojima se mijenja genetski ustroj jedinke, primjenom endofitnih gljiva ne mijenja se genetska slika već se radi o simbiozi odnosno zajednici od kojeg oba organizma imaju koristi. Tako da osim što mogu djelovati kao patogeni, također mikroorganizmi kao što su bakterije i gljive mogu pozitivno utjecati na rast i razvoj biljke. Takve organizme koji se nalaze u biljci, ali ne izazivaju biljne bolesti nazivamo endofiti.

Endofiti kao takvi potiču rast i razvoj biljke kroz poboljšanje fiksacije dušika te poticanje tolerancije na abiotske i biotske stresove. Biološka kontrola biljnih patogena privukla je pozornost upravo zbog toga što se njihovom primjenom može smanjiti primjena kemijskih pesticida u poljoprivredi. Danas ne postoji biljna vrsta koja u sebi ne sadrži neku vrstu endofita, isto tako smatra se da su endofiti izvor novih prirodnih proizvoda u medicini, poljoprivredi i industriji (Jelenić, Ilić, 2019).

Osim što koloniziraju biljku endofiti se nalaze unutar njenog tkiva uzimaju joj razne nutrijente ali zauzvrat joj omogućavaju sposobnost za obranu tako što proizvode metabolite. Povećavanje tolerancije biljke počinje tako što biljke koje su zaražene endofitima povećavaju otpornost na fitopatogene i insekte koje se hrane na njoj. Također endofiti imaju sposobnost zaštititi biljku od nematoda, gljivičnih, bakterijskih patogena i sisavaca. Kako bi došlo do fizičkog susreta gljive i biljke potreban je fizički kontakt obje vrste a kako bi se susret dogodio potrebne su razne kemijske i fizičke barijere (Ižaković, 2017).

Prirodni proizvodi prilagođeni su određenoj funkciji u prirodi, potraga za takvim sekundarnim metabolitima trebala bi se usredotočiti na organizme koji nastanjuju nove biotope. Endofitne gljive nastanjuju takav biotop. Tijekom posljednjih 12 godina Schulz i sur. (2002.) su iz zeljastih biljaka i drveća izolirali 6500 endofitnih gljiva, pregledavali su njihovu biološku aktivnost i utvrdili da postoje strukture biološki aktivnih spojeva.

Pronađene su korelacije između biološke aktivnosti i biotopa, što znači da je veći udio gljivičnih endofita za razliku od izolata u tlu inhibirao barem jedan od ispitivanih organizama na antialgalne i herbicidne aktivnosti. Gljivični endofiti posjeduju egzoenzime potrebne za kolonizaciju domaćina i dobro rastu u apoplastičnoj tekućini za pranje domaćina (Schulz i sur., 2002.).

Pojam endofitne gljive primjenjuje se za gljive koje imaju sposobnost kolonizirati živo i zdravo biljno tkivo biljke bez da izazovu negativan učinak. Zbog toga nastaje cijeli proces simbiotskih interakcija koje se dešavaju između gljiva i biljaka, mutualizam, komenzalizam i parazitizam. Endofiti trave svojem domaćinu pružaju zaštitu od raznih patogena i biljojeda, one koloniziraju gotovo cijelu stabljiku biljke tijekom zime i prenose u sjeme domaćina. Pretpostavlja se da u biljkama postoji rezervar gljiva koje još nisu otkrivene zbog toga postoji sve veći interes za njihovo istraživanje (Stone i sur., 2004).

Matić i sur., 2020, utvrdili su da brojnost i raznolikost gljiva u rodu *Fusarium* čine ovaj rod neiscrpnim za daljnja istraživanja. Imaju veliki ekonomski značaj samim time što se četiri vrste roda *Fusarium* nalaze u deset najvažnijih biljnih parazita.

Stone i sur., 2004, utvrdili su da unutar gljive postoji razdoblje u kojem kolonizacija i rast na određeni vremenski period prestaju te se nakon toga događaju sazrijevujuće i fizičke promjene unutar domaćina.

Redecker i sur., 2000, utvrdili su da su mikroorganizmi koji su pronađeni sa fosilnim biljkama, tkivom stabljike i lišća dokaz da je odnos endofita i biljke postojao još od vremena kada su se biljke pojavile na zemlji.

Isto tako, Ilić i sur., 2012. determinirali su *Fusarium* vrste koje su prethodno izolirane sa korova koji rastu na poljoprivrednim tlima. Na 30 odabranih *Fusarium* izolata ispitana je patogenost na pšenicu, čime je utvrđeno da jedan dio izolata pozitivno utječe na rast pšenice. Isti izolati koriste se za daljnja istraživanja.

2.4. Endofitne gljive

Danas je u svijetu opisano oko 100 000 vrsta gljiva, a pretpostavlja se da ih ima preko 1 000 000. Nalazimo ih svuda oko nas, u vodi, zemlji, zraku, čovjeku, životinjama i biljkama. Najpoznatiji su uzročnici bolesti, a dijelimo ih na saprofite, nekrofite, simbionte i parazite. Gljive su nastale reprodukcijom spora, imaju tijelo isprepletano hifama (Slika 7.) koje su ujedno i rasplodne stanice gljive. Gljiva kao organizam koristi veliki broj metabolita koji su različiti, neki od njih su otrovni za biljke, a neki imaju ljekovita svojstva, s druge strane kod roda *Fusarium* oni pomažu i pridonose patogenezi biljke.



Slika 7. Hife

Izvor: <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/5e7d944d-1bcf-4564-8ac8-1b0c0c6e1f32/biologija-2/m04/j01/index.html>

Razmnožavanje kod gljiva može biti spolno ili nespolno, ipak u većini slučajeva razmnožavanje je nespolno. Razmnožavanje gljivama omogućavaju spore, one se sastoje od nekoliko stanica, proizvode nove hife od čega na kraju nastaje micelij. Micelij je najvažniji dio gljive koji se također koristio se za potrebe ovog istraživanja, sastoji se od bijelo/žutih razgranatih hifa koje kasnije služe gljivi za upijanje vode, korisnih hranjivih i mineralnih tvari iz okolne zemlje.

Gljive se od bakterija razlikuju u tome što imaju više kompleksnih bioloških procesa, jasno definiranu jezgru, dvoslojnu staničnu stijenku, fiziologiju i način razmnožavanja (Pusztahelyi i sur., 2015).

Za gljive koje se klasificiraju kao endofiti neki znanstvenici smatraju da su oni sekundarni patogeni. Njihova pojava stvara problem u granici razdvajanja endofita, fakultativnih patogena i latentnih patogena. Razlike u njihovu ponašanju nema zbog čega je teška njihova determinacija.

Danas postoji DNK crtični kod za endofitne gljive koji se uspješno koristi za identificiranje gljiva. Crtični kod za DNK otkrivanje donosi veliku prednost zbog količine dostupnih podataka koje sadrži ali također i nedostatak kao što su intar i inter udaljnosti između gljiva što znači da može pogrešno identificirati organizam. Bez obzira na nedostatak DNK crtični kod pokazuje potencijal za buduća istraživanja u ekologiji (Xiang i Liang-Dong, 2012.).

U kopnenim ekosustavima gljive imaju veliku ulogu, posebno u šumskom ekosustavu. One razgrađuju mrtvu organsku tvar i s time omogućavaju život ostalom biljnom i životinjskom svijetu. Gljive sudjeluju u razgradnji biljnih ostataka (celuloza, lignin) dok bakterije razgrađuju životinjske ostatke. Kako bi se razgradio lignin potrebne su gljive zbog toga je njihova uloga nezamjenjiva. Nadalje, za zdravlje drveća koje se nalazi u šumi mikoriza ima važnu ulogu, zbog toga su gljive važne jer one tvore mikorizu zajedno sa biljkama. Mikoriza uz rast i grananje korijena orhideje osigurava rast cvjetova i plodova, smanjuje se upotreba gnojiva i presađivanje (Slika 8.).



Slika 8. Mikoriza na orhideji

Izvor: <https://repositorij.fazos.hr/islandora/object/pfos%3A753/datastream/PDF/view>

2.5. Endofitne bakterije

Bakterije pozitivno utječu na rast i razvoj biljke one su prisutne u cijeloj stabljici i samim time pospješuju njen rast. Na rast mogu utjecati izravno ili neizravno. Bakterije koje pronalazimo unutar biljke domaćina nazivamo endofitne bakterije. Postoje različite vrste endofitnih bakterije a neke od njih su *Agrobacterium* i *Rhizobium*. One mogu ući u biljku kroz oštećenja koja se nalaze na korijenu i kolonizirati apoplast i intracelularne prostore unutar biljke. Ne uzrokuju štetu biljci jer povećavaju biljni rast što znači da se biljci s tim povećavaju hranjive tvari. S druge strane povećanjem hranjivih tvari odnosno korištenjem bakterija smanjuje se potreba za kemijskim gnojivima a posebno dušičnim s obzirom da se ona koriste u prevelikim količinama (Krznarić,2018).

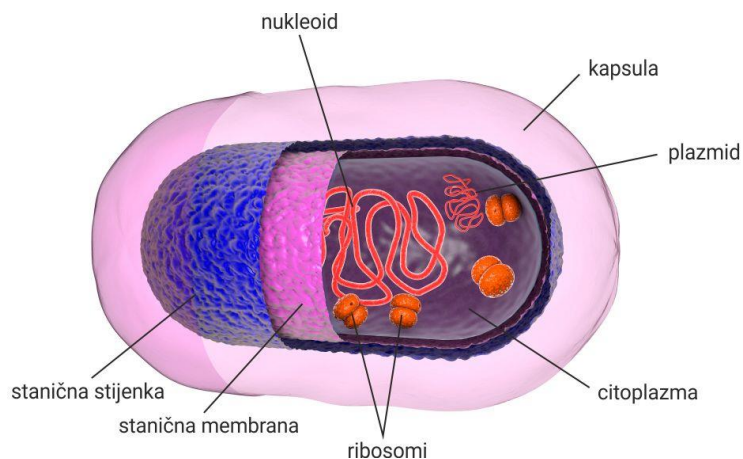
Bakterije mogu pomoći biljci u toleriranju stresnih uvjeta i također mogu proizvesti alelopatske učinke na druge biljne vrste. Zbog toga je bitna kolonizacija rizosfere jer putem kolonizacije mogu se ostvariti alelopatski učinci. Kolonizacija se događa na način da se skupine svojstava koje posjeduju pokretljivost vežu, razgrađuju biljne polimere i izbjegavaju obranu biljke (Afzal i sur., 2019.).

Endofitne bakterije mogu potaknuti biljni rast koji nazivamo PGPR. Potiču rast biljke tako što cirkuliraju mineralne i hranjive tvari kao što su kemijski spojevi dušik i fosfor. Također korisno djelovanje bakterija na rast biljke je osmotska prilagodba, pojačani unos minerala i modifikacija morfologije korijena (Krznarić, 2018.).

Endofitne bakterije borave unutar biljnog tkiva koje je okruženo dušičnom fiksacijom. One svojim prisustvom smanjuje konkurenciju koja se događa sa drugim mikrobima u rizosferi. Biljnu unutrašnjost koloniziraju endofiti što uključuje gljivice, bakterije, arhee i protiste. Neki od njih nose gene koji su potrebni za biološku fiksaciju dušika, amonij i nitrat korisni oblik dušika koji se nalazi u domaćinu (Kandel i sur., 2017).

Prema načinu prehrane razlikujemo heterotrofne organizme i autotrofne prokariote. Autotrofne bakterije prehranjuju sebe i sve ostale heterotrofne organizme s kojim su u hranidbenom lancu. Također autotrofne organizme dijelimo prema izvoru energije koja im je potrebna za stvaranje organskih spojeva na fotoautotrofne i kemoautotrofne.

Heterotrofne bakterije dijelimo u tri skupine, a to su: saprofitske, simbiotske i patogene bakterije. Saprofitske imaju važnu ulogu u kruženju tvari u prirodi, djeluju u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Simbiotske žive u simbiozi s drugim organizmima dok patogene bakterije iz živih stanica uzimaju organske spojeve u kojem se paratiziraju te mu na taj način štete i uzrokuju bolesti.



Slika 9. Građa bakterijske stanice

Izvor: <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/ca918e23-477d-4135-9460-dd364d819e98/biologija-2/m02/j02/index.html>

2.6. Sekundarni metaboliti

Sekundarni metaboliti nastaju tijekom razvojnog ciklusa gljiva i oni su neophodni za rast i razvoj. Rod *Fusarium* metabolizira toksične metabolite (mikotoksine), koji mogu izazvati kronična toksična i akutna djelovanja na životinje i ljude. Također *Fusarium* je jedan od najčešćih kontaminata žitarica u agroekološkim uvjetima. Predžetveno nastaje mikotoksin u inficiranoj biljci koja je ostala na polju, može se prenijeti na zrno tijekom sljedeće sjetve a može nastati i u proizvodima koji se skladište (Kanižai Šarić i sur., 2011.).

Mikotoksini uzrokuju bolesti koje nazivamo mikotoksikoze, simptomi bolesti ovise o dužini i koncentraciji izlaganja mikotoksinu, spolu, starosti, vrsti i zdravstvenom stanju životinje. Postoje mikotoksikoze koje su različito pigmentirane, neke od njih reguliraju rast i razvoj biljke, drugi su otrovni za biljke ili životinje, dok treći s druge strane imaju farmaceutska

svojstva. Neki od njih uključuju metabolite roda *Fusarium* koji doprinose patogenezi biljaka (Izzati i sur., 2011.).

Sekundarni metaboliti nastaju u procesu proizvodnje biljke koji uključuje cijeli proces od sjemena, klice, cvatnje, oplodnje i na kraju ploda biljke. Osim sekundarnih metabolita koji pomažu razvoju biljke veliku ulogu imaju i agrotehničke mjere (odabir kultivara, sadnog materijala, plodored, pravilna gnojidba, malčiranje itd.). Tek nakon svih uvjeta biljci se u potpunosti stvaraju potrebni uvjeti za rast i razvoj. U svakoj proizvodnji pa tako i poljoprivrednoj primjena dobre prakse pridonosi kvalitetnoj proizvodnji (Cvjetković, 2014).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Priprema PDA podloge

Petrijeve zdjelice se steriliziraju tako što se 4 zdjelice umotaju u papir te stavljaju na sterilizaciju u autoklav na temperaturu 121 °C/20 minuta. Nakon toga se priprema podloga KDA (krumpir dekstrozni agrar – PDA (potato dextrose agar) za uzgoj gljiva. Gotova podloga koja se važe u količini koju je preporučio proizvođač. Krumpir dekstrozni agar se stavlja u staklene tikvice i dopunjava do 1000 ml destiliranom vodom. Tikvice se stavljaju na sterilizaciju u autoklav na temperaturu 121 °C/20 minuta. Nakon toga sačekamo da se autoklav ohladi i vadimo tikvice iz autoklava. Autoklavirana KDA podloga se hladi do 40°C kada se dodaje antibiotik Streptomycin koji sprječava razvoj bakterija u podlozi. Nakon što se KDA podloga u potpunosti ohladi i stvrdne može se koristiti za daljnji rad.

Fusarium solani je gljiva koja je izolirana sa korova i uzgojena na hranjivim podlogama u laboratoriju, prethodno je korištena u istraživanju utjecaja endofitne gljive na kultivirane biljke (Ilić i sur., 2017.). Komadić micelija gljivice sterilnom se iglom stavi na PDA podlogu gdje se uzgaja u komori 7 dana. Temperatura u komori je 22°C, vlaga 81%, a režim svjetlosti 12 sati dan i 12 sati noć.

Nakon 7 dana provedenih u komori gljiva je skinuta s podloge pomoću sterilnog skalpela (Slika 10.) te nakon toga pomiješana sa destiliranom vodom u mikseru (Slika 11.) kako bi se dobila gljiva kojom će se natopiti zrno.



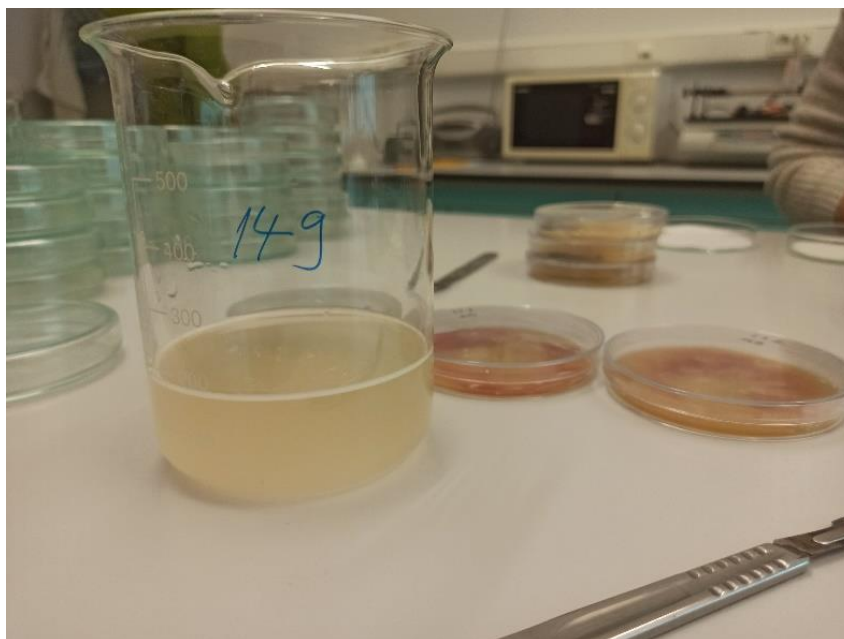
Slika 10. Skidanje *F. solani* sterilnim skalpelom

Izvor: Nikolina Pilinger



Slika 11. Usitnjavanje gljive ručnim mikserom

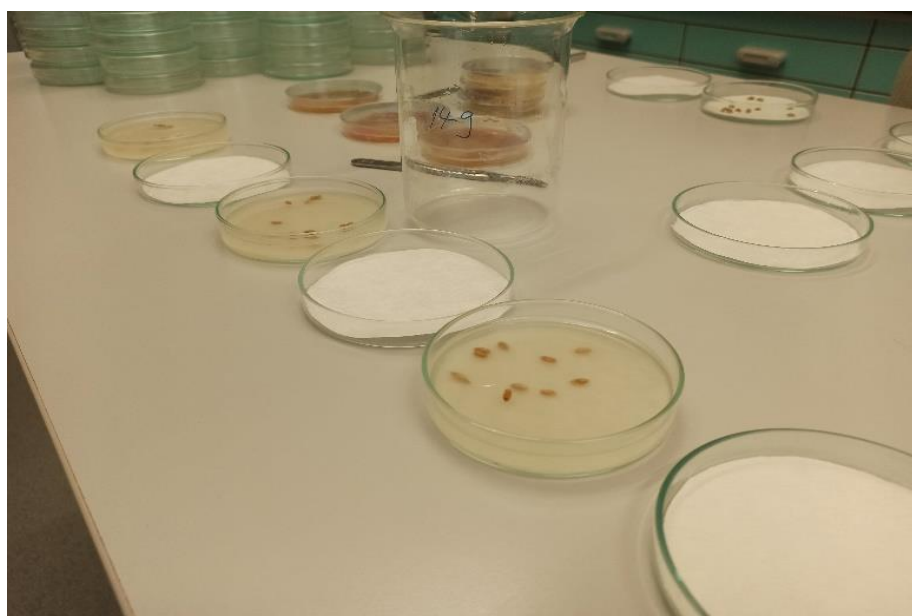
Izvor: Nikolina Pilinger



Slika 12. Suspenzija gljive

Izvor: Nikolina Pilinger

Netretirana zrna pšenice su površinski sterilizirana s etilnim alkoholom kako bi se smanjila mogućnost pojave sekundarnih mikroorganizama. U Petrijeve zdjelice je postavljen navlažen filter papir te je u svaku postavljeno 10 zrna pšenice (Slika 13.).



Slika 13. Zrna pšenice natopljena gljivom *Fusarium solani*

Izvor: Nikolina Pilinger

Pokus se radio kroz 3 ponavljanja s tim da je bilo i ponavljanje kontrole koja je bila tretirana samo destiliranom vodom. Nakon što su zrna natopljena u Petrijevim posudicama ista su stavljena u komore na 24 sata na temperaturu od 22°C. Nakon toga zrna pšenice su sijana u pijesak koji je steriliziran u sušioni 6 sati na temperaturi 100°C (Slika 14.) te potopljen vodom (Slika 15.) kako bi zrno imalo dovoljnu količinu vlažnosti. U svaku od ukupno 4 posuda je posijano po 10 zrna pšenice (Slika 16.).



Slika 14. Sterilizirani pijesak

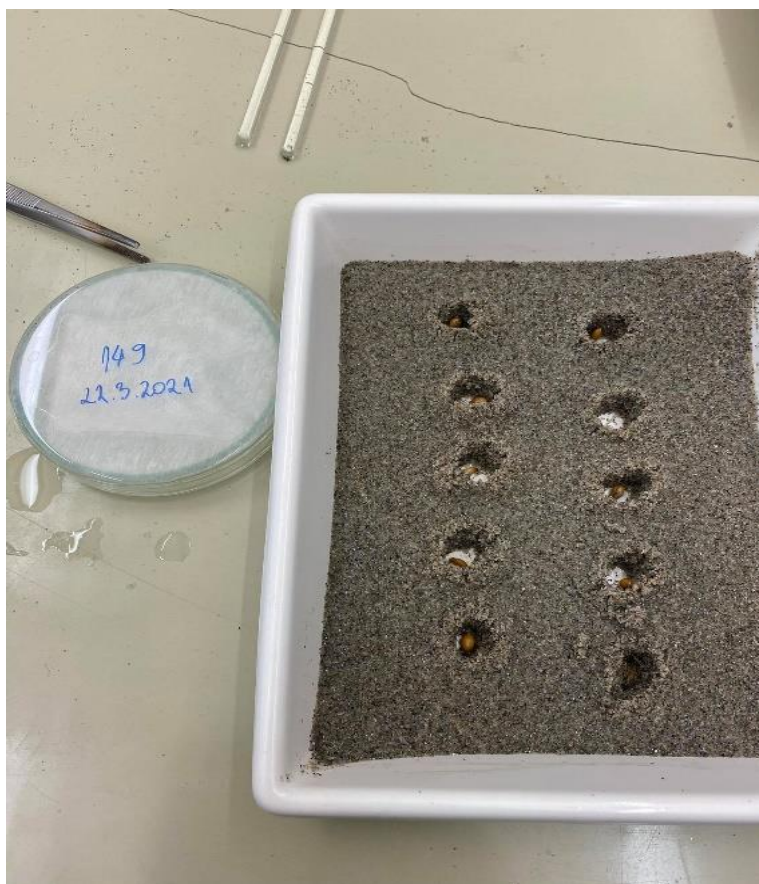
Izvor: Nikolina Pilinger



Slika 15. Zalijevanje pijeska

Izvor: Nikolina Pilinger

Nakon što je pšenica posijana (Slika 16.), stajala je u komori za uzgoj biljaka (Slika 17.) 15 dana gdje je redovno zalijevana. Nakon 15 dana biljke su obrađene, tako što je izbrojan broj biljaka koje su nikle, njihova duljina od mjesta gdje počinje korijen i broj listova (Slika 18.), težina svih iznikulih biljaka zajedno bez korijena. Poslije mjerenja pokus je ponovljeno još jednom te su nakon toga vrijednosti statistički obrađene.



Slika 16. Sijanje pšenice

Izvor: Nikolina Pilinger



Slika 17. Komora za uzgoj biljaka

Izvor: Nikolina Pilinger



Slika 18. Mjerenje pšenice

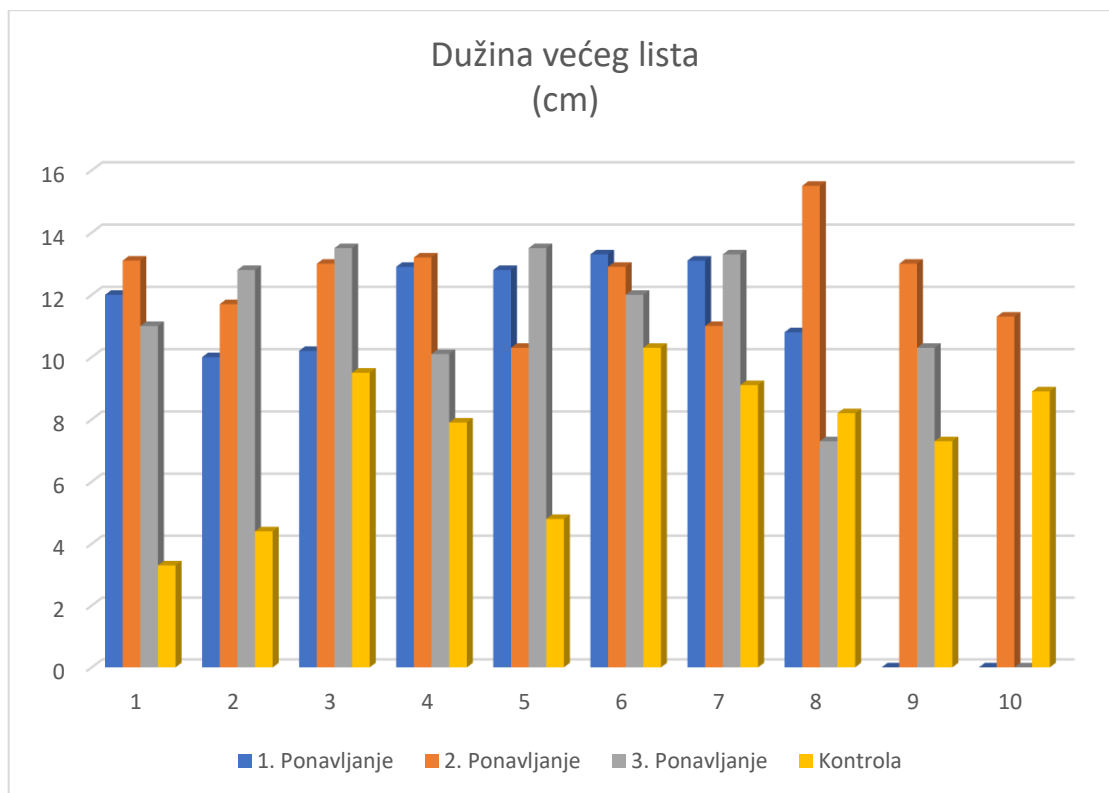
Izvor: Nikolina Pilinger

4. REZULTATI

Nakon završetka pokusa mjerila se je dužina manjeg i većeg lista te masa stabljike bez korijena odnosno svježe tvari. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Utjecaj gljive *Fusarium solani* na porast pšenice, mjerenje većeg lista (cm)

	<u>1. Ponavljanje</u>	<u>2.Ponavljanje</u>	<u>3.Ponavljanje</u>	<u>Kontrola</u>
	12,0	13,1	11,0	3,3
	10,0	11,7	12,8	4,4
	10,2	13,0	13,5	9,5
	12,9	13,2	10,1	7,9
	12,8	10,3	13,5	4,8
	13,3	12,9	12,0	10,3
	13,1	11,0	13,3	9,1
	10,8	15,5	7,3	8,2
	0,0	13,0	10,3	7,3
	0,0	11,3	0,0	8,9
<u>Ukupno</u>	95,1	125,0	103,8	73,7

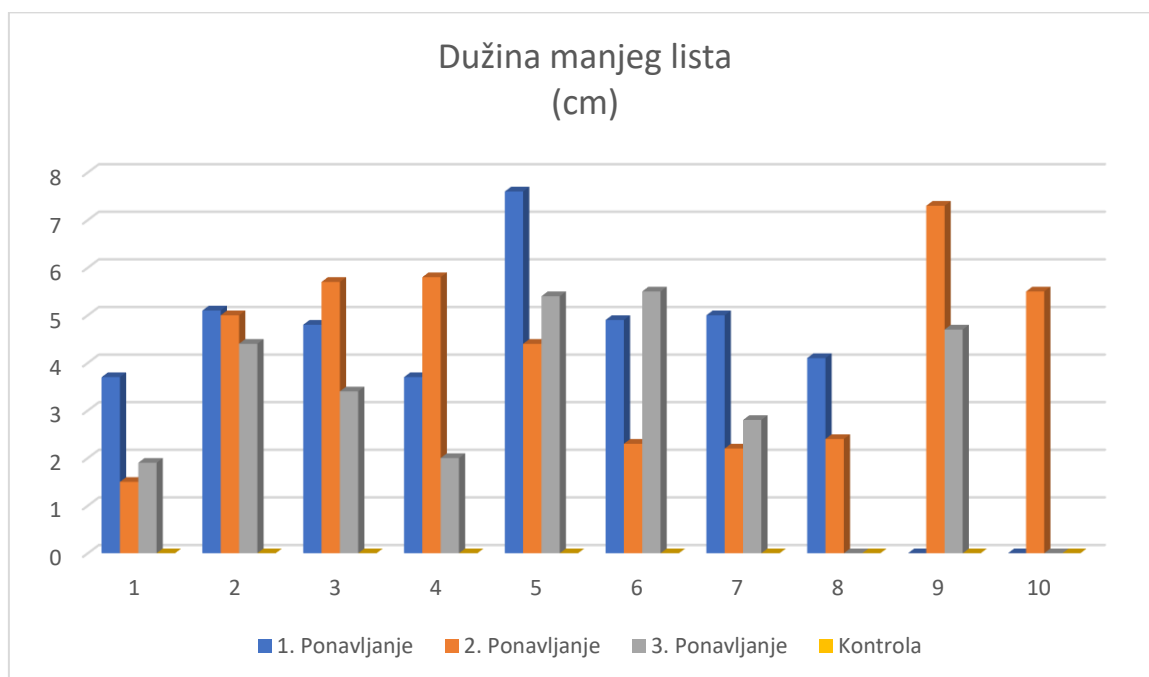


Grafikon 1. Utjecaj gljive *Fusarium solani* na porast većeg lista pšenice

Utjecaj endofitne gljive *Fusarium solani* pozitivno je utjecao na porast većeg lista pšenice što je prikazano u Tablici 1. i Grafikonu 1. Kontrola pomiješana samo destiliranom vodom nije dala zadovoljavajuće rezultate.

Tablica 2. Utjecaj gljive *Fusarium solani* na porast pšenice, mjerenje manjeg lista (cm)

	<u>1. Ponavljanje</u>	<u>2. Ponavljanje</u>	<u>3. Ponavljanje</u>	<u>Kontrola</u>
	3,7	1,5	1,9	0,0
	5,1	5,0	4,4	0,0
	4,8	5,7	3,4	0,0
	3,7	5,8	2,0	0,0
	7,6	4,4	5,4	0,0
	4,9	2,3	5,5	0,0
	5,0	2,2	2,8	0,0
	4,1	2,4	0,0	0,0
	0,0	7,3	4,7	0,0
	0,0	5,5	0,0	0,0
Ukupno	38,9	42,1	30,1	0,0

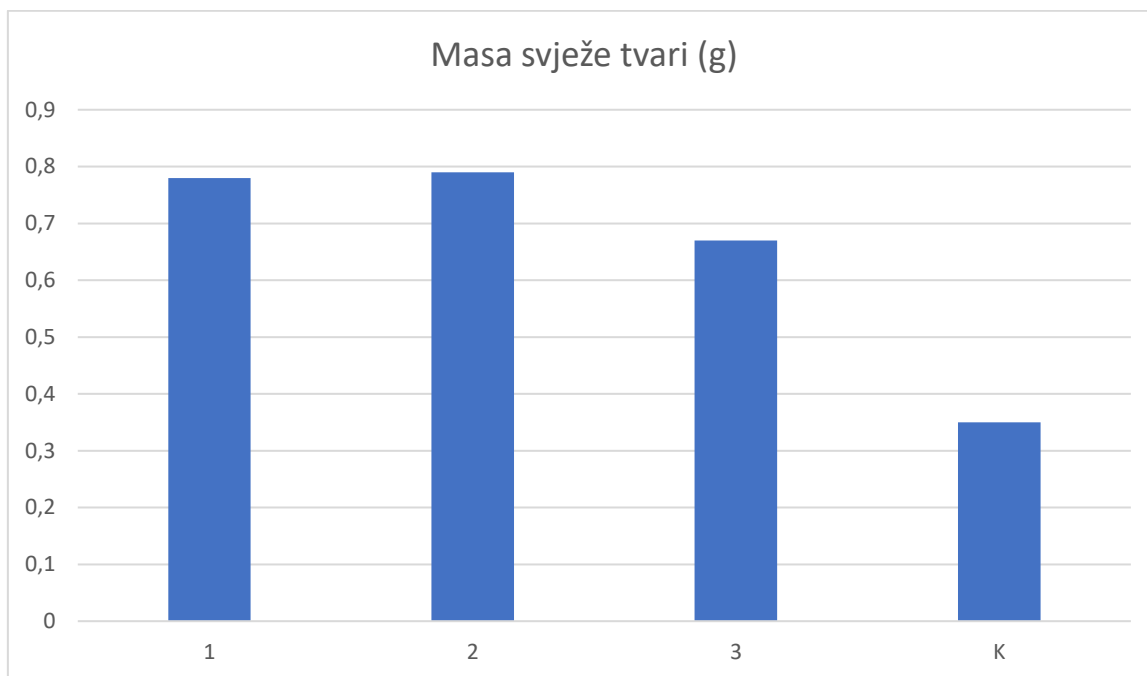


Grafikon 2. Utjecaj gljive *Fusarium solani* na porast manjeg lista pšenice

Također u Tablici 2. i Grafikonu 2. može se primjetiti pozitivan utjecaj gljive *F. solani* na porast manjeg lista pšenice u usporedbi sa kontrolom.

Tablica 3. Masa svježe tvari pšenice (g)

1.Ponavljjanje	2.Ponavljjanje	3.Ponavljjanje	Kontrola
0,78	0,79	0,67	0,35



Grafikon 3. Utjecaj gljive *Fusarium solani* na svježju tvar pšenice

Grafikon 3. prikazuje nam pozitivan utjecaj gljive *F. solani* na svježju tvar pšenice u usporedbi sa kontrolom. Između 1,2 i 3 ponavljanja nema velike razlike i nema velikih odstupanja, dok su sva tri ponavljanja u usporedbi sa kontrolom dala puno bolje rezultate.

5. RASPRAVA

Nakon mjerenja utvrđen je pozitivan utjecaj gljive *F. solani* na porast i masu pšenice u odnosu na kontrolu. U tablicama i grafikonima rezultati su pokazali bolje rezultate za zrna koja su tretirana gljivom *F. solani* u odnosu na kontrolu koja je pomiješana destiliranom vodom. Utjecaj gljive na svježu tvar pšenice također je dao pozitivan rezultat što se može vidjeti u Grafikonu 3. Iz ovog istraživanja možemo zaključiti da je gljiva pozitivno utjecala na porast i na masu svježe tvari pšenice. Osim što pozitivno utječe na porast i masu ona također potječe toleranciju na abiotske i biotske stresove, poboljšava fiksaciju dušika, proizvodnju fitohormona (Jelenić, Ilić, 2019).

Jelenić i sur. (2018.), proveli su istraživanje o utjecaju endofitnih gljiva na vinovoj lozi sorte Lavallo i Kardinal te su utvrdili da biljke tretirane endofitnim gljivama imaju značajno veći porast i bujnije listove od onih koje nisu tretirane. Biljke koje su bolje razvijene imaju veći potencijal rodosti i bolju otpornost na bolesti stoga mogu dati veći i zdraviji urod. Isto tako Ilić i sur., (2017), proveli su istraživanje gdje je izdvojeno pet *Fusarium* izolata, cilj tog istraživanja bio je odrediti utjecaj izolata na parametrima rasta trešnje. Njihovi rezultati pokazali su da je većina parametara znatno veća nakon što je tretirana endofitom. Gljiva *Fusarium solani* pokazala je utjecaj na rast i razvoj trešnje. Također Šišić i sur. (2017.) ispitali su sposobnost tri izolata *Fusarium equiseti* i isto tako utvrdili da može poboljšati rast graška i da ima sposobnost mijenjanja interakcije graška i patogena korijena.

Chand i sur. (2020.) su utvrdili da je endofitizam jedan od široko istraženih fenomena povezanih s orhidejama i gljivicama. Endofitne gljive pomažu biljkama nadopunjujući prikupljanje hranjivih sastojaka i sintezu regulatora rasta biljaka. *Vanda cristata* je epifitska orhideja koja ima veliku raznolikost endofitnih gljiva. U njihovom istraživanju endofitne gljive izolirane su iz korijena, stabljika i lišća *V. cristata* i identificirane morfološkim i molekularnim istraživanjem. Nadalje, izolirane endofitne gljive bile su podvrgnute sintezi auksina, otapanju fosfata, sintezi amonijaka i testu rasta elicitora kako bi se kvalitativno i kvantitativno razumjelo njihovo djelovanje na poticanje rasta. Ukupno je izolirano 12 različitih endofitnih gljiva iz korijena, stabljika i lišća *V. cristata* od kojih je većina vrsta pripadala *Ascomycota*. Utvrđeno je da su neidentificirane gljive II najučinkovitije za sintezu auksina i otapanje fosfata, dok su *Agaricus bisporous* i *Mycolepto discus* najučinkovitiji za sintezu amonijaka. Testirali su aktivnost poticanja rasta biljaka s dvanaest izoliranih

endofitnih gljiva na *Cymbidium aloifolium* (starim 12 tjedana). Sve endofitne gljive pokazale su aktivnost poticanja rasta. Rast biljaka *Cymbidium aloifolium* utvrđen je većim na MS mediju. Gljivični elicitor CVS4, međutim, pokazao je najveću aktivnost poticanja rasta biljaka *C. aloifolium*.

6. ZAKLJUČAK

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je bio ispitivanje utjecaja endofitne gljive *Fusarium solani* na porast pšenice. Biljke pšenice su inokulirane s endofitom i njihov porast je izmjeren nakon 15 dana tako što je izmjerena duljina listova pšenice te masa svježe tvari biljke bez korijena. Kontrolne biljke su tretirane s destiliranom vodom. Na temelju provedenog istraživanja utjecaja endofitne gljive *Fusarium solani* na porast i masu pšenice možemo zaključiti da je utvrđen pozitivan utjecaj te da su biljke pšenice inokulirane s *F. solani*, izolat broj 149, imale dulje listove i veću masu u poređenju sa kontrolom, iako razlike nisu bile statistički značajne. *F. solani* je gljiva koja ima veliki potencijal u poljoprivrednoj industriji što se dokazalo velikim brojem istraživanja.

7. POPIS LITERATURE

1. Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., Shahzad, S. (2019.): Plant beneficial endophytic bacteria; Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiological research
2. Chand, K., Shah, S., Sharma, J., Paudel, M. R., & Pant, B. (2020). Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. Plant signaling & behavior, 15(5), 1744294.
3. Coleman, J. J. (2016.): The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. Molecular plant pathology, 17 (2), 146-158
4. Cvjetković, B. (2014.): Upravljanje rizikom od mikotoksina počinje u polju. Glasilo biljne zaštite, 14 (4), 317-328.
5. Ilic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Dugalic, K., Pranjic, A., Martin, J. (2017.): Influence of endophytic fungi isolated from symptomless weeds on cherry plants. Mycosphere, 8(1), 18-30.
6. Izzati, M. N. A., Azmi, A. R., Nordahliawate, M. S., Norazlina, J. (2011.): Contribution to the knowledge of diversity of *Fusarium* associated with maize in Malaysia. Plant Protection Science, 47(1), 20-24
7. Ižaković E. (2017.) : Utjecaj sekundarnih metabolita *Fusarium solani* na patogenu gljivicu *Fusarium culmorum*. Završni rad. Poljoprivredni fakultet u Osijeku. Osijek
8. Jelenić, J., Ilić, J., (2019): Primjena endofitnih *Fusarium* gljiva na poboljšanje rasta vinove loze
9. Kandel, S. L., Joubert, P. M., Doty, S. L. (2017.): Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. Microorganisms, 5(4), 77.
10. Krznarić, D.(2018). Izolacija i karakterizacija endofitskih bakterija iz soje (*Glycine max* L.) Diplomski rad.
11. Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2008.): The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley & Sons
12. Medved, M., (2015.): Testiranje osjetljivosti *Fusarium solani* na tebukonazol i TMTD, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
13. Postic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Jurkovic, D., Saleh, A. A., Leslie, J. F. (2012.): Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. Journal of phytopathology, 160(2), 76-81.

14. Pusztahelyi, T. Holb, I.J., Pócsi, I (2015.): Secondary metabolite sin fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science* 6:573
15. Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A., Krohn, K., (2002): Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites
16. Sun, X., Guo, L. D. (2012.): Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65-76
17. Xiang Sun & Liang-Dong Guo., (2012) Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, *Mycology*, 3:1, 65-76, DOI: 10.1080/21501203.2012.6567

8. SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj endofitne gljive *Fusarium solani* na porast pšenice. U istraživanju zrna pšenice tretirana su suspenzijom gljive *F. solani* dok su zrna koja su korištena za kontrolu tretirana destiliranom vodom. Tijekom mjerenja izniklih biljaka za svaku od ponavljanja i kontrole, kontrolirao se broj izniklih biljaka, mjerila se dužina većeg i manjeg lista te masa svježe tvari pšenice bez korijena. Nakon istraživanja rezultati su pokazali pozitivan utjecaj gljive na porast pšenice iako rezultati nisu statistički značajni.

Ključne riječi: *Fusarium solani*, endofitna gljiva, pšenica

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the influence of the endophytic fungus *Fusarium solani* on wheat growth. In the study, the wheat grains were treated with a suspension of *F. solani* fungus while grains used for control were treated with distilled water. During the measurement of sprouted plants for each of the replicates and controls, the number of sprouted plants was controlled, the length of the larger and smaller leaves, as well as the mass of fresh substance of rootless wheat were measured. After research, the results showed a positive effect of the fungus on the growth of the wheat, although the results are not statistically significant.

Key words: *Fusarium solani*, endophytic fungus, wheat

10. POPIS SLIKA

Slika 1. Makrokonidije <i>Fusarium</i> sp. gljive slikane elektronskim mikroskopom.....	2
Slika 2. <i>Fusarium thapsinum</i>	4
Slika 3. <i>Fusarium graminearum</i>	5
Slika 4. <i>Fusarium oxysporum</i>	5
Slika 5. Mikroskopski prikaz <i>F. solani</i>	7
Slika 6. Micelij <i>F. solani</i>	8
Slika 7. Hife.....	11
Slika 8. Mikoriza na orhideji.....	12
Slika 9. Građa bakterijske stanice.....	14
Slika 10. Skidanje <i>F. solani</i> sterilnim skalpelom.....	17
Slika 11. Usitnjavanje gljive ručnim mikserom.....	17
Slika 12. Suspenzija gljive.....	18
Slika 13. Zrna pšenice natopljena gljivom <i>Fusarium solani</i>	18
Slika 14. Sterilizirani pjesak.....	19
Slika 15. Zalijevanje pjeska.....	19
Slika 16. Sijanje pšenice.....	20
Slika 17. Komora za uzgoj biljaka.....	21
Slika 18. Mjerenje pšenice.....	21

11. POPIS TABLICA

Tablica 1. Utjecaj gljive <i>Fusarium solani</i> na porast pšenice, mjerenje većeg lista (cm)....	22
Tablica 2. Utjecaj gljive <i>Fusarium solani</i> na porast pšenice, mjerenje manjeg lista (cm)..	24
Tablica 3. Masa svježe tvari pšenice (g).....	25

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Utjecaj gljive <i>Fusarium solani</i> na porast većeg lista pšenice.....	23
Grafikon 2. Utjecaj gljive <i>Fusarium solani</i> na porast manjeg lista pšenice.....	24
Grafikon 3. Utjecaj gljive <i>Fusarium solani</i> na svježu tvar 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 solani* IZOLIRANE S KOROVA NA PORAST PŠENICE

Nikolina Pilinger

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj endofitne gljive *Fusarium solani* na porast pšenice. U istraživanju zrna pšenice tretirana su suspenzijom gljive *F. solani* dok su zrna koja su korištena za kontrolu tretirana destiliranom vodom. Tijekom mjerenja izniklih biljaka za svaku od ponavljanja i kontrole, kontrolirao se broj izniklih biljaka, mjerila se dužina većeg i manjeg lista te masa svježe tvari pšenice bez korijena. Nakon istraživanja rezultati su pokazali pozitivan utjecaj gljive na porast pšenice iako rezultati nisu statistički značajni.

Rad je izrađen u: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Jelena Ilić

Broj stranica: 32

Broj slika: 18

Broj tablica: 3

Broj grafikona: 3

Broj literaturnih navoda: 17

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Fusarium solani*, endofitna gljiva, pšenica

Datum obrane: 19.07.2021.

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

University Graduates studies Organic farming, course Organic farming

INFLUENCE OF ENDOPHYTIC FUNGUS *Fusarium solani* ISOLATED FROM WEEDS ON WHEAT GROWTH

Nikolina Pilinger

Abstract:

The aim of this study was to determine the influence of the endophytic fungus *Fusarium solani* on wheat growth. In the study, the wheat grains were treated with a suspension of *F. solani* fungus while grains used for control were treated with distilled water. During the measurement of sprouted plants for each of the replicates and controls, the number of sprouted plants was controlled, the length of the larger and smaller leaves, as well as the mass of fresh substance of rootless wheat were measured. After research, the results showed a positive effect of the fungus on the growth of the wheat, although the results are not statistically significant.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences

Mentor: Jelena Ilić, PhD, Associate profesor

Number of pages: 32

Number of images: 18

Number of tables: 3

Number of graphs: 3

Number of references: 17

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: *Fusarium solani*, endophytic fungus, wheat

Thesis defended on date: 19.07.2021.

1. Jasenka Ćosić, PhD, Full professor, president
2. Jelena Ilić, PhD, Associate professor, mentor
3. Karolina Vrandečić, PhD, Full professor, member

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