

Antifungalni potencijal *Bacillus subtilis* u kontroli rasta *Fusarium* spp.

Kalaica, Ante

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:151:832813>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-16**



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

Ante Kalaica

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**ANTIFUNGALNI POTENCIJAL *BACILLUS SUBTILIS* U
KONTROLI RASTA *FUSARIUM* SPP.**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ante Kalaica

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**ANTIFUNGALNI POTENCIJAL *BACILLUS SUBTILIS* U
KONTROLI RASTA *FUSARIUM* SPP.**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

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

Osijek, 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1 Korisne bakterije tla	2
2.1.1. Opće karakteristike <i>Bacillus subtilis</i>	2
2.2. Opće karakteristike roda <i>Fusarium</i>	4
2.2.1. Opće karakteristike <i>Fusarium verticillioides</i>	5
2.2.2. Opće karakteristike roda <i>Fusarium graminearum</i>	5
2.3. Mikotoksini	6
3. MATERIJAL I METODE	9
4. REZULTATI	13
5. RASPRAVA	18
5.1. Antifungalno djelovanje <i>B. subtilis</i> na <i>Fusarium graminearum</i> 110250 i FRC R-05796 i <i>Fusarium verticilloides</i> M7075 i M1325	18
6. ZAKLJUČAK	23
7. POPIS LITERATURE	24
8. SAŽETAK	31
9. SUMMARY	32
10. POPIS TABLICA	33
11. POPIS SLIKA	34
12. POPIS GRAFIKONA	35

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

1. UVOD

Tlo je složen ekosustav u kojem se nalaze različiti mikroorganizmi poput bakterija, gljiva, protozoa, algi i virusa (Bonkowski i sur., 2009., Muller i sur., 2016.). Biljke pokazuju raznolik niz interakcija s organizmima koji žive u tlu, a pokrivaju cijeli niz ekoloških mogućnosti od kompetitivnih, mutualističkih ili neutralnih. Većina istraživanja u novije vrijeme je provedena i usmjerena na sprječavanje patogenih učinaka (Strange i Scott, 2005., Zhang i sur., 2013.) ili ublažavanje abiotskog stresa (Yaish i sur., 2016., Meena i sur. ., 2017.).

Uz istraživanja provedena za prevenciju raznih infekcija i abiotskog stresa postoji i više godišnja zainteresiranost prema ekološkim interakcijama koje potiču rast i razvoj biljaka, kao primjer možemo uzeti mikorizne gljive kao i bakterije koje su prisutne u noduliranim leguminozama te su prepoznate kao korijenski simbionti (Morton, 1981.).

Već od 1950-ih godina koriste se razne bakterijske kulture (većinom iz rodova *Bacillus* i *Azotobacter*) za oblaganje sjemena usjeva kako bi se poboljšao rast i prinos (Brown, 1974.), a već do 1980-ih godina pridružuju se i drugi razni sojevi uglavnom iz rodova *Pseudomonas* i *Azospirillum* te se opisuju mikroorganizmima koji potiču rast i razvoj biljaka (Burr i sur., 1978., Teintze i sur., 1981., Lin i sur., 1983.). Sojevi roda *Bacillus subtilis* mogu značajno varirati kako fenotipski tako i genetski što utječe na njihov antagonistički potencijal (Tan, 2013.). Komparativna analiza proteoma soja *B.subtilis* s antagonističkim potencijalom ukazala je glavne razlike u sustavu unutar-staničnih i izvan-staničnih proteina (Zhang, 2009.). Zbog brzog porasta, sposobnosti učinkovitosti rasta u niskim podlogama i sporuliranja u nepoželjnim uvjetima, izolati bacila su privlačni za primjenu kao agensa za biokontrolu (Wu, 2015.).

Istraživanje u ovome radu provedeno je s ciljem utvrđivanja antifungalnog učinka autohtonog soja bakterije *B. subtilis* na predstavnike *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticilloides*.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Korisne bakterije tla

Bakterije rastu u mnogim različitim okolinama i uvjetima u tlu, populacije bakterija su znatne te se brzo šire, a iznimno su konkurentne kada su u rizosferi dostupni lako probavljivi jednostavni šećeri (Sylvia i sur., 2005.).

Bakterije žive uz rubove mineralnih čestica tla, posebno gline i pripadajućih organskih ostataka, a iznimno su važne u proizvodnji polisaharida koji zajedno cementiraju čestice pijeska, gline i mulje te jednostavno poboljšavaju strukturu tla (Hoorman, 2011.). Bakterije se ne kreću daleko i duboko u tlu pa je većina kretanja povezana s vodom, rastom korijena ili povezivanjem s drugom faunom tla (Lavelle i Spain, 2005.).

Bakterije u tlu iznimno su važne u biogeokemijskim ciklusima te se već desetljećima koriste pri proizvodnji usjeva. Interakcija među biljkama i bakterijama u rizosferi je od velikog značaja za zdravlje biljaka i plodnost tla. Slobodno živuće bakterije u tlu korisne su za promicanje rasta biljaka te se obično nazivaju rizobakterije koje potiču rast biljaka (Plant growth promoting rhizobacteria PGPR), a promicanje rasta vrše kolonizacijom korijena biljke (Davison, 1988.).

Glavne funkcije ovih bakterija jesu opskrba usjeva hranjivim tvarima, poticanje rasta biljaka kroz proizvodnju biljnih hormona, kontrola ili inhibicija aktivnosti biljnih patogena, poboljšanje strukture tla i dr. (Brierley, 1985.). U današnje vrijeme bakterije se također koriste za mineralizaciju organskih onečišćujućih tvari odnosno bioremedijaciju onečišćenih tala (Middledrop i sur., 1990.).

U vremenima održive proizvodnje, interakcije među biljkama i mikroorganizmima u rizosferi igraju ključnu ulogu u transformaciji, mobilizaciji i solubilizaciji hranjivih tvari, a upotreba bioloških dodataka postaje sve popularnija gdje PGPR pronalazi još jednu potencijalnu ulogu (Sturz i sur. 2000.; Shoebitz i sur. 2009.).

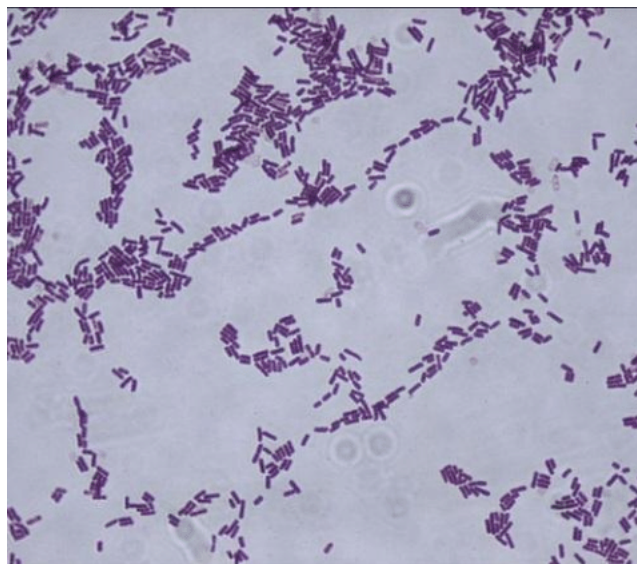
2.1.1. Opće karakteristike *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je sveprisutan organizam kojeg u prirodi pronalazimo u tlu, korijenju biljaka i vodenom okruženju te ga je također moguće uzgajati i lagano manipulirati u laboratoriju (Martinez, 2013.). Široko je primjenjivana vrsta u području biotehnologije, a procjenjuje se

da vrste *Bacillus* uključujući *B. subtilis* proizvode 60 % komercijalno dostupnih enzima (Martinez, 2013.).

Jedna je od najbolje karakteriziranih gram pozitivnih bakterija te se smatra modelnim organizmom, štapićastog je oblika (Slika 1.) te proizvodi endospore koje omogućavaju preživljavanje uz raznim uvjetima okoliša. Ova bakterija se konstantno susreće s raznim klimatskim promjenama (Härtig i Jahn, 2012.). Rod *Bacillus* posjeduje razne izravne i neizravne načine zaštite biljaka od patogena, a jedan od metoda je proizvodnja antimikrobnih sredstava kao što su antibiotski lipopeptidi uključujući fengicin, surfaktin i iturin koji izazivaju povećanje rezistencije biljke (Fita i sur., 2015.). Kloepper i sur., (1989.) označavaju *B. subtilis* A13 kao rizobakteriju koja potiče rast biljaka (PGPR) te je opisuju kao umjereno konkurentnu u rizosferi. Pokazalo se da sojevi *B. subtilis* sintetiziraju antifungalne peptide (Kajimura i sur., 1995.) i tvari koje potiču rast biljaka, uključujući giberelin i indol-octenu kiselinu (Turner i Beckamn, 1991.).

Osim toga što je *B. subtilis* izravan promotor rasta biljaka ova bakterija također ima sposobnosti smanjivanja abiotskog stresa koji limitira maksimalan potencijal prinosa usjeva (Hashem i sur., 2019.) jer su u modernim vremenima dva su najveća ograničenja u poljoprivredi, a to su vodeni i solni stres (Li i sur., 2009.).



Slika 1. Mikroskopski prikaz stanica *Bacillus subtilis*

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Bacteria-Bacillus-Subtilis-under-the-micrographic_fig1_335200407

Vodu kao ograničeni prirodni resurs pri navodnjavanju u narednih nekoliko desetljeća bi bilo potrebno smanjiti, a već do sada između 20% - 50% navodnjavane površine kontaminirano je soli te bi *B. subtilis* mogao igrati važnu ulogu u budućnosti (Kumar, 2015).

2.2. Opće karakteristike roda *Fusarium*

Fusarium je iznimno opširan rod gljiva, a ono što ga čini zanimljivim je da ovaj rod izaziva različite biljne bolesti i proizvodi širok raspon sekundarnih metabolita (Nelson i sur., 1981.).

Patogeni koji uzrokuju bolesti kod roda *Fusarium* prenose se u tlu te inficiraju nadzemne dijelove biljaka, no procesi kojima *Fusarium* inficira svoje domaćine nisu dobro shvaćeni (Mendgen i sur., 1996.).

Fuzarijske bolesti koje utječu na usjeve žitarica uzrokuje nekoliko vrsta roda *Fusarium*. Najčešće su to: *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* (Munkvold, 2003.). Prema Ćosić i sur., (2011.) mnogi pripadnici roda *Fusarium* su biljni patogeni koji se obično prenose tlom, vjetrom ili kišom, a javljaju se na biljnim površinama ili unutar biljaka kao patogeni i endofiti. *Fusarium* uzrokuje brojne bolesti kultiviranog bilja kao što su plemenjača, krastavost žitarica i trulež korijena (Ćosić i sur., 2011.).

Razne vrste roda *Fusarium* inficiraju usjeve biljaka diljem svijeta u raznim klimatskim zonama (Thrane, 1999.). Ovaj roda gljiva dobro je poznat po štetama i bolestima koje uzrokuje, a šteta se svodi na gubitak prinosa kao i smanjenom kvalitetom zrna. Infekcija žitarica kao što su ječam, kukuruz (Slika 2.) i pšenica često se prati kontaminacijom mikotoksina te tako utječe na prehranu ljudi i životinja (Asam, 2017.). Mikotoksini ove vrste gljiva mogu se kategorizirati u četiri velike skupine : trihoteceni, zearalenon, fumonizini i eniatini (Rychlik, 2017.).



Slika 2. *Fusarium graminearum* na kukuruзу

Izvor: <https://bladmineerders.nl/parasites/fungi/ascomycota/pezizomycotina/sordariomycetes/hypocreales/fusarium/fusarium-graminearum/>

2.2.1. Opće karakteristike *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides je najčešće izoliran iz biljke kukuruza kao i pšenice te uzrokuje smanjenje prinosa diljem svijeta (Li i sur., 2019.). Infekcija ovim patogenom zabilježila u nekoliko zemalja smanjenje proizvodnje kukuruza od 10-50% (Venturini i sur., 2011.). Bolesti uzrokovane ovom vrstom roda *Fusarium* su: palež klijanaca, trulež korijena, stabljike i klipa. (Ćosić i sur., 2017.). *F. verticillioides* raste na temperaturi između 3-37 °C, s optimalnom temperaturom od 25 °C, rast ove vrste je moguć s aktivnošću vode pri 0.87, ali je iznimno spor ispod 0.90, aktivnost vode ima vrijednost između 0 i 1, vrijednost 0 znači da apsolutno nema dostupne vode te je vrlo rijetko u hrani, dok vrijednost 1 znači da je sva voda u proizvodu dostupna, što je čista voda. Ovo nam prikazuje kako ova vrsta može rasti pod smanjenom prisutnosti kisika, ali ne i potpunoj odsutnosti (Pitt, 2014.). Ova vrsta proizvodi niz mikotoksina među kojima se fumonizini smatraju najprisutnijima (Conner i sur., 1996.).

2.2.2. Opće karakteristike roda *Fusarium graminearum*

F. graminearum je glavni uzročnik fuzarioza kod žitarica kao što su pšenica i ječam te truleži klipova i stabljika kod kukuruza uzgajanog diljem svijeta (Pauls, 2017.). Zbog vlažnog i toplog

vremena, infekcije mogu dosegnuti visoku razinu što rezultira znatnim gubitcima prinosa i smanjenje kvalitete (Kant, 2017.).

Zbog svojih razornih učinaka, *F. graminearum* je pod intenzivnim istraživanjem dugi niz godina kako bi se razumjela genetska osnova životnog ciklusa, patogenost, evolucija i biologija populacije (Ma i sur., 2010.). *F. graminearum* poslije žetve ostaje u i na biljnim ostacima zaraženog domaćina te tim putem predstavlja izvor zaraze u nadolazećoj vegetaciji, njegovom širenju na daljnja područja znatno doprinose kiša i vjetar, a do zaraze klasova dolazi od cvatnje do sazrijevanja zrna, dok je biljka u fazi cvatnje najosjetljivija (Matić i sur., 2020.) .

Žitarice zaražene ovim rodovima mogu sadržavati povećane razine mikotoksina trihotecena i estrogenog mikotoksina zearalenona i time čini zrno neupotrebljivo za humanu ili stočnu hranu (McMullen i sur., 1997.).

Kod ljudi, *F. graminearum* je povezan s alimentarnom toksičnom aleukijom i Akakabi toksikozom, to su bolesti koje izazivaju razne poteškoće poput mučnine, povraćanja, anoreksije i slično (Bennet i Klich, 2003.). Pretpostavlja se kako za inhibitore sinteze proteina, kronična izloženost trihotecenima ima široke učinke tipa neuroloških poremećaja i imunosupresije (Bennett i Klich, 2003.).

2.3. Mikotoksini

Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti koji su producirani od strane gljivičnih vrsta kao što su *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium*, ovi sekundarni metaboliti su fitotoksični ili štetni za zdravlje ljudi i životinja, pokazalo se kako je upravljanje fuzarijskim fitopatogenima iznimno teško zbog njihove genetske varijabilnosti i specifičnosti domaćina (Ploetz, 2015.). Vrste roda *Fusarium* koje proizvode mikotoksine glavni su patogeni na žitaricama kao što su pšenica, ječam, kukuruz i zob (Nganje, 2014.).

Mikotoksini se mogu nakupiti u tkivima žitarica i povrća i postati opasni po život ili ozbiljno narušiti biološke sustave ljudi i životinja. Mnogi toksini poput fumonizina i trihotecena su toplinski stabilni i ne mogu se deaktivirati kuhanjem. Jedini način da se ova situacija prevenira je sprječavanje ili inhibiranje proizvodnje mikotoksina na terenu, a potrebno je razumjeti

molekularne mehanizme djelovanja mikotoksina roda *Fusarium* tijekom procesa infekcije (Voigt, 2007.).

Kod fuzarijskih mikotoksina prvenstveno se radi o trihotecenima, fumonizinima te zearalenonu (Slika 3.), razumijevanje biologije ovih mikotoksina je vrlo važno i može imati veliki utjecaj na njihove strategije upravljanja (Bakker i sur., 2018.).

Vrste poput *F. graminearum* i *Fusarium culmorum* patogeni su visokog značaja na žitaricama poput pšenice, zobi i ječma, a također su glavni uzrok kontaminacije trihotecenom u žitaricama koje su rasprostranjene diljem svijeta, trihoteceni su jedna od glavnih grupa mikotoksina roda *Fusarium* te može izazvati ozbiljnu toksikozu kod ljudi i životinja (Pasquali i sur., 2016.). Toksičnost trihotecena ovisi o vrsti biljke domaćina, kao primjer možemo uzeti T-2 toksin i 15-acetildeoksinivalenol koji su vrlo toksični za pšenicu dok deoksinovalenon i 3-acetildeoksinivalenol nisu (Eudes, 2000.).

Fumonizini su skupina mikotoksina dobivenih iz poliketida koje proizvoda *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *Fusarium sacchari* i nekoliko drugih vrsta, ova skupina je zaslužna za izazivanje leukoencefalomalacije konja, plućnog endema svinja te raka jednjaka kod ljudi, fumonizini su također fitotoksični, a fumonizin B1 uzrokuje štetu na širokom spektru žitarica (Smith, 2018.). Toksin remeti plazmatsku membranu u biljnim i životinjskim vrstama što je vjerojatno uzrokovano nakupljanjem toksičnih sfingolipidnih intermedija (Abbas, 1993.).

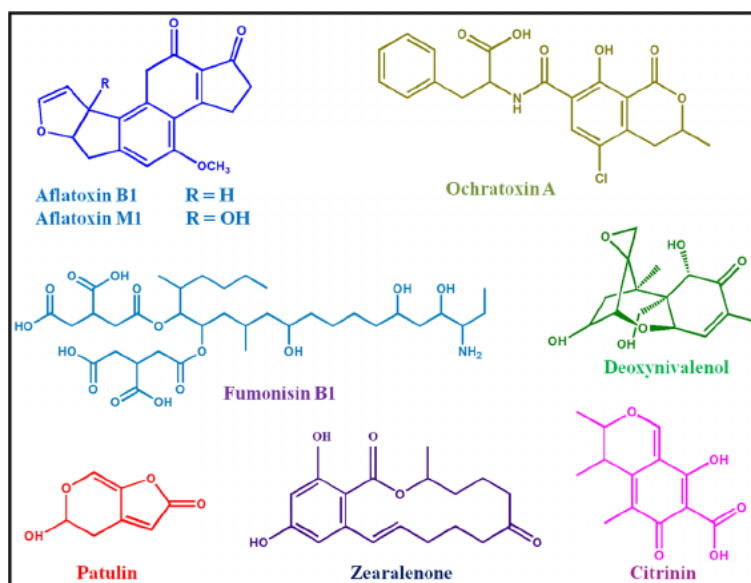
Zearalenon još poznat kao F-2 toksin obično pronalazimo u žitaricama kao što su ječam, sirak, zob, pšenica, zbog svoje estrogenske aktivnosti uzrokuje vulvovaginitis kod svinja, a kod kukuruza stimulira curenje elektrolita poput aminokiselina, toksin također smanjuje aktivnost enzima atpaze u koleoptilima kukuruza (Vianello i Macri, 1978.). Rezultati istraživanja provedeni od strane Vianella i Macri 1978. godine sugeriraju da zearalenon može promijeniti propusnost plazmatske membrane i tonoplasta.

Životni ciklus vrsta roda *Fusarium* počinje kolonizacijom domaćina, a uspješno preživljavanje dovodi do sporulacije gdje se spore prenose vjetrom i vodom, što nam govori kako je njihov životni ciklus ovisan o okolišnim čimbenicima, a čimbenici poput temperature, aktivnosti vode, vremena rasta imaju izravan utjecaj pri proizvodnji deoksinovalenona u *F. graminearum* i *F. culmorum* (Hope i sur., 2005.).

Razine toksina znatno su veće u mediteranskim i drugim regijama gdje su patogeni izloženi ekstremnoj temperaturi, oborinama i dugotrajnoj suši (Cavaglieri i sur., 2009.). Truleži

uzrokovane od strane *F. verticillioides* pogoršavaju se tijekom faze cvatnje, a nakupljanje toksina je također pogodnije tijekom toplih uvjeta s manje oborina (Munkvold, 2003.).

Fusarium kolonizira i uništava biljna tkiva savladavajući obrambene mehanizme biljaka te proizvodeći toksine specifične za domaćina, a fuzarijske bolesti mogu dovesti do čak 50 % gubitaka kod žitarica (Parry i sur., 1995.).



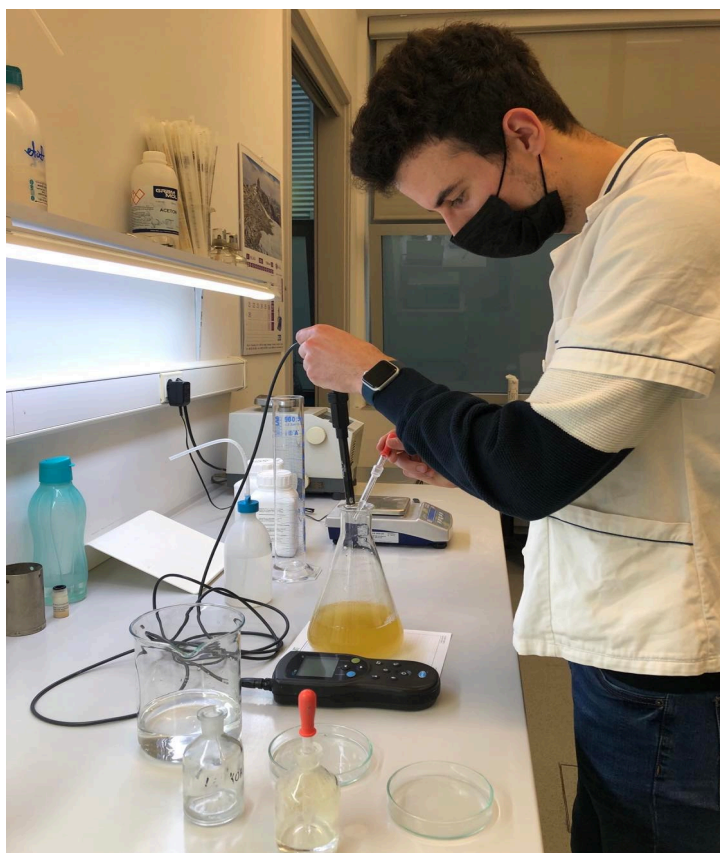
Slika 3. Kemijska struktura poznatih mikotoksina

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-some-of-the-important-mycotoxins_fig4_264635821

3. MATERIJAL I METODE

Postavljen je *in vitro* pokus u kojem je testiran antifungalni potencijal bakterije *Bacillus subtilis* iz kolekcije Katedre za mikrobiologije Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. U pokusu su korištene čiste kulture sljedećih vrsta: *Fusarium graminearum* 110250 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Nizozemska), *Fusarium verticillioides* FRC M-1325, *Fusarium verticillioides* FRC M-7075 i *Fusarium graminearum* FRC R-05796 (Fusarium Research Center, SAD).

Fusarium spp. je uzgojen na krumpir-dekstroznom agaru (Biolife) na $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ tijekom sedam dana (Slika 4 i 6). *Bacillus subtilis* je uzgojen na hranjivom agaru (Liofilchem) na $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ tijekom 48 h (Slika 5). Postavljen je pokus s dvije kulture (dual culture *in vitro*) pri čemu se nacijepljene gljive i bakterija stavljaju jedna nasuprot druge u petrijevu zdjelicu, te se mjeri suzbijanje micelijskog rasta.



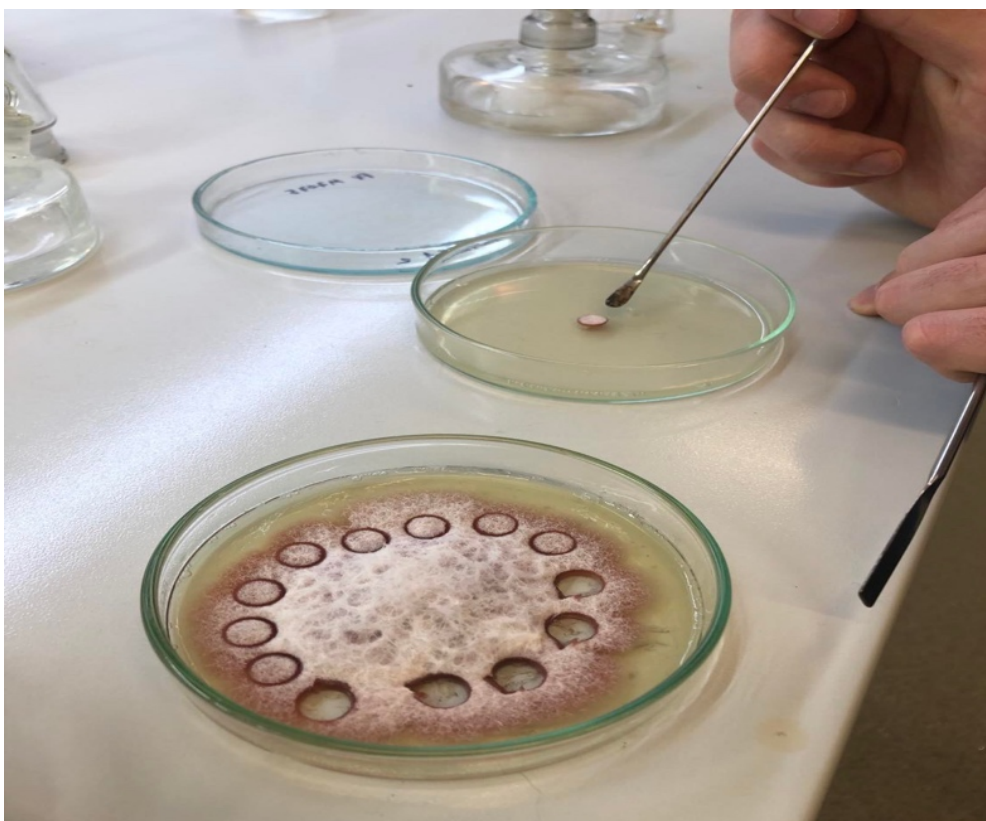
Slika 4. Prilagođavanje pH vrijednosti hranjive podloge

Izvor: autor



Slika 5. Nacijepljivanje *B.subtilis*

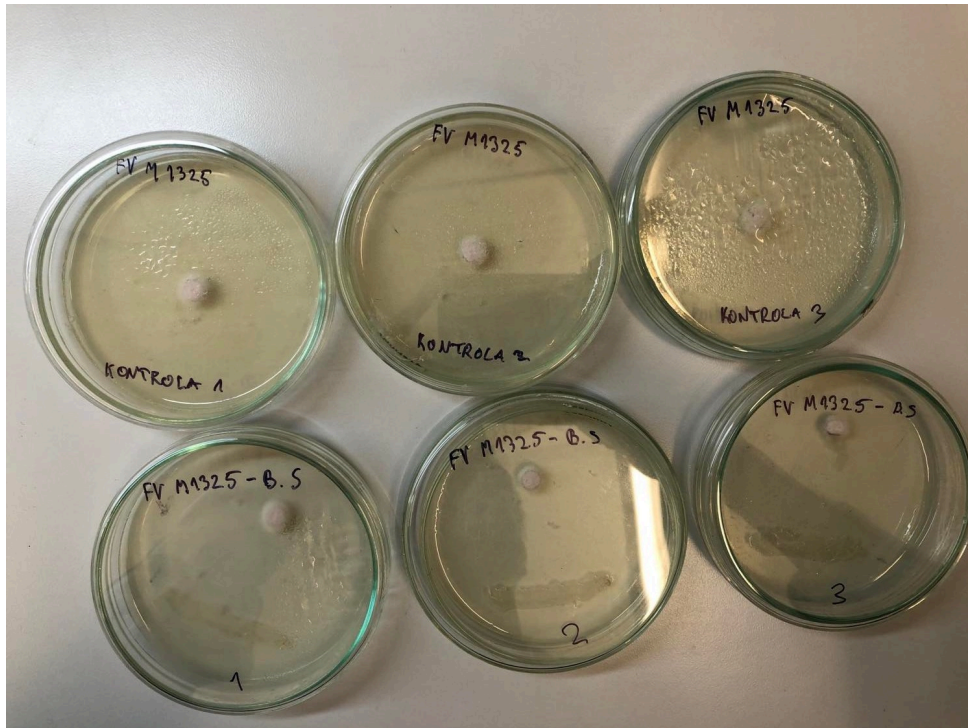
Izvor: autor



Slika 6. Nacijepljivanje *Fusarium* spp.

Izvor: autor

Inokulacija *Fusarium* spp. je provedena micelijskim diskom s rubova kolonije čistih kultura promjera 8 mm. Dok je nasuprot micelijskog diska u liniji zasijana kultura *B. subtilis* (Slika 7.). Svaki tretman je imao tri ponavljanja a inkubacija je provedene na $27^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ u laboratorijskom termostatu. Kontrola je bila nacijepljena samo s ispitanim vrstama roda *Fusarium*. Kroz 10 dana je praćen porast rasta plijesni mjerenjem promjera kolonije. Ovaj porast je korišten za računanje stope rasta.



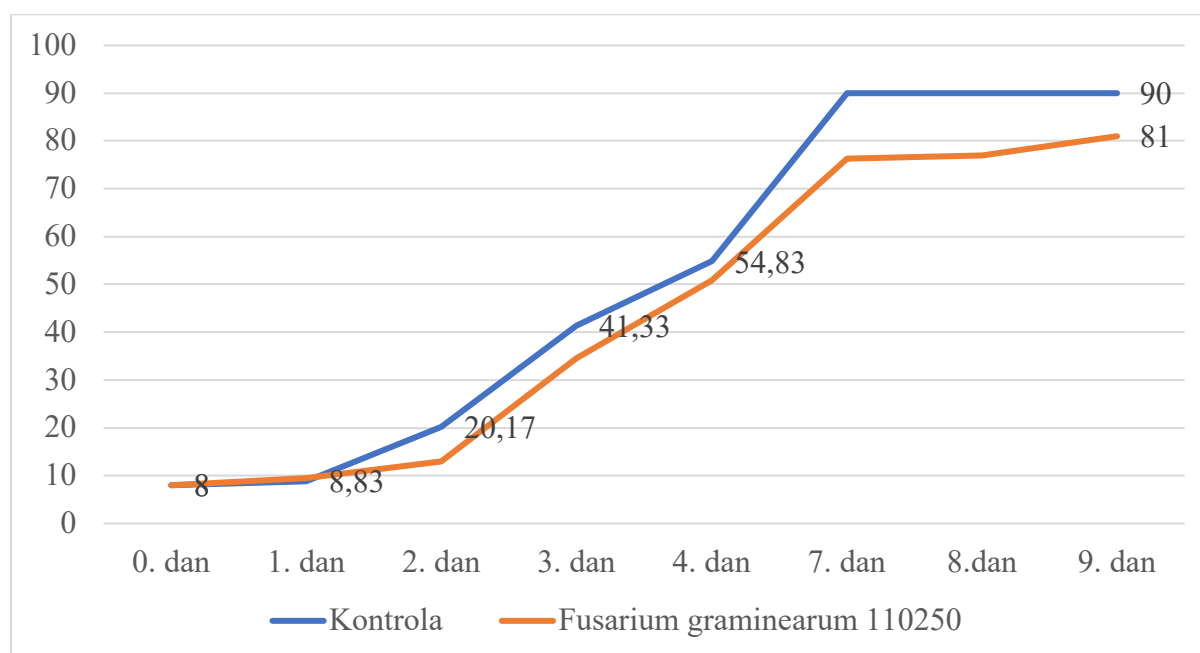
Slika 7. *B.subtilis* zasijan nasuprot *Fusarium* spp.

Izvor: autor

U razdoblju od 10 dana, mjerenjem dva promjera kolonije pod pravim kutom, pratili smo micelijski rast zasijanih rodova *Fusarium*. Rezultati su dobiveni statistički analiziranim Studentovim t- testom, a za analizu podataka korišten je Microsoft Excel (2013.).

4. REZULTATI

Provedeno istraživanje nije utvrdilo statistički opravdan antifungalni utjecaj *B.subtilis* prema *Fusarium* spp.

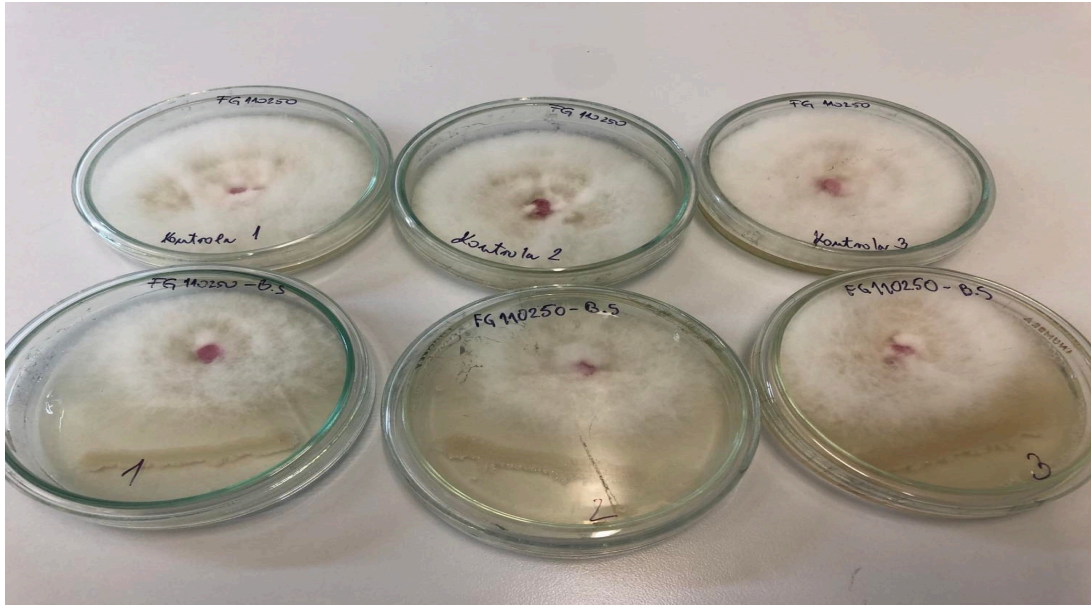


Grafikon 1. Rast *Fusarium graminearum* 110250 uz *Bacillus subtilis*

Tablica 1. Statistički prikaz razlike rasta *Fusarium graminearum* 110250 i kontrole

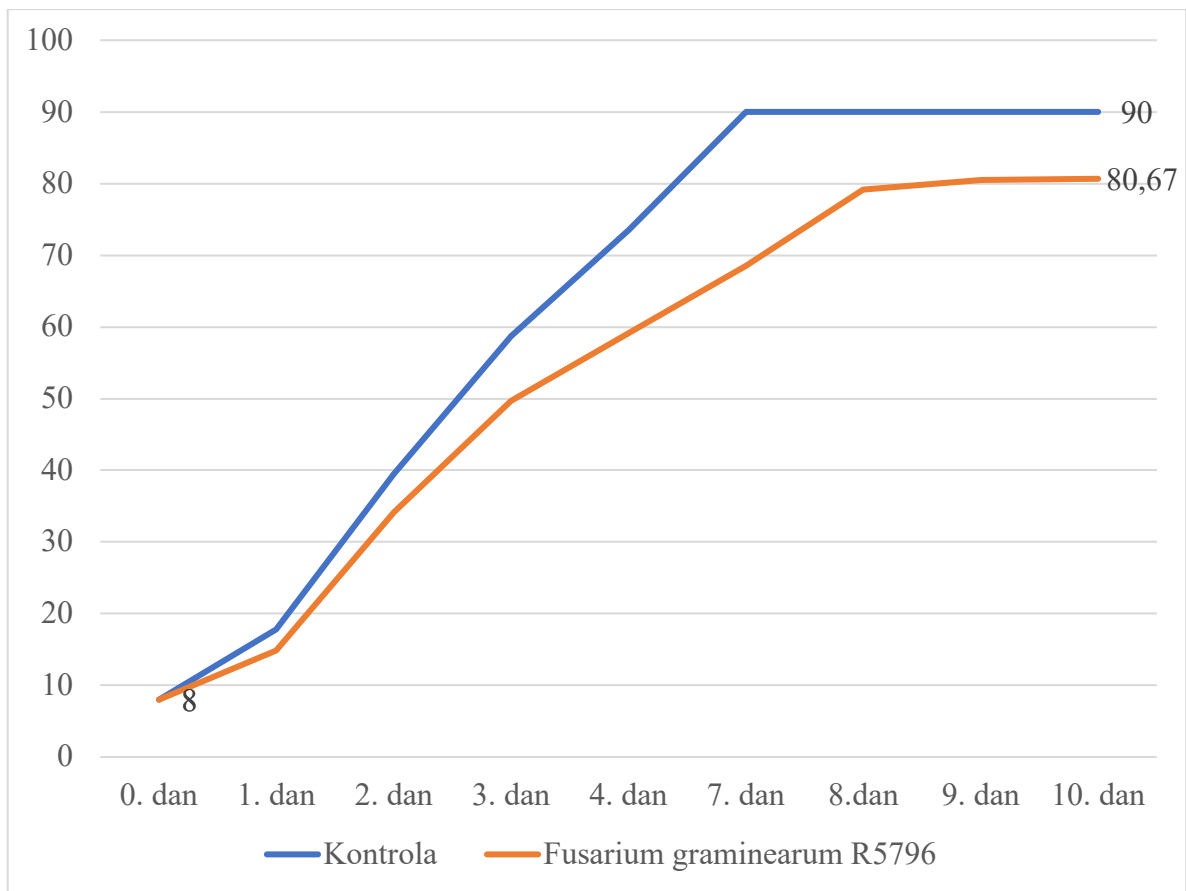
Kultura	stopa rasta (mm/dan)	p
kontrola	5,48	
<i>FG</i> 110250 i <i>B. subtilis</i>	4,85	0,699001

U Grafikonu 1. i Tablici 1. prikazan je dnevni porast micelija (Slika 8.), stopa rasta *F. graminearum* 110250 u odnosu na kontrolu kao i statistička analiza pri kojoj nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i ispitivanog tretmana.



Slika 8. *Fusarium graminearum* i *Bacillus subtilis* 7. dan od postavljanja pokusa

Izvor: autor

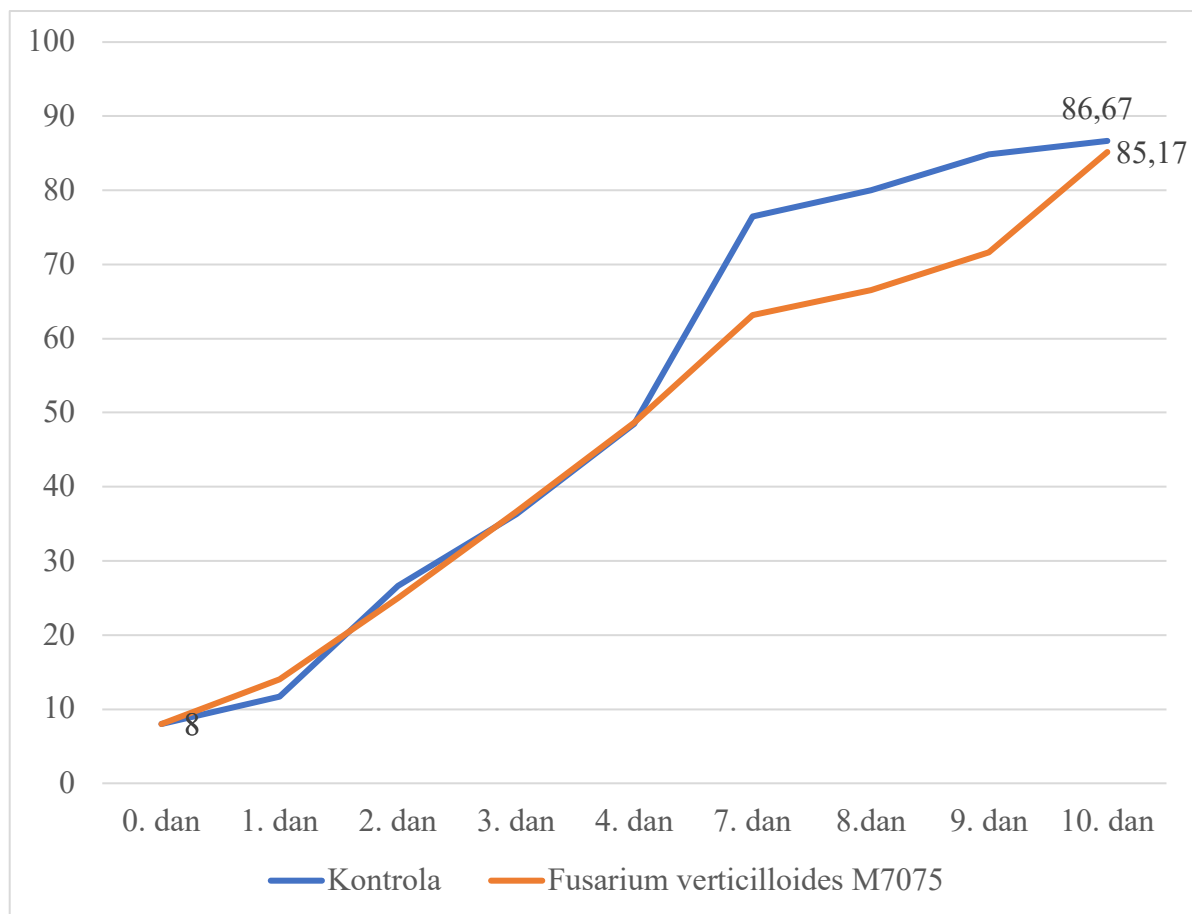


Grafikon 2. Rast *Fusarium graminearum* R5796 uz *Bacillus subtilis*

Tablica 2. Statistički prikaz razlike rasta *Fusarium graminearum* R5796 i kontrole

Kultura	stopa rasta (mm/dan)	p
kontrola	6,17	
<i>FG</i> R5796 i <i>B. subtilis</i>	5,27	0,546351

U Grafikonu 2. i Tablici 2. prikazan je dnevni porast micelija, stopa rasta *F. graminearum* R5796 u odnosu na kontrolu kao i statistička analiza pri kojoj nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i ispitivanog tretmana.

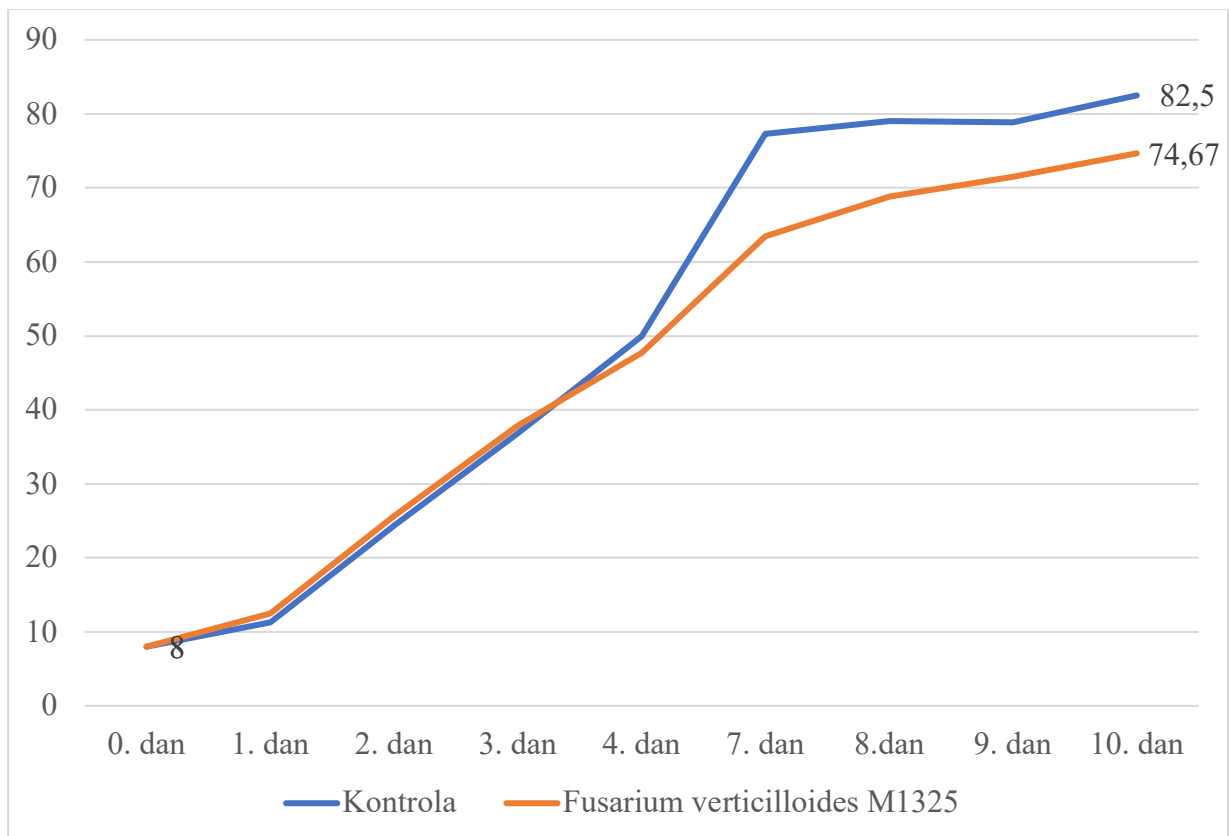


Grafikon 3. Rast *Fusarium verticillioides* M7075 uz *Bacillus subtilis*

Tablica 3. Statistički prikaz razlike rasta *Fusarium verticillioides* M7075 i kontrole

Kultura	stopa rasta (mm/dan)	p
kontrola	5,10	
<i>FV</i> M7075 i <i>B. subtilis</i>	4,65	0,752302

U Grafikonu 3. i Tablici 3. prikazan je dnevni porast micelija, stopa rasta *F. verticillioides* M7075 u odnosu na kontrolu kao i statistička analiza pri kojoj nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i ispitivanog tretmana.

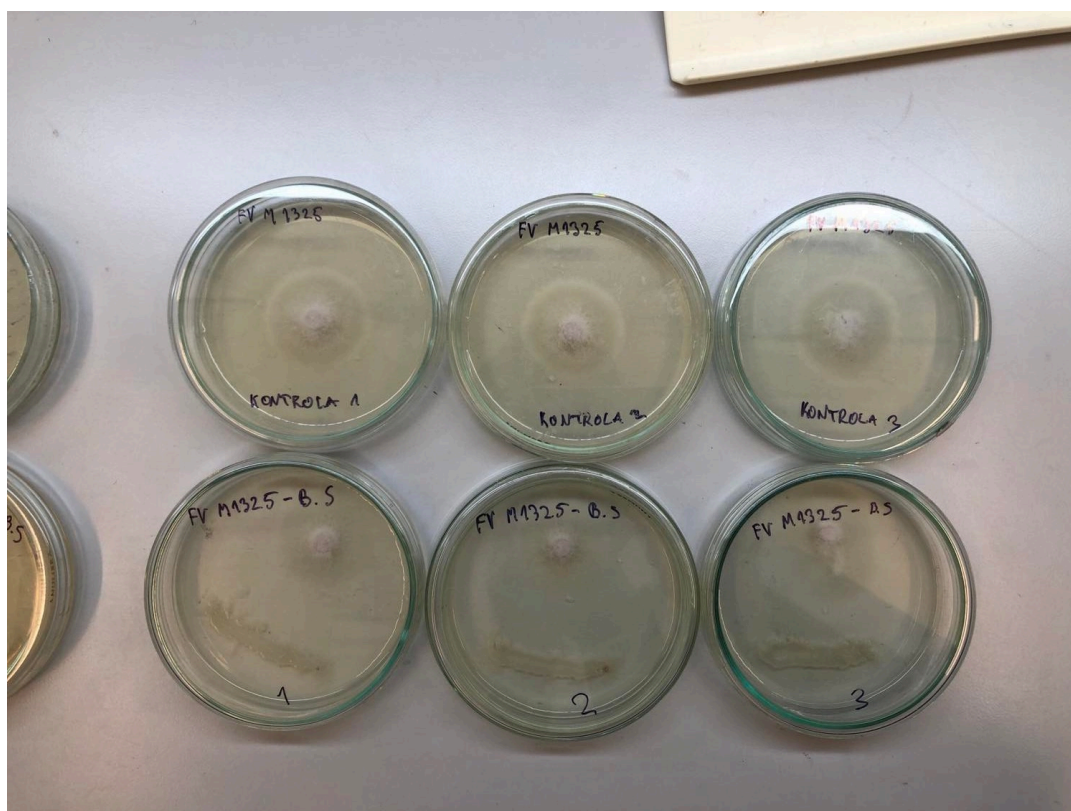


Grafikon 4. Rast *Fusarium verticillioides* M1325 uz *Bacillus subtilis*

Tablica 4. Statistički prikaz razlike rasta *Fusarium verticillioides* M1325 i kontrole

Kultura	stopa rasta (mm/dan)	p
kontrola	4,98	
<i>FV</i> M1325 i <i>B. subtilis</i>	4,56	0,756632

U Grafikonu 4. i Tablici 4. prikazan je dnevni porast micelija, stopa rasta *F. verticillioides* M1325 u odnosu na kontrolu kao i statistička analiza pri kojoj nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i ispitivanog tretmana.



Slika 9. *Fusarium verticillioides* M1325 i *Bacillus subtilis* 3. dan od postavljanja pokusa

Izvor: autor

5. RASPRAVA

5.1. Antifungalno djelovanje *B. subtilis* na *Fusarium graminearum* 110250 i FRC R-05796 i *Fusarium verticilloides* M7075 i M1325

Ovo istraživanje nije zabilježilo statistički opravdano antifungalno djelovanje ispitivanog roda *B. subtilis* na micelijski rast *F. graminearum* 110250 i *F. graminearum* R5796 kao i *F. verticilloides* M7075 i *F. verticilloides* M1325 kao što je prikazano u prethodnim tablicama (1. – 4.) i grafikonima (1. – 4.).

Biljne bolesti rezultiraju gubitkom između 10-15 % ukupnih svjetskih usjeva čija ekonomska šteta prelazi stotine milijardi dolara (Chatterjee i sur., 2016.). Od biljnih bolesti 70-80 % uzrokuju patogene gljive, ove gljive imaju iznimno negativan učinak na rast usjeva i prinos (Li i sur., 2017). U posljednje vrijeme bolesti uzrokovane patogenim gljivama uzrokuju ozbiljne štete na kvalitetu usjeva i prinos te tako predstavljaju iznimno velik problem za održivu poljoprivredu (Marin-Menguiano i sur., 2019.).

B. subtilis je ekološki prihvatljiv i općenito siguran mikroorganizam koji je prisutan posvuda u prirodi, posjeduje širok spektar djelovanja među kojima su inhibitorni učinci protiv patogena koji se prenose u tlu (Miljaković i sur., 2020.).

Bakterijski endofiti koje posjeduje rod *Bacillus* može suzbiti rast patogena kao što su *Fusarium udum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia bataticola in vitro* (Senthilkumar i sur., 2009.).

Bacillus je također dobro poznat stimulans rasta biljaka, Yildirim i sur., (2008.) izolirali su nekoliko sojeva *Bacillus* iz slanih tala u Turskoj te otkrili kako mogu povećati razvoj rotkvice, dok Valdez i sur., (2011.) pronalaze soj *B. subtilis* koji ima sposobnost poticanja rasta suncokreta. Analiza genoma roda *Bacillus* pokazuje kako bakterije ovog roda posjeduju gene koji kodiraju metabolite usko povezane s biološkom kontrolom (Blom i sur., 2012.).

Genetske informacije koje su nam dostupne o genomskim sekvenciranjima daju nam bolje razumijevanje o rodu *Bacillus* kao sredstvu za biokontrolu biljnih bolesti. Chen i sur.,(2018.) karakteriziraju genom *Bacillus velezensis* LM2303 poznatim po snažnom potencijalu biokontrole nasuprot *F. graminearum* (Chen i sur., 2018). Ovaj soj predstavlja najveći broj biokontrolnih gena u usporedbi s prethodno proučavanim sojevima. Trinaest biosintetskih

genskih klastera povezanih s biokontrolnom aktivnošću identificirano je integriranim pristupom sekvenciranja genoma i kemijske analize, uključujući tri antifungalna metabolita fengicin B, iturin A i surfaktin A (Deng i sur., 2020.).

Iz rezultata slično provedenih istraživanja doznajemo antagonistički utjecaj *B. subtilis* 30VD-1 i *Bacillus simplex* 30N-5 na *Fusarium* spp., naime ovi bakterijski sojevi uzrokovali sprječavanje formiranja gustih hifnih prostirki kod *F. oxysporum*, *Fusarium matthioli*, *F. solani* i *Fusarium conglomerans* (Khan i sur., 2018.). Nakon 7 dana inkubacije ove bakterije su inhibirale rast gljivica za 60-70 % in vitro. Iako je *B. simplex* uzrokovao znatno stanjivanje hifa i relativno manje gustu hifnu mrežu ova bakterija nije zaustavila rast toliko značajno kao *B. subtilis* 30VD-1 u istom istraživanju.

Istraživanja Adeniji i sur. (2019.), detektirala su sedam izolata roda *Bacillus* s biosupresivnim učincima protiv *F. graminearum* i otkrili da imaju korisne klastere gena koji kodiraju biokontrolna sredstva. Otisak kombinacije gena otkriven je PCR-om te nam prikazuje vrijednost i važnost diferencijacije i selekcije sojeva za identifikaciju soja koji posjeduju najveću antimikrobnu aktivnost čime se otkriva kandidat za biokontrolu (Adeniji i sur., 2019.).

Istraživanje provedeno u svrhu kontrole truleža korijena soje uzrokovanog s *F. graminearum* i *F. oxysporum* od strane Zhang i sur., (2009.) godine pokazalo je da 8 sojeva (SB01, SB04, SB23, SB24, SB28, SB33, CB01 i CH22) od 26 testiranih sojeva *B. subtilis* pružaju značajnu i dosljednu zaštitu biljaka soje od navedenih fitopatogena. Jačina truleži korijena uzrokovana s dvije vrste roda *Fusarium* je značajno smanjen ovim bakterijskim sojevima, uz značajno istovremeno povećanje nicanja sjemena, visine biljke ili suhe težine korijena u usporedbi s netretiranim biljkama. Šest sojeva *B. subtilis* (SB01, SB04, SB23, SB24, SB28 i SB33) iz izoliranih korijena soje i dva soja (CB01 i CH22) iz korijena kukuruza značajno su smanjili infekciju truleži korijena uzrokovanog rodom *Fusarium* u tretiranju sjemena ili tla. Sojevi SB01, SB04, SB23 i SB24 bili su najučinkovitiji tretmani protiv oba patogena u tretiranju sjemena ili tla. Kada se primjenjuju kao tretmani sjemena, ova četiri soja smanjila su jačinu truleži korijena za 43 do 63 % i povećala nicanje za 13 do 17 %, visinu biljke za 9 do 18 % i suhu masu korijena za 8,4 do 19 %. Kada se koriste kao tretmani tla, smanjili su ozbiljnost truleži korijena za 68 do 74 % i povećali nicanje za 14 do 18 %, visinu biljke za 11 do 23 %, a suhu težinu korijena za 16 do 24 %. (Zhang i sur., 2009.). Učinci tretiranja sjemena i tla sojevima *B. subtilis* na suzbijanje truleži korijena soje *F. oxysporum* i *F. graminearum* procijenjeni su u stakleničkim uvjetima, a na temelju smanjenja jačine truleži korijena i

povećanja nicanja sjemena, visine biljke i suhe težine korijena, istraživanja su utvrdila kako je tretiranje tla učinkovitije (Xue i sur., 2009.).

U studijima dualne kulture pokazano kako *B. subtilis* sojevi SB01, SB04, SB23, SB24 i njihovi filtrati bez stanica značajno inhibiraju rast micelija i klijanje spora *F. oxysporum* i *F. graminearum* u *in vitro* pokusu koji su proveli Tambong i sur., (2009.). Prisutnost i veličina inhibicijskih zona u većini slučajeva korišteni su kao glavni kriteriji u odabiru sredstava za biokontrolu i promatrani su kao dokaz proizvodnje sekundarnih metabolita antifungalnih sojeva bakterija. Proizvodnja inhibicijskih zona od strane bakterija odabranih u ovoj studij mogla bi sugerirati da ovi novi sojevi *B. subtilis* potiskuju rast micelija *F. graminearum* i *F. oxysporum* stvaranjem inhibitornih tvari koje dopijevaju u medij (Zhang i sur., 2009.).

Provedeno istraživanje bazirano na kvantitativnim promjenama biljnih obrambenih enzima i fitohormona u biokontroli fuzarijskog venuća krastavca s *B. subtilis* u *in vitro* eksperimentu od strane Chen i sur., (2009.) godine pokazalo je visoku stopu nicanja sjemena, održivost i povećanu biomasu na presadnicama krastavca kao rezultat inokulacije *B. subtilis* B579. Istodobno je uočen povećan sadržaj indol-octene kiseline u presadnicama krastavca tretiranih s rodom *Bacillus*. Indol-octena kiselina je važan fitohormon sa sposobnošću kontroliranja razvoja biljaka na koristan i štetan način. Sposobnost sintetiziranja IAA svojstvo je koju posjeduju mnoge bakterije, uključujući i promotore rasta biljaka i fitopatogene (Duca, 2014.). IAA koji oslobađaju PGPR bio bi jedan od važnih mehanizama za poboljšanje rasta biljaka (Asghar i sur., 2002). Dok je primjena mješavine sojeva *B. subtilis* GB03 i *Bacillus amyloliquefaciens* IN937 poboljšala je biljni rast roda *Arabidopsis* (Ryu i sur., 2007.).

Također neka slična istraživanja ustanovila su kako je vaskularno venuće krastavca uzrokovano *Fusarium oxysporum* ekonomski važna bolest u cijelom svijetu (Zhang i sur., 2008). Ova bolest je uzrokovana parazitima koji se prenose u tlu, a kemijske metode koje se koriste za suzbijanje fuzarijskog venuća su neučinkovite ili potencijalno imaju neke posljedice prema okolišu kao i zdravlju ljudi (Becker i Schwinn., 1993). *B. subtilis* SQR 9 ima mogućnost brzog i učinkovitog koloniziranja korijena krastavca nakon inokulacije rizosfere (Cao, 2011.). Bakterijske stanice često koloniziraju površine primarnih korijena te produljuju bočne korijenske spojeve (Gamalero i sur., 2004.). Potvrđeno je kako je soj *B. subtilis* SQR 9 sposoban preživjeti duž rizosfere krastavca. Velika populacija unesenog soja pronađena je u tlu rizosfere, posebice u unutrašnjosti korijena (Cao, 2011.). Prisutnost velikog broja *B. subtilis* SQR 9 u tlu rizosfere zaštitio bi biljke od patogena koji se prenose u tlu, budući da je

kolonizacija korijena sredstvima za biokontrolu iznimno važna za učinkovitu kontrolu fitopatogena (Compant i sur., 2005.).

Istraživanje provedeno od strane Cao i sur., (2011.) utvrdilo je postojanje antagonizma između *B.subtilis* SQR 9 i *F. oxysporum* in vitro antagonističkim testom te je pokazana jasna zona supresije rasta *F. oxysporum*, micelij najbliži bakteriji postao je žut što govori da su neki difuzijski spojevi dospjeli u micelij (Cao i sur., 2011.). Zbog postojanja i preživljavanja te širokog raspona domaćina *F. oxysporum* u tlu tijekom dužeg razdoblja ovu bolest je teško upravljati i plodoredom (Armstrong i sur., 1981.). Biološka kontrola predstavlja obećavajući pristup za zaštitu biljaka od patogena iz tla (Compant i sur., 2005.).

Istraženo je kako razne vrste roda *Bacillus* proizvode veliki broj peptida koji omogućuju biosintezu antibiotika i antifungalnih sekundarnih metabolita kao što su fengicin, ericin, subtilin (Chung, 2008.) koji predstavljaju preko 25 različitih osnovnih kemijskih struktura koje inhibiraju rast micelija i različitih patogena difuzijom u mediju kulture. (Tambong i sur., 2009.).

Provedena istraživanja govore nam kako se stanične stijenke roda *Fusarium* sastoje od hitina, α -1,3-glukana i β -1,3-glukana (Schoffemeer i sur., 1999.). To implicira da su enzimi ili glukanaze koje razgrađuju hitin vrlo vjerojatno odgovorne za učinke *B.subtilis* 30VD-1 na stanjivanje hifa. Budući da je nedostajala potpuna sekvenca genoma za *B.subtilis* 30VD-1 korišteni su genomi *B.simplex* kako bi se razjasnili identiteti gena koji su odgovorni za degradaciju stanične stijenke (Khan i sur., 2018.). Također autori sugeriraju kako se mnogi geni otkriveni u genomima *B. simplex* također nalaze u *B.subtilis* 30VD-1.

Bakterije koriste hidrolitičke enzime kako bi razgradile materijale stanične stijenke biljaka za iskoristivi ugljik, i tako suprimiraju rast gljive (Kaplan i sur., 2013.).

In vitro i *in vivo* istraživanje provedeno u svrhu supresije micelijskog rasta korištenjem endofitskog *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 protiv patogenog *F. oxysporum* kod rajčice od strane Shahzad i sur. (2017.). Rezultati su utvrdili kako je *B. amyloliquefaciens* RWL-1 proizvodi organske kiseline te ima antagonistički utjecaj prema *F. oxysporum*, ovaj soj *Bacillus* potaknuo je rast rajčice kao i otpornost na ozbiljnu bolest uzrokovanu *F. oxysporum* (Shahzad i sur., 2017.).

B. subtilis E1R-j izoliran je kao endofit iz korijena pšenice kao biokontrolno sredstvo koje je učinkovito protiv brojnih patogena korijena, njegova antifungalna aktivnost osobito je bila

izražena protiv *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, mnoga izvješća pokazuju da vrste *Bacillus* luče proteine s antifungalnim djelovanjem kao što je bacin, antifungalni protein izoliran is *B. subtilis* soja B 916 te pokazao inhibitorno djelovanje na rast micelija nekoliko biljni patogenih vrsta gljiva (Liu i sur., 2009.). Nadalje u ovom istraživanju Liu i sur., (2009.) govore kako ovaj patogen inficira i kolonizira korijen presadnica pšenice te oštećuje tkivo domaćina, ali ako je ovo tkivo kolonizirano s *B. subtilis* E1R-j uočava se stvaranje izraženih apozicija i penetracija stanica ovog patogena.

Razne vrste roda *Bacillus* imaju sposobnost proizvodnje raznih antimikrobnih tvari koje pružaju zaštitu te djeluju kao biološki agensi (Varga i sur., 2000.). Takve tvari uključuju subtilizin, bacilizin, mikobacilin, bacilomicin, mikosubtilin, fengicine (Walker i sur., 1970., Besson i sur., 1977., Peypoux i sur., 1976.). Prijavljeno je da ove tvari posjeduju antibakterijsko i antigljivično djelovanje protiv patogenih mikroorganizama. (Romero i sur., 2011).

In vitro istraživanja pokazala su da hitanaza koju proizvodi *B. subtilis* nakon žetve jama uzrokuje razgradnju patogena *F. oxysporum*, ovaj rezultat je također potvrđen u in vivo eksperimentu gdje je uporaba *B. subtilis* inhibirala incidenciju *F. oxysporum* u šupljinama rana gomolja jama za 83 % (Swain i sur., 2008.). Zhao i sur., otkrili su da *B. subtilis* soj SG6 pokazuje snažan antagonizam protiv *F. graminearum* te inhibira sporulaciju u patogenu u ispitivanjima provedenim na pločama s dvostrukom kulturom (Zhao i sur., 2014.).

6. ZAKLJUČAK

Rod *Fusarium* jedna je od najpoznatijih vrsta gljivičnih patogena u tlu, te nanose značajne ekonomske štete u raznim poljoprivrednim proizvodnjama. *F. verticillioides* najčešće nalazimo na biljkama kukuruza i pšenice te uzročnik je bolesti kao što su palež klijanaca, trulež korijena, stabljike i klipa, dok *F. graminearum* glavni uzročnik fuzarioza kod žitarica poput ječma i pšenice te uzročnik truleži klipa i stabljike kod kukuruza. Mjere zaštite od ovog patogena mogu biti uporabe bioloških fungicida i uklanjanje zaražene biljke kako bi se spriječilo širenje. Biološki preparati postaju sve prisutniji i popularniji na tržištu te predstavljaju rješenje za razne probleme u poljoprivrednoj proizvodnji. Biološko suzbijanje patogena vrši se induciranjem obrambenih mehanizama kod biljke, a osnova biljnih preparata razni mikroorganizmi.

7. POPIS LITERATURE

1. Abbas, H. K., Duke, S. O., Tanaka, T. (1993.): Phytotoxicity of Fumonisin and Related Compounds. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 12(3), 225–251.
2. Adeniji, A. A., Aremu, O. S., Babalola, O. O. (2018.): Selecting lipopeptide-producing, *Fusarium*-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5. *MicrobiologyOpen*, 742.
3. Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M. (2014.): Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201.
4. Asam, S., Habler, K., Rychlik, M. (2017.): *Fusarium* Mycotoxins in Food. *Chemical Contaminants and Residues in Food*, 295–336.
5. Ates, E., Mittendorf, K., Stroka, J., Senyuva, H. (2013.): Determination of *Fusarium* mycotoxins in wheat, maize and animal feed using on-line clean-up with high resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(1), 156–165.
6. Bakker, M. G., Brown, D. W., Kelly, A. C., Kim, H.-S., Kurtzman, C. P., McCormick, S. P., Ward, T. J. (2018.): *Fusarium* mycotoxins: a trans-disciplinary overview. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 161–171.
7. Bonkowski, M., Villenave, C., Griffiths, B. (2009.): Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil*, 321(1-2), 213–233.
8. Brierley, J.A. (1985.): Use of microorganisms for mining metals. In: Halvorson HO, Pramer D, Rogul M (eds) *Engineered organisms in the environment: scientific issues*. ASM Press, Washington, 141–146.
9. Brown, M. E. (1974.): Seed and Root Bacterization. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 181–197.
10. Burr, T. J., Schroth, M. N., Suslow, T. (1978.): Increased potato yields by treatment of seed-pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68, 1377–1383.
11. Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., Shen, Q. (2011.): *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 495–506.

12. Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., Karlovsky, P. (2016.): Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, 16(1), 83-83.
13. Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J., Yang, X., Wang, X. (2009.): Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 675–684.
14. Chung, S., Kong, H., Buyer, J. S., Lakshman, D. K., Lydon, J., Kim, S.-D., Roberts, D. P. (2008.): Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 115–123.
15. Conner, R. L., Hwang, S. F., Stevens, R. R. (1996.): *Fusarium* proliferation: a new causal agent of black point in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(4), 419–423.
16. Davison, J. (1988.): Plant beneficial bacteria. *Biotechnology* 6, 282–286.
17. Deng, Q., Wang, R., Sun, D., Sun, L., Wang, Y., Pu, Y., Fang, Z., Xu, D., Liu, Y., Ye, R. (2020.): Complete genome of *Bacillus velezensis* CMT-6 and comparative genome analysis reveals lipopeptide diversity. *Biochemical Genetics*, 58, 1–15.
18. Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., Glick, B. R. (2014.): Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85–125.
19. Eudes F., Comeau A., Rioux S., Collin J. (2000.): Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé Can. *J. Plant Pathol.* 22, 286–292.
20. Foldes, T., Banhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J. (2000.): Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 840–846.
21. Gajęcka, M., Tarasiuk, M., Zielonka, Ł., Dąbrowski, M., Gajęcki, M. (2016.): Risk assessment for changes in the metabolic profile and body weights of pre-pubertal gilts during long-term monotonic exposure to low doses of zearalenone (ZEN). *Research in Veterinary Science*, 109, 169–180.
22. Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., Duplessis, S., Ellis, B. E. (2012.): Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *The Plant Cell*, 24(4), 1327–1351.

23. Härtig, E., Jahn, D. (2012.): Regulation of the Anaerobic Metabolism in *Bacillus subtilis*. *Advances in Bacterial Respiratory Physiology*, 195–216.
24. Hoorman, J.J., Sa, J.C.M., Reeder, R.C. (2011.): *The Biology of Soil Compaction* 9, 583-587.
25. Jurković, D., Čosić, J., Vrandečić, K. (2017.): Pseudogljive i gljive ratarskih kultura. *Poljoprivredni fakultet u Osijeku*, 96-110.
26. Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Hirsch, A. M. (2018.): Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9.
27. Kloepper, J. W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R. M. (1989.): Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 7(2), 39–44.
28. Lavelle, P., Spain, A.V. (2005.): *Soil Ecology: Soil Organisms*, Springer, New Delhi, India, 3.
29. Li, L., Qu, Q., Cao, Z., Guo, Z., Jia, H., Liu, N., Wang, Y., Dong, J., (2019.): The relationship analysis on corn stalk rot and ear rot according to *fusarium* species and fumonisin contamination in kernels. *Toxins*, 11(6), 320.
30. Lin, W., Okon, Y., Hardy, R. W. F. (1983.): Enhanced mineral uptake by *Zea-mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1775–1779.
31. Liu, B., Qiao, H.P., Huang, L.L., Heinrich, B., Han, Q.M., Kang, Z.S., Gong, Y.Y. (2009.): Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biol Control* 49, 277–285.
32. Marin-Menguiano, M., Morenosanchez, I., Barrales, R. R., Fernandezalvarez, A., Ibeas, J. I. (2019.). N-glycosylation of the protein disulfide isomerase Pdi1 ensures full *Ustilago maydis* virulence. *PLOS Pathogens*, 15 (11).
33. Martinez, R.M. (2013.): *Bacillus subtilis*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 246-248.
34. Matic, M., Baličević, R., Novoselović, D., Čosić, J., Vrandečić, K. (2020.): Integrirana zaštita pšenice u suzbijanju fitopatogene gljive *Fusarium graminearum*. *Poljoprivreda*, 26(1), 3–9.
35. Meena, K. K., Sorty, A. M., Bitla, U. M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Minhas, P. S. (2017.): Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies. *Frontiers in Plant Science*, 8.

36. Middeldorp, P. J. M., Briglia, M., Salkinoja-Salonen, M. S. (1990.): Biodegradation of pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenicus*. *Microbial Ecology*, 20(1), 123–139.
37. Milićević, D. R., Škrinjar, M., Baltić, T. (2010.): Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. *Toxins*, 2(4), 572–592.
38. Miljaković, D., Marinković, J., Balešević-Tubić, S. (2020.): The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037.
39. Morton, A. G. (1981.): *History of Botanical Science. An Account of the Development of Botany from Ancient Times to the Present Day*, London and New York.
40. Muller, D.B., Vogel, C., Bai, Y., Vorholt, J.A. (2016.): The plant microbiota: systems-level insights and perspectives 50, 211–234.
41. Munkvold G.P. (2003.): Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur. J. Plant Pathology*. 109, 705–713.
42. Nganje, W. E., Bangsund, D. A., Leistritz, F. L., Wilson, W. W., Tiapo, N. M. (2004.): Regional Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat and Barley. *Review of Agricultural Economics*, 26(3), 332–347.
43. Pasquali, M., Beyer, M., Logrieco, A., Audenaert, K., Balmas, V., Basler, R., Vogelgsang, S. (2016.): A European Database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Trichothecene Genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 7.
44. Pitt, J.I. (2014.): *Encyclopedia of Food Safety, Hazards and diseases*, 2.
45. Ploetz, R. C. (2015.): *Fusarium* Wilt of Banana. *Phytopathology*, 105(12), 1512–1521.
46. Scarpari, M., Bello, C., Pietricola, C., Zaccaria, M., Bertocchi, L., Angelucci, A., Fanelli, C. (2014.): Aflatoxin Control in Maize by *Trametes versicolor*. *Toxins*, 6(12), 3426–3437.
47. Schiøtt, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., Boomsma, J. J. (2010.): Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. *BMC Biology*, 8(1), 156.
48. Schwartz, A. R., Ortiz, I., Maymon, M., Fujishige, N. A., Herbold, C. W., Vijanderan, J. A. (2013.): *Bacillus simplex* alters legume root architecture and nodule morphology when co-inoculated with *Rhizobium*. *Agronomy* 3, 595–620.
49. Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., Lee, I.-J. (2017.): Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus*

- amyloliquefaciens RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *PeerJ*, 5, 3107.
50. Shang, Y., Xiao, G., Zheng, P., Cen, K., Zhan, S., Wang, C. (2016.): Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*. 8, 1374–1387.
 51. Shrivastava, P., Kumar, R. (2015.): Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123–131.
 52. Soyer, J. L., Hamiot, A., Ollivier, B., Balesdent, M., Rouxel, T., Fudal, I. (2015.): The APSES transcription factor *LmStuA* is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant Pathology*, 16, 1000–1005.
 53. Speight, N. (2012.): Mycotoxin-related illness, in *Advancing Medicine with Food and Nutrients*. 2, 821–850.
 54. Strange, R. N., Scott, P. R. (2005.): Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 83–116.
 55. Swain, M. R., Ray, R. C., & Nautiyal, C. S. (2008). Biocontrol Efficacy of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Cow Dung Against Postharvest Yam (*Dioscorea rotundata* L.) Pathogens. *Current Microbiology*, 57(5), 407–411.
 56. Sylvia, D.M., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J., Zuberer, D.A. (2005.): *Principles and Applications of Soil Microbiology*, 2nd edition, New Jersey.
 57. Tan, Z., Lin, B., Zhang, R. (2013.): A Novel Antifungal Protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus*, 2, 543.
 58. Teintze, M., Hossain, M. B., Barnes, C. L., Leong, J., Vanderhelm, D. (1981.): Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant-growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* 20, 6446–6457.
 59. Thrane, U. (1999.): *Encyclopedia of Food Microbiology*, *Fusarium*, 901-906.
 60. Thynne, E., Saur, I. M. L., Simbaqueba, J., Ogilvie, H. A., Gonzalez-Cendales, Y., Mead, O., Solomon, P. S. (2016.): Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides. *Molecular Plant Pathology*, 18(6), 811–824.
 61. Turner, T., Backman P.A. (1991.): Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*, 75, 347-353.

62. Velivelli, S. S., Kromann, P., Lojan, P., Rojas, M., Franco, J., Suarez, J. P. (2015): Identification of mVOCs from Andean rhizobacteria and field evaluation of bacterial and mycorrhizal inoculants on growth of potato in its center of origin. *Microbial Ecology*, 69, 652–667.
63. Venturini, G., Assante, G., Vercesi, A., (2011.): *Fusarium verticillioides* contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. *Phytopathologia mediterranea*, 50, 110-120.
64. Vianello, A., Macri, F. (1978.). Inhibition of plant cell membrane transport phenomena induced by zearalenone (F-2) *Planta* 143 (1), 51-57.
65. Voigt, C.A., Von Scheidt, B., Gacser, A., Kassner, H., Lieberei, R., Schäfer, W., Salomon, S. (2007.). Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression, *Plant pathology*, 117, 1-12.
66. Wild, C. P., Gong, Y. Y. (2010.). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31, 71–82.
67. Wu, L., Wu, H.J., Qiao, J., Gao, X. and Borriss, R. (2015.): Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of *Bacillus* Based Bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1395.
68. Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., Williams, M. A. (2015.): Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in plant science*, 6.
69. Yin, Z., Ke, X., Kang, Z., Huang, L. (2016.): Apple resistance responses against *Valsa mali* revealed by transcriptomics analyses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 93, 85–92.
70. Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S. (2016.): Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 182–207.
71. Zeriouh, H., Romero, D., Garcia-Gutierrez, L., Cazorla, F.M., De Vicente, A., Perez-Garcia, A. (2011.): The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 24, 1540–1552.
72. Zhang, C.X., Zhao, X., Han, F., Yang, M.F., Chen, H., Chida, T. and Shen, S.H. (2009.): Comparative Proteome Analysis of Two Antagonist *Bacillus subtilis* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 351-357.

73. Zhang, J. X., Xue, A. G., & Tambong, J. T. (2009.): Evaluation of Seed and Soil Treatments with Novel *Bacillus subtilis* Strains for Control of Soybean Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*, 93(12), 1317–1323.
74. Zhang, Y., Lubberstedt, T., Xu, M. L. (2013.): The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40, 23–35.
75. Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., ... Liu, Y. (2014). Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 9(3), e92486.

8. SAŽETAK

Tlo je složen ekosustav u kojemu se nalaze razni mikroorganizmi koji imaju niz interakcija s biljkama, a većina provedenih istraživanja usmjerena je na mikroorganizme promotore rasta biljaka koji posjeduju različite mehanizme kojima preveniraju rast patogenih mikroorganizama. Razne korisne bakterije se koriste već dugi niz godina za poboljšanje rasta i prinosa i biokontroli poljoprivrednih kultura. Cilj ovog istraživanja bio je utvrđivanje potencijalnog antifungalnog djelovanja autohtonog soja *Bacillus subtilis* u odnosu na fitopatogene predstavnike roda *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides*. Rezultati su utvrdili inhibiciju micelija međutim nedovoljnu za utvrđivanje statistički značajne razlike. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi identificirala učinkovitije sojeve s antifungalnim djelovanjem.

Ključne riječi: bakterije promotori rasta biljaka, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, fuzarijske bolesti, biokontrola

9. SUMMARY

The soil is a complex ecosystem in which there are various microorganisms that have a number of interactions with plants, and most of the research conducted is focused on plant growth promoter microorganisms that possess different mechanisms that prevent the growth of pathogenic microorganisms. Various beneficial bacteria have been used for many years to improve growth and yield and biocontrol agricultural crops. The aim of this research was to determine the potential antifungal activity of the native soybean *Bacillus subtilis* in relation to the phytopathogenic representatives of the genus *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. The results determined the inhibition of the mycelium, but they are not sufficient to establish a statistically significant difference. Further research is needed to identify more effective strains with antifungal activity.

Keywords: plant growth promoting bacteria, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium* diseases, biocontrol

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Statistički prikaz razlike rasta <i>Fusarium graminearum</i> 110250 i kontrole.....	14
Tablica 2. Statistički prikaz razlike rasta <i>Fusarium graminearum</i> R5796 i kontrole.....	16
Tablica 3. Statistički prikaz razlike rasta <i>Fusarium verticilloides</i> M7075 i kontrole.....	17
Tablica 4. Statistički prikaz razlike rasta <i>Fusarium verticilloides</i> M1325 i kontrole.....	18

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Mikroskopski prikaz stanica <i>Bacillus subtilis</i>	3
Slika 2. <i>Fusarium graminearum</i> na kukuruzu.....	5
Slika 3. Kemijska struktura poznatih mikotoksin.....	8
Slika 4. Prilagođavanje pH vrijednosti hranjive podloge.....	9
Slika 5. Nacijepeljivanje <i>B.subtilis</i>	10
Slika 6. Nacijepeljivanje <i>Fusarium spp</i>	11
Slika 7. <i>B.Subtilis</i> zasijan nasuprot <i>Fusarim spp</i>	12
Slika 8. <i>Fusarium Graminearum</i> i <i>Bacillus subtilis</i> 7. dan od postavljanja pokusa.....	14
Slika 9. <i>Fusarium Verticilloides M1325</i> i <i>Bacillus subtilis</i> 3. dan od postaljanja pokusa.....	17

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Rast <i>Fusarium graminearum</i> 110250 uz <i>Bacillus subtilis</i>	14
Grafikon 2. Rast <i>Fusarium graminearum</i> R5796 uz <i>Bacillus subtilis</i>	15
Grafikon 3. Rast <i>Fusarium verticilloides</i> M7075 uz <i>Bacillus subtilis</i>	16
Grafikon 4. Rast <i>Fusarium verticilloides</i> M1325 uz <i>Bacillus subtilis</i>	17

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Diplomski rad

Antifungalni potencijal *Bacillus subtilis* u kontroli rasta *Fusarium* spp.

Ante Kalaica

Sažetak: Tlo je složen ekosustav u kojemu se nalaze razni mikroorganizmi koji imaju niz interakcija s biljkama, a većina provedenih istraživanja usmjerena je na mikroorganizme promotore rasta biljaka koji posjeduju različite mehanizme kojima sprječavaju rast patogenih mikroorganizama. Razne korisne bakterije se koriste već dugi niz godina za poboljšanje rasta i prinosa i biokontroli poljoprivrednih kultura. Cilj ovog istraživanja bio je utvrđivanje potencijalnog antifungalnog djelovanja autohtonog soja *Bacillus subtilis* u odnosu na fitopatogene predstavnike roda *Fusarium* *graminearum* i *Fusarium* *verticillioides*. Rezultati su utvrdili inhibiciju micelija međutim nedovoljnu za utvrđivanje statistički značajne razlike. Potrebna su daljnja istraživanja koja bi identificirala učinkovitije sojeve s antifungalnim djelovanjem.

Ključne riječi: bakterije promotori rasta biljaka, *Fusarium* *graminearum*, *Fusarium* *verticillioides*, fuzarijske bolesti, biokontrola

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof. Dr. Sc. Gabriella Kanižai Šarić

Broj stranica: 31

Broj grafikona: 4

Broj slika: 9

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 73

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: bakterije promotori rasta biljaka, *Fusarium* *graminearum*, *Fusarium* *verticillioides*, fuzarijske bolesti, biokontrola

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Organic agriculture**

Graduate thesis

Antifungal potential of *Bacillus subtilis* in growth control of *Fusarium* spp.

Ante Kalaica

Abstract: The soil is a complex ecosystem in which there are various microorganisms that have a number of interactions with plants, and most of the research conducted is focused on plant growth promoter microorganisms that possess different mechanisms that prevent the growth of pathogenic microorganisms. Various beneficial bacteria have been used for many years to improve growth and yield and biocontrol agricultural crops. The aim of this research was to determine the potential antifungal activity of the native soybean *Bacillus subtilis* in relation to the phytopathogenic representatives of the genus *Fusarium* *graminearum* and *Fusarium verticillioides*. The results determined the inhibition of the mycelium, but they are not sufficient to establish a statistically significant difference. Further research is needed to identify more effective strains with antifungal activity.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek

Mentor: Gabriella Kanižai Šarić, Ph.D., full.prof.

Number of pages: 31

Number of figures: 4

Number of pictures: 9

Number of tables: 4

Number of references: 73

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Keywords: plant growth promoting bacteria, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium* diseases, biocontrol

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Jasenka Ćosić, Ph.D., full.prof., president
2. Gabriella Kanižai Šarić, Ph.D., full.prof., mentor
3. Irena Rapčan, Ph.D., full.prof., member

Thesis deposited at: Library of Faculty of AgrobiotechnicalSciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek, Vladimira Preloga 1.