

Interakcija izolata *Trichoderma atroviride* s *Fusarium* sp.

Ćirić, Kosana

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:152171>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Kosana Ćirić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Interakcija izolata *Trichoderma atroviride* s *Fusarium* sp.

Završni rad

Osijek, 2023. godine

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Kosana Ćirić

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Bilinogojstvo

Interakcija izolata *Trichoderma atroviride* s *Fusarium* sp.

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, mentorica
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, član
3. Tamara Siber, mag. ing. agr., član

Osijek, 2023. godine

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Biološka kontrola patogena.....	2
1.2. Antagonizam <i>T. atroviride</i> s uzročnicima bolesti.....	3
1.3. Rod <i>Fusarium</i>	3
1.4. Fuzarijske bolesti pšenice	4
2. MATERIJALI I METODE	5
2.1. Priprema suspenzije <i>T. atroviride</i>	5
2.2. Priprema suspenzije <i>F. graminearum</i>	7
2.3. Priprema supstrata.....	8
2.4. Tretiranje zrna	8
2.5. Postavljanje pokusa.....	9
2.6. Mjerenja pokusa.....	11
3. REZULTATI I RASPRAVA	13
4. ZAKLJUČAK	21
5. POPIS LITERATURE	22

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Završni rad

Interakcija izolata *Trichoderma atroviride* s *Fusarium* sp.

Sažetak: Cilj istraživanja ovog završnog rada je bio utvrditi utjecaj izolata *T. atroviride* (Tav1) na supresiju pojave fuzarijske paleži klijanaca pšenice nakon umjetne infekcije s *F. graminearum* (Fg1). Pokus je postavljen u 4 tretmana: dezinficirana zrna pšenice posijana u sterilni pijesak (kontrola), zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u sterilni pijesak, dezinficirana zrna pšenice posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 te zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u pijesak kontaminiran s Fg1. Nakon klijanja izvršena su mjerenja mase (u svježem i suhom stanju) i dužine klijanaca pšenice. Izolat Tav1 nije pokazao statistički značajna poboljšanja na klijancima pšenice. Pretpostavka je da je izolat koji je korišten za suzbijanje *F. graminearum* manje efikasan u odnosu na druge izolate *T. atroviride*. Daljnja istraživanja su neophodna kako bi se identificirali najefikasniji izolati, optimizirali uvjeti primjene i identificirale situacije u kojima biološka kontrola može pružiti najbolje rezultate.

Ključne riječi: *T. atroviride*, antagonizam, *F. graminearum*, pšenica

23 stranice, 1 tablica, 10 slika, 7 grafikona, 14 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

BASIC DOCUMENTATIO CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production
Kosana Čirić

BscThesis

Interaction of *Trichoderma atroviride* isolates with *Fusarium* sp.

Summary: The aim of this final study was to determine the influence of *T. atroviride* isolate (Tav1) on the suppression of the occurrence of fusarium arson of wheat seedlings after artificial infection with *F. graminearum* (Fg1). The experiment was set in 4 treatments: disinfected wheat grains sown in sterile sand (control), wheat grains inoculated with Tav1 sown in sterile sand, disinfected wheat grains sown in sand contaminated with Fg1 and wheat grains injected with Tav1 sown in sand contaminated with Fg1. Germination measurements were mass (in fresh and dry state) and length of wheat seedlings. Tav1 isolate showed no statistically significant improvements in wheat seedlings. The assumption is that the isolate used to combat *F. graminearum* is less effective than other *T. atroviride* isolates. Further research is necessary to identify the most effective isolates, optimize application conditions and identify situations in which biological control can provide the best results.

Keywords: *T. atroviride*, antagonism, *F. graminearum*, wheat

23 pages, 1 table, 10 figures, 7 charts, 14 references

Bsc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek.

1. UVOD

Gljive roda *Trichoderma* su saprofitske gljive. Poznato je da *Trichoderma* parazitira druge gljive i na taj način djeluje kao antifungalni biokontrolni čimbenik (Singh i sur., 2013.).

Trichoderma atroviride je saprobna gljiva koja se nalazi u prirodi u tlu i na biljnim ostacima. Ova gljiva pripada rodu *Trichoderma*, koji je poznat po svojim sposobnostima da suzbija patogene biljaka i povećava rast i razvoj biljaka. *T. atroviride* ima neke specifične osobine koje ju čine korisnom u poljoprivrednom kontekstu.

T. atroviride proizvodi veliku količinu enzima koji razgrađuju organsku tvar, što omogućuje ovoj gljivici da se hrani na biljnim ostacima i drugim organskim materijalima. Proizvodi nekoliko ključnih enzima uključujući kitinaze, beta-glukanaze i proteaze. Ovi enzimi su važni za razgradnju stanične stijenke patogena, što olakšava biokontrolu biljnih bolesti (Harman i Kubicek, 1998.).

Gupta i sur. (2014.) opisuju kako *Trichoderma* može proizvesti različite enzime poput celulaze, hemicelulaze i proteaze, koji su važni za razgradnju biljnih ostataka u tlu.

T. atroviride je sposobna za borbu protiv različitih patogena biljaka, kao što su gljive rodova *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* i druge gljive koje uzrokuju trulež korijena i druge oblike bolesti na biljkama. Ova gljiva proizvodi antibiotske spojeve kao što su glukano-hidrolaze i proteaze koji djeluju fungicidno ili fungistatično.

Može pomoći u povećanju rasta i razvoja biljaka na nekoliko načina. Proizvodi fitohormone koji potiču rast biljaka, a također može potaknuti rast korijena i poboljšati apsorpciju hranjiva iz tla (Hermosa i sur., 2013.).

Ima sposobnost da se prilagodi različitim uvjetima u tlu, kao što su niska temperatura, visoka pH vrijednost i drugi nepovoljni uvjeti. Ova tolerancija na stres omogućuje gljivi da preživi i razvija se u različitim uvjetima, što je korisno u poljoprivrednom kontekstu (Vinale i sur., 2012.).

Cilj istraživanja ovog završnog rada jeste utvrditi utjecaj izolata *T. atroviride* (Tav1) na supresiju pojave fuzarijske paleži klijanaca pšenice nakon umjetne infekcije s *F. graminearum*.

1.1. Biološka kontrola patogena

U suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji biološka kontrola postaje sve popularnija, pogotovo u ekološkoj i održivoj poljoprivredi, kojoj se teži. Biološka kontrola smatra se sigurnijom i ekološki prihvatljivom metodom za suzbijanje biljnih bolesti u odnosu na kemijske mjere zaštite.

Trichoderma gljivice mogu se primijeniti na različite načine u poljoprivredi. Neki od najčešćih načina primjene su (Petrović i sur., 2023.):

1. Biofertilizator: Povećava sposobnost biljaka da apsorbiraju hranjive tvari iz tla. Uz pomoć enzima, ove gljivice razgrađuju organski materijal u tlu i oslobađaju hranjive tvari koje biljke mogu apsorbirati.
2. Biostimulator rasta biljaka: Stimuliraju rast biljaka i povećavaju njihovu otpornost na stresne uvjete.
3. Biofungicid: Za suzbijanje biljnih patogena poput gljiva iz rodova *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* i drugih gljiva koje uzrokuju trulež korijena i druge bolesti. Gljivice proizvode antibiotske spojeve koji mogu ubiti patogene ili spriječiti njihov rast i širenje.

Trichoderma se može primijeniti na tlo prije sadnje, kroz sjeme ili rasadu, kroz navodnjavanje, ili kao folijarni tretman. Također, mogu se primijeniti u kombinaciji s drugim biološkim sredstvima za zaštitu bilja kako bi se pojačao učinak. Važno je naglasiti da je važno koristiti samo certificirane proizvode i pratiti upute za primjenu kako bi se osigurala učinkovitost i sigurnost primjene.

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

1.2. Antagonizam *T. atroviride* s uzročnicima bolesti

Antagonizam gljive *T. atroviride* s uzročnicima bolesti temelji se na kompeticiji, parazitizmu i antibiozi.

Konkurencija ili kompeticija jedan od načina na koji *T. atroviride* djeluje na patogene. *T. atroviride* ima sposobnost brzog rasta i razvoja, što mu omogućuje da brzo naseli okoliš i ostavi malo prostora za razvoj patogenih organizama (Harman i sur., 2004.).

Ova gljiva ima sposobnost parazitiranja na drugim gljivama i patogenima biljaka. Kada se susreće s patogenim gljivama, napada i upija hranjive tvari koje su im potrebne za rast i razvoj, što može dovesti do smrti patogena. Ovaj proces naziva se mikoparazitizam (Harman i sur., 2004.).

Antibioza je također jedan od načina na koji *T. atroviride* djeluje na patogene. Gljiva proizvodi različite vrste antibiotika i drugih sekundarnih metabolita koji mogu suzbiti rast i razvoj patogena biljaka. Primjerice, *T. atroviride* proizvodi glukano-hidrolaze koje razgrađuju stanične stijenke gljivica poput *Fusarium* spp., a također proizvodi i proteaze koje uništavaju proteine patogena. Na taj način, *T. atroviride* sprječava širenje patogena i pomaže u očuvanju zdravlja biljaka (Harman i sur., 2004.).

1.3. Rod *Fusarium*

Prema Ćosić i sur. (2006.), rod *Fusarium* sadrži više od 70 vrsta gljivica koje su uzročnici raznih bolesti biljaka. Bolesti koje uzrokuju gljive roda *Fusarium* se manifestiraju kao truleži korijena, plijesan, sušenje stabljika, nekroze i drugi simptomi. Ove gljivice su široko rasprostranjene u tlu i na biljnim ostacima, što ih u poljoprivrednoj proizvodnji čini teško kontroliranim patogenima.

1.4. Fuzarijske bolesti pšenice

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

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

Palež klasova je ozbiljna bolest pšenice koja se javlja kao posljedica infekcije gljivama iz roda *Fusarium*, najčešće kod nas je uzrokuje *F. graminearum*. Bolest se može pojaviti tijekom vegetacijskog razdoblja, ali najčešće se očituje tijekom zriobe. Karakterizira se sušenjem klasića pšenice, a time i gubitkom prinosa (Slika 1.). Uzročnici ove bolesti mogu proizvesti toksine koji su štetni za ljude i životinje, što može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema ako se kontaminirana hrana konzumira. Stoga je važno poduzimati mjere za suzbijanje ove bolesti, uključujući primjenu agrotehničkih mjera i fungicida s čim se smanjuje rizik od infekcije (Ćosić i sur., 2006.).



Slika 1. Fuzarijska palež klasa na klasu pšenice (Izvor: <https://www.agroklub.com>)

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema suspenzije *T. atroviride*

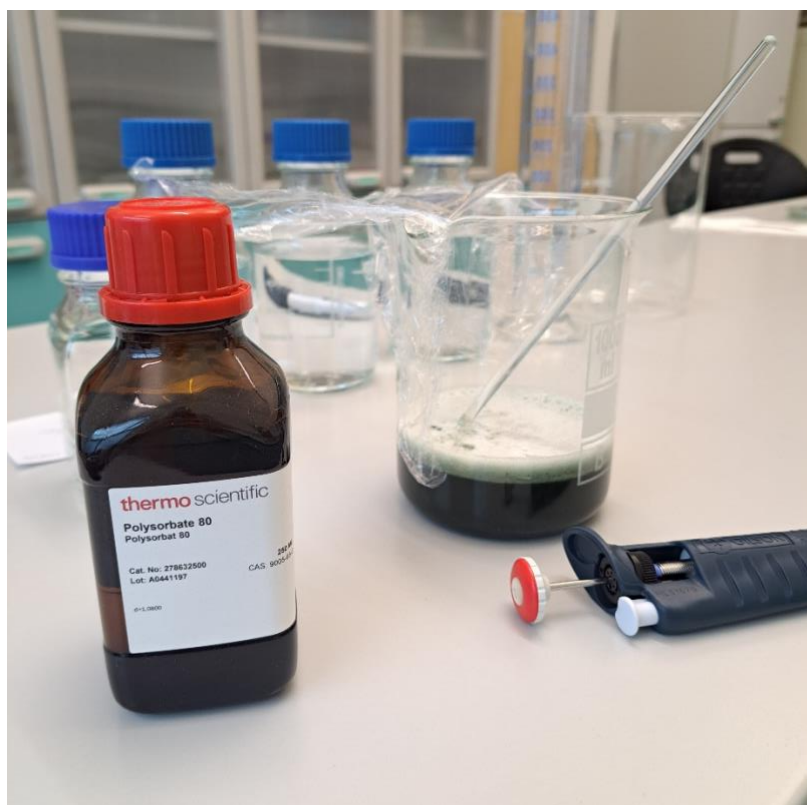
Izolat gljive *T. atroviride* (Tav1) razmnožen je nacjepljivanjem na hranjivu podlogu (krumpirov dekstrozni agar, KDA). Nacjepljivanje je provedeno u sterilnim uvjetima u laminaru (Slika 2.). Inokulacija je provedena micelijskim diskom iz kolonije čiste kulture.

Nakon inokulacije, izolati Tav1 u Petrijevim zdjelicama smješteni su u komoru u kontrolirane uvjete za optimalni razvoj gljive, temperatura 22°C i vlažnost zraka 70%.



Slika 2. Nacjepljivanje gljive *T. atroviride* na hranjivu podlogu (Izvor: Autor)

Nakon dva tjedna, razvijeni micelij na površini hranjive podloge prenijet je u čašu sa sterilnom vodom. U suspenziju vode i spora dodan je Polysorbat 80 kako spore u suspenziji ne bi bile slijepljene (Slika 3.).



Slika 3. Suspenzija spora (Izvor: Autor)

Kako bi se odredila brojnost i koncentracija spora u suspenziji Tav1, spore su razrijeđene destiliranom vodom u omjeru 1 : 500, čiji je faktor razrjeđenja 0,002. Na 499 ml destilirane vode, dodano je 1 ml suspenzije.

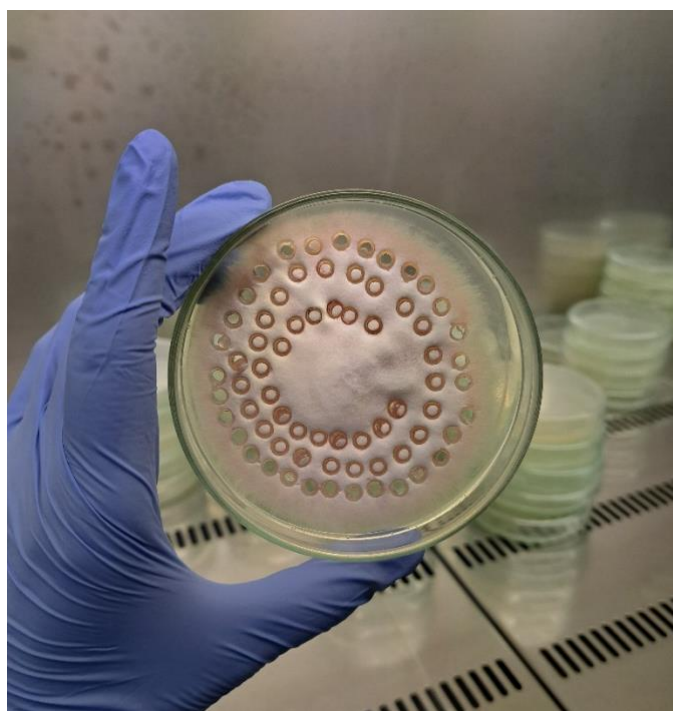
Za brojanje spora korištena je Neubauerove komora i svjetlosni mikroskop na povećanju 20x15. Primjena Neubauerove komore je široko prihvaćena i priznata metoda za brojanje različitih vrsta čestica, uključujući spore. Tijekom brojanja pomoću Neubauerove komore, nepisano pravilo kaže: spore koje dodiruju gornju i lijevu granicu velikog kvadrata treba brojati, a spore koje dodiruju donju i desnu granicu kvadrata ne treba brojati. Veliki kvadrat čini 16 manjih kvadrata.

U dva brojanja prosjek spora u suspenziji bio je 132,5, te se u 7,59 ml destilirane vode doda 2,41 ml suspenzije. Na taj način dobivena je koncentracija spora 10^8 izolata Tav1 kojim su dalje u pokusu tretirana zrna pšenice.

2.2. Priprema suspenzije *F. graminearum*

Izolat gljive *F. graminearum* (Fg1) razmnožen je nacjepljivanjem na hranjivu podlogu (krumpirov dekstrozni agar, KDA). Nacjepljivanje je vršeno u sterilnim uvjetima u laminaru. Inokulacija je provedena micelijskim diskom iz kolonije čiste kulture (Slika 4.).

Nakon inokulacije, izolati Fg1 u Petrijevim zdjelicama smješteni su u komoru u kontrolirane uvjete za optimalni razvoj gljive, temperatura 22°C i vlažnost zraka 70%.



Slika 4. Nacjepljivanje gljive *F. graminearum* na hranjivu podlogu (Izvor: Autor)

Nakon dva tjedna, razvijeni micelij izolata Fg1 na površini hranjive podloge prenijet je u čašu sa sterilnom vodom. Na taj način dobivena je suspenzija vode i spora. Ovom suspenzijom je kontaminiran supstrat (sterilni pijesak).

2.3. Priprema supstrata

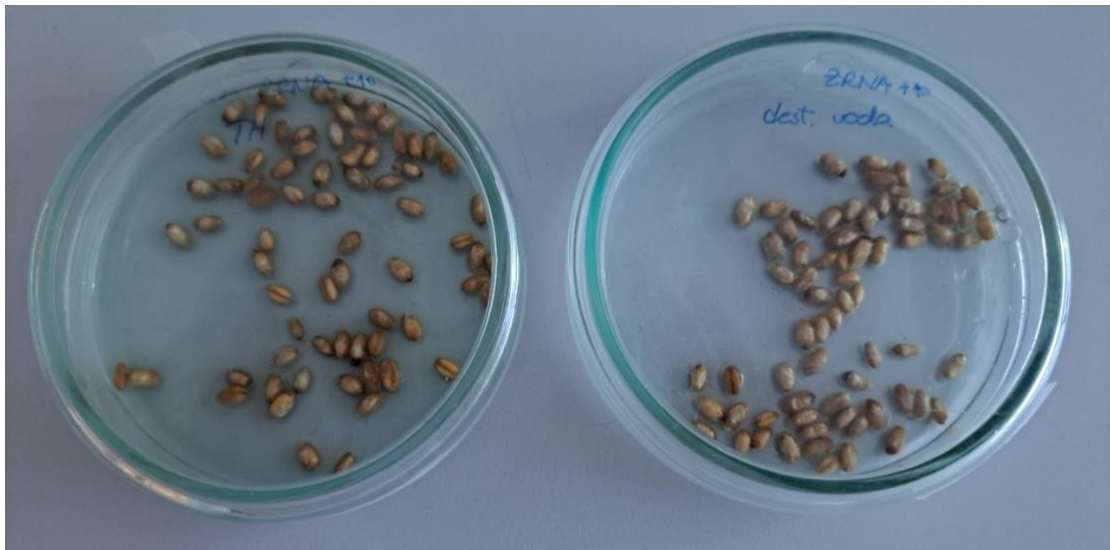
Posudice su napunjene sterilnim pijeskom (12 posudica – 4 tretmana \times 3 ponavljanja).

Sterilni pijesak navlažen je sterilnom vodom. Zatim su obilježeni tretmani i ponavljanja. Kontaminirano je 6 posudica sa supstratom, kontaminacija je izvršena sa suspenzijom Fg1. Na kraju su posudice pokrivene aluminijskom folijom zbog zadržavanje vlage, posudice će biti pokrivene sve dok klijanci ne krenu izbijati.

2.4. Tretiranje zrna

Na 2,41 mL suspenzije Tav1 dodano je 7,59 ml sterilne vode. Sa tih 10 ml otopine Tav1 natopljeno je 90 zrna pšenice u Petrijevoj zdjelici. Drugih 90 dezinficiranih zrna natopljeno je s 10 ml sterilne vode.

Zrna pšenice su se natapala 4 sata u otopinama (Slika 5.).



Slika 5. Natapanje zrna pšenice (Izvor: Autor)

2.5. Postavljanje pokusa

Pokus je postavljan u 4 tretmana u 3 ponavljanja po 10 zrna pšenice:

1. Dezinficirana zrna pšenice posijana u sterilni pijesak, kontrola – K
2. Zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u sterilni pijesak – Th
3. Dezinficirana zrna pšenice posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 – SK
4. Zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 – FgTh

Sjeme je sijano u 4 tretmana po 3 ponavljanja. U svaku posudu posijano je po 15 zrna pšenice (Slika 6.).



Slika 6. Postavljanje pokusa u posudice (Izvor: Autor)

Postavljen pokus je bio pod folijom 48 sati, do pojave prvih klijanaca.

Nakon pojave prvih klijanaca, posudice u kojima je postavljen pokus prebačen je u klima komoru na temperaturu 22 °C i svjetlosnom režimu 12 sati dan/12 sati noć te 70% relativne vlage zraka (Slika 7.). Klima komora za stvaranje uvjeta za klijanje biljaka je posebno dizajnirani prostor koji omogućuje kontrolu temperature, vlažnosti zraka, svjetlosti i drugih parametara kako bi se stvorili optimalni uvjeti za uspješno klijanje sjemena biljaka. Kombinacija kontroliranih uvjeta u klima komori za klijanje biljaka omogućuje precizno prilagođavanje okoliša.

Pokus je redovito zalijevan s destiliranom vodom prema potrebi.



Slika 7. Posudice u klima komori (Izvor: Autor)

Nakon 10 dana od sijanja, klijanci su izvađeni iz posudica te su podvrgnuta mjerenjima potrebnim za dobivanje rezultata pokusa.

2.6. Mjerenja pokusa

Nakon što su klijanci izvađeni iz posudica, oprani su u vodi kako bi se odstranio višak pijeska s korijena. Nakon ispiranja, klijanci pšenice su izbrojani kako bismo odredili klijavost. Zatim su poslikani po tretmanima i broju ponavljanja kako bi se pomoću programa mogla odrediti duljina korijena i biljke pšenice (Slika 8.). Rezultati su statistički obrađeni uz pomoć SAS Software 9.1.4. (SAS Institute Inc., 2003.). Statistička obrada podataka je provedena analizom varijance uz korištenje Duncan testa.



Slika 8. Klijanci pšenice – Tav1 tretirano zrno i Fg1 kontaminiran pijesak (Izvor: Autor)

Određen je stupanj zaraze i nekroze. Na temelju broja bolesnih klijanaca i ocjene svakog klijanca izračunat je indeks bolesti po McKinney (1923.). Intenzitet zaraze ocjenjen je prema skali od 0 do 5 (0 = zdrav klijanac; 5 = visok stupanj zaraze, nema klice) (Slika 9.).



Slika 9. Zdrav i zaražen klijanac pšenice (Izvor: Autor)

Izvršeno je vaganje svježe mase korijena i biljke pomoću analitičke vage, na način da je vagan posebno korijen, a posebno biljka svakog ponavljanja tretmana. Nakon mjerenja svježe mase, određena je i masa suhog korijena i biljke klijanca pšenice prije čega je biljna masa podvrgnuta procesu liofilizacije.

Korišten je proces liofilizacije za sušenje klijanaca pšenice kako bi se uklonila vlaga iz njihovih tkiva i omogućila bolja konzervacija i analiza (Slika 10.).

Svježi klijanci pšenice se smrzavaju na vrlo niskim temperaturama kako bi se očuvala njihova struktura i spriječila oksidacija ili razgradnja. Smrznuti klijanci se stave u vakuumsku komoru za liofilizaciju. U ovom koraku, primjenjuje se niska temperatura i niski tlak kako bi vlaga izravno prešla iz ledenog stanja u plinovito stanje, preskačući fazu tekućine. Ovaj proces sublimacije uklanja vodu iz klijanaca, ostavljajući suhu masu.



Slika 10. Korijen i biljke pšenice u liofilizatoru (Izvor: Autor)

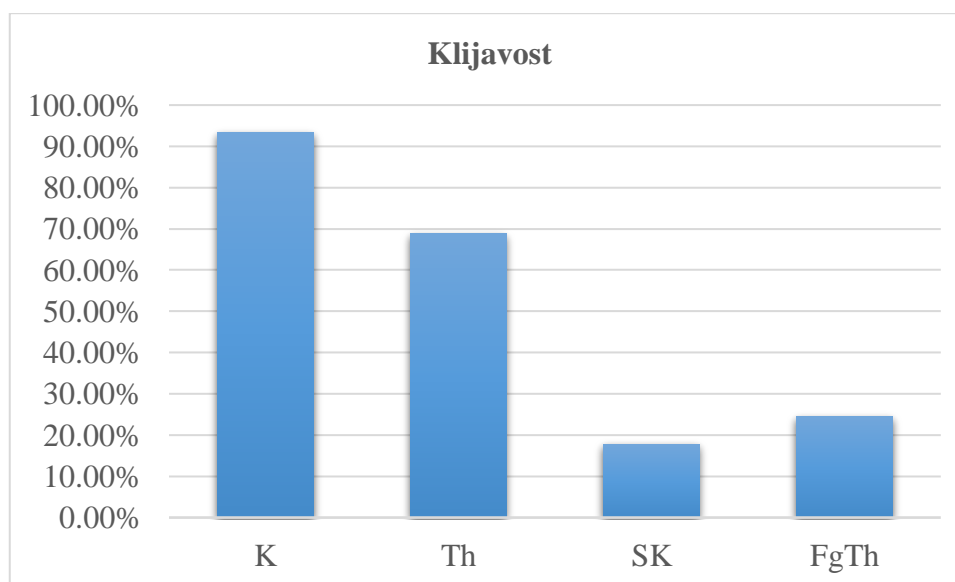
3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio preliminarno istražiti utjecaj izolata *T. atroviride* (Tav1) na razvoj paleži klijanaca pšenice tijekom umjetne infekcije s *F. graminearum* (Fg1). Naime, u istraživanju o utjecaju ovog izolata provedenom na maslini, utvrđeno je poboljšanje kvalitativnih svojstava ulja nakon primjene izolata Tav1 (neobjavljeni rezultati). Stoga smo željeli ispitati kakav je utjecaj ovog izolata na klijance pšenice i eventualni pozitivni utjecaj u smanjenju zaraze *F. graminearum*.

Istraživanje je uključivalo 4 tretmana:

1. Dezinficirana zrna pšenice posijana u sterilni pijesak, kontrola – K
2. Zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u sterilni pijesak – Th
3. Dezinficirana zrna pšenice posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 – SK
4. Zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 – FgTh

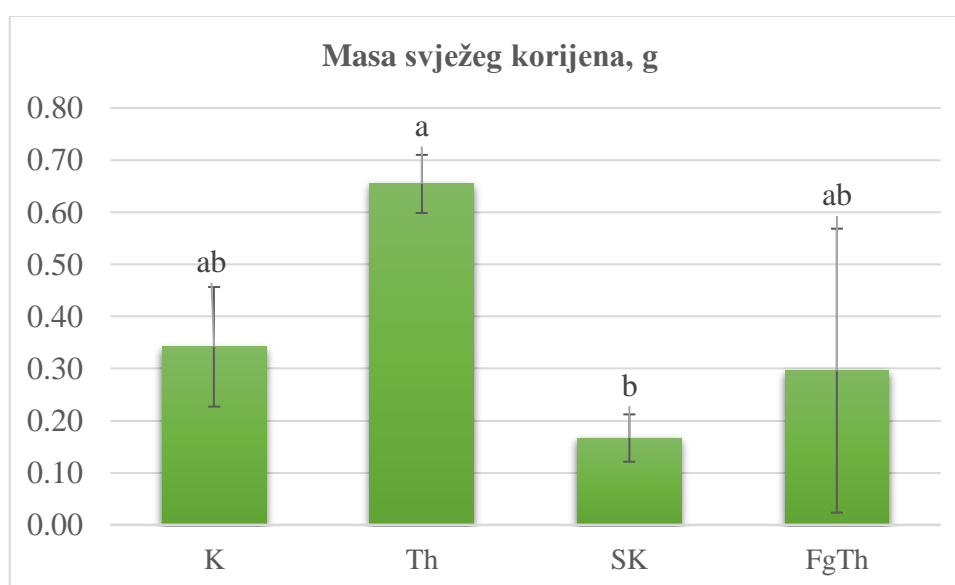
U Grafikonu 1. prikazan je utjecaj izolata *T. atroviride* na klijavost sjemena. Najveća klijavost od 93,33% utvrđena je u kontrolnoj varijanti (K), dok je u tretmanu sa zaraženim zrnom (SK) utvrđena najmanja klijavost od 17,78%.



Grafikon 1. Utjecaj izolata *T. atroviride* na klijavost sjemena

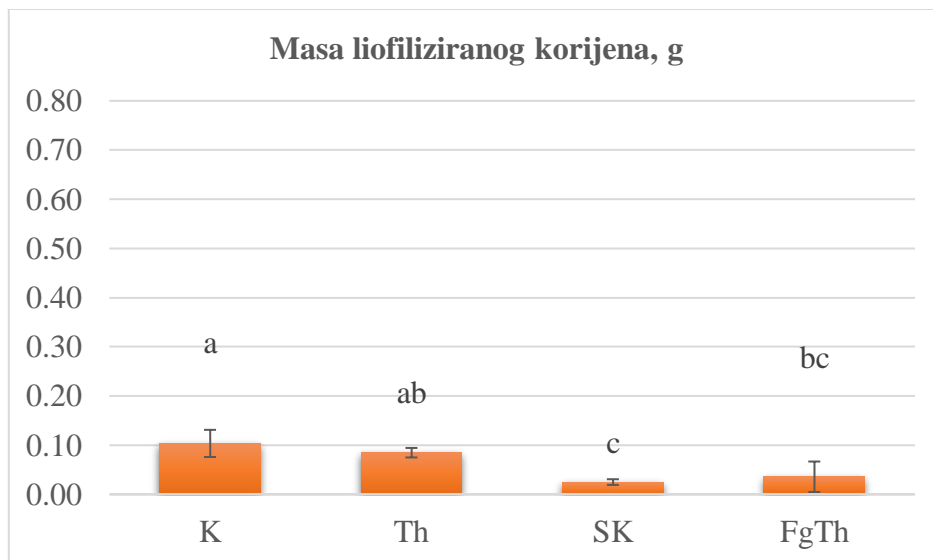
U Grafikonu 2. prikazan je utjecaj izolata *T. atroviride* na masu svježeg korijena. Statistički značajno veće razlike su utvrđene u tretmanu s *T. atroviride* gdje je masa svježeg korijena bila najveća i iznosila je 0,654 g. Najmanja masa korijena utvrđena je u tretmanu SK gdje je supstrat kontaminiran s Fg1, ali između njega, kontrolne varijante i FgTh (zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u pijesak kontaminiran s Fg1) također nije bilo statistički značajnih razlika. Iako je najveća masa korijena utvrđena u tretmanu s *T. atroviride* (Th), između tog tretmana, kontrole (K) i FgTh također nema statistički značajnih razlika.

Stoga možemo zaključiti kako izolat *T. atroviride* nema statistički značajan utjecaj na masu svježeg korijena klijanaca pšenice.



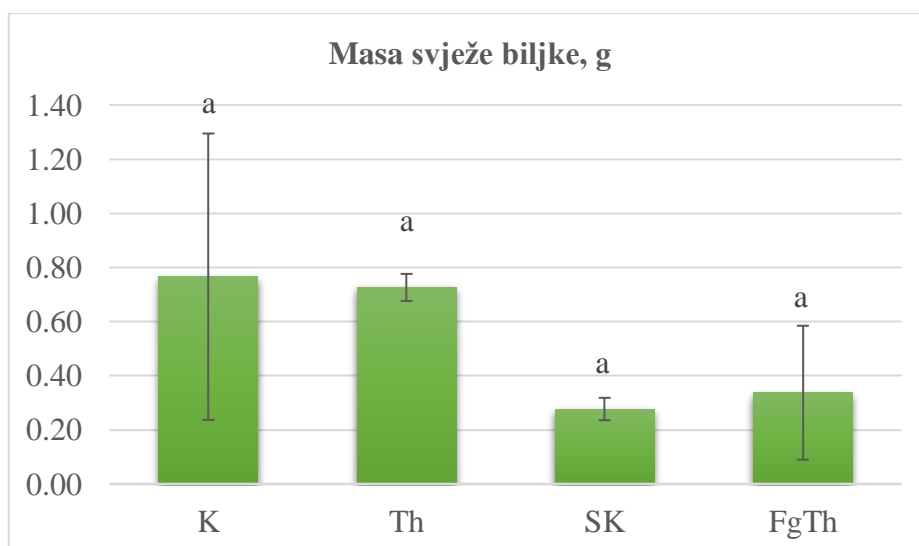
Grafikon 2. Utjecaj izolata *T. atroviride* na masu svježeg korijena (a, b, c, d – različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Duncanovom testu višestrukih raspona na razini $P \leq 0,95$)

Rezultati o utjecaju izolata *T. atroviride* na masu liofiliziranog korijena prikazani su u Grafikonu 3. Statistički značajne razlike su utvrđene između kontrole (K) i tretmana u kojem su zrna pšenice posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 (SK) i zrna pšenice inokulirana s Tav1 posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 (FgTh).



Grafikon 3. Utjecaj izolata *T. atroviride* na masu liofiliziranog korijena (a, b, c, d – različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Duncanovom testu višestrukih raspona na razini $P \leq 0,95$)

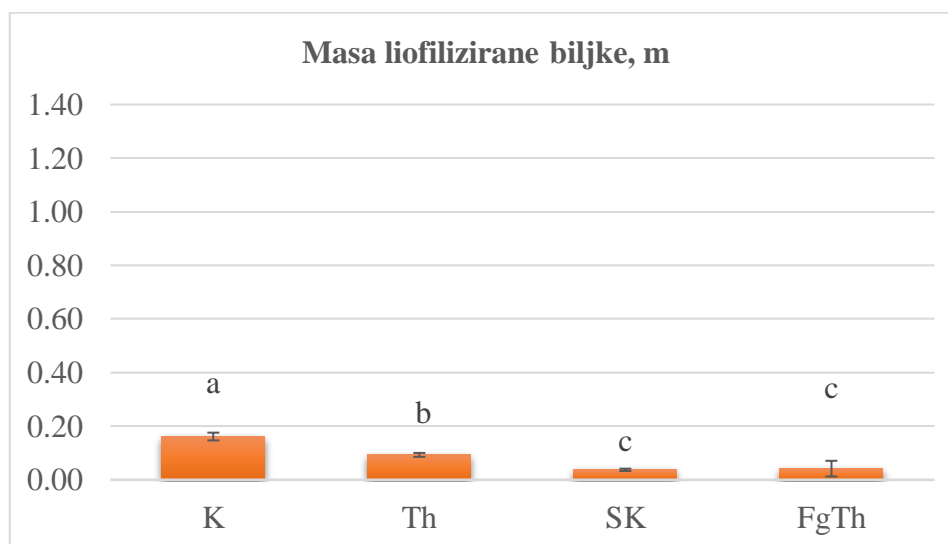
Za masu svježe biljke je utvrđeno da između tretmana nema statistički značajnih razlika (Grafikon 4.).



Grafikon 4. Utjecaj izolata *T. atroviride* na masu svježe biljke (a, b, c, d – različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Duncanovom testu višestrukih raspona na razini $P \leq 0,95$)

Iz prikazanih vrijednosti u Grafikonu 5. možemo vidjeti utjecaj *T. atroviride* na masu liofilizirane biljke. Između kontrole (K), tretmana u kojem su zrna inokulirana s Tav1 (Th) i tretmana s dezinficiranim zrnom u kontaminiranom pijeskom (SK) postoje statistički značajne razlike u masi. Najveću masu liofilizirane biljke ima kontrola (K) čija masa iznosi 0,162 g, dok najmanju masu liofilizirane biljke ima tretman s dezinficiranim zrnom u pijesku kontaminiranim s *F. graminearum* (SK). Statistički značajne razlike nema između SK i tretmana čija su zrna pšenice inokulirana s Tav1 i posijana u pijesak kontaminiran s Fg1 (FgTh) jer su mase liofilizirane biljke približne vrijednosti.

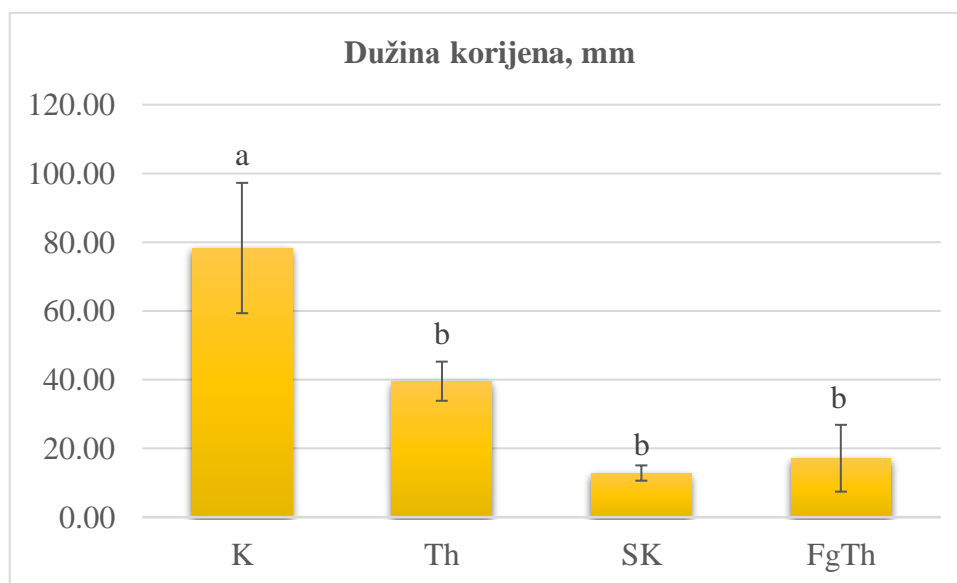
U ovom grafikonu primjećuje se pozitivan utjecaj izolata *T. atroviride* na masu liofilizirane biljke jer postoji statistički značajna razlika između tretmana u kojem je zrno bilo inokulirano s Tav1 u odnosu na tretmane SK (dezinficirano zrno u Fg1 kontaminiranom pijesku) i FgTh (Tav1 zrno u Fg1 kontaminiranom pijesku).



Grafikon 5. Utjecaj izolata *T. atroviride* na masu liofilizirane biljke (a, b, c, d – različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Duncanovom testu višestrukih raspona na razini $P \leq 0,95$)

U Grafikonu 6. prikazan je utjecaj izolata *T. atroviride* na dužinu korijena. Statistički značajna razlika u usporedbi s drugim tretmanima vidi se u kontroli gdje je prosječno najveća dužina korijena klijanaca pšenice (78,308 mm). Između tretmana Th, SK i FgTh nema statistički značajnih razlika.

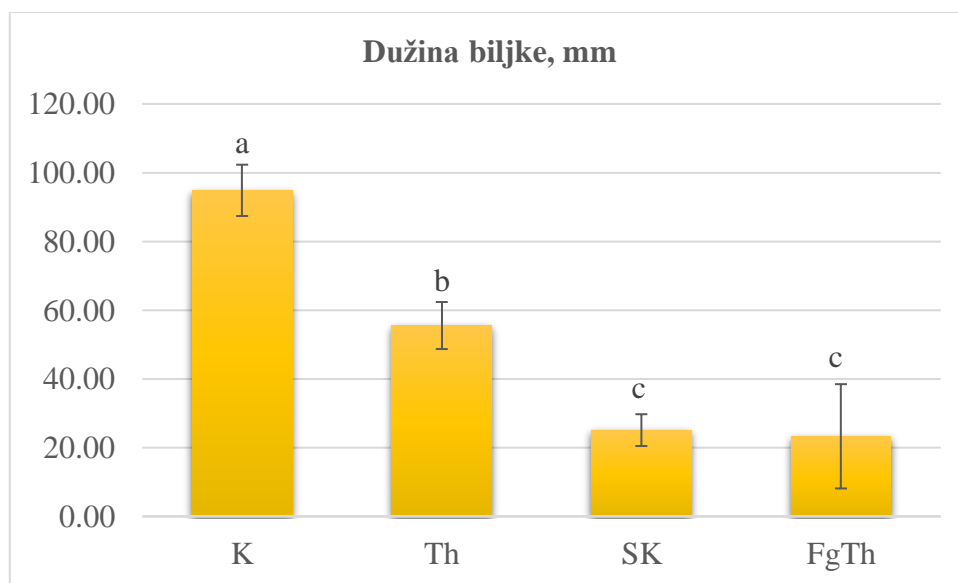
U Grafikonu 6. su prikazani rezultati utjecaja ispitivanih tretmana na dužinu korijena i ne primjećuje se pozitivan utjecaj izolata *T. atroviride* na dužinu korijena s obzirom da nema statistički značajnih razlika između tretmana u kojima je zrno bilo inokulirano s Tav1 i onih tretmana bez Tav1.



Grafikon 6. Utjecaj izolata *T. atroviride* na dužinu korijena (a, b, c, d – različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Duncanovom testu višestrukih raspona na razini $P \leq 0,95$)

Utjecaj izolata *T. atroviride* na dužinu biljke prikazan je u Grafikonu 7. Klijanci pšenice u kontrolnoj varijanti (K) imaju prosječno najveću dužinu biljaka u iznosu od 94,856 mm. Dužina biljke u tretmanu čije je zrno inokulirano izolatom Tav1 (Th) iznosi 55,529 mm te između kontrole (K) i tretmana Th postoji statistički značajna razlika u korist kontrole. Lošiji rezultati su ustanovljeni u tretmanima SK (dezinficirano zrno u kontaminiranom pijesku) i FgTh (zrno inokulirano izolatom Tav1 u kontaminiranom pijesku), no između njih nema statistički značajne razlike.

U mjerenju ovog svojstva klijanaca pšenice nije utvrđen statistički značajan pozitivan utjecaj izolata Tav1.



Grafikon 7. Utjecaj izolata *T. atroviride* na dužinu biljke (a, b, c, d – različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Duncanovom testu višestrukih raspona na razini $P \leq 0,95$)

Intenzitet zaraze je ocijenjen ocjenama od 0 do 5 (0 = zdrav klijanac; 5 = visok stupanj zaraze, nema klice) te je izračunat indeks bolesti prema McKinney (1923.).

Indeks bolesti računa se prema sljedećoj formuli:

$$I = (\sum(n \times k)) / (N \times K) \times 100$$

n – broj biljaka po kategorijama

k – broj pojedine kategorije

N – broj svih ispitanih biljaka

K – broj usvojenih kategorija

U Tablici 1. prikazan je utjecaj tretmana na intenzitet bolesti. Indeks bolesti je veći kod klijanaca pšenice koji su tretirani *T. atroviride* (Th) nego kod kontrolne varijante (K). Također nema velike razlike u vrijednostima indeksa bolesti kod tretmana s dezinficiranim zrnom posijanim u Fg1 kontaminiran pijesak (SK) u odnosu na zrno inokulirano izolatom Tav1 posijano u *F. graminearum* kontaminiran pijesak (FgTh).

Tablica 1. Utjecaj tretmana na intenzitet bolesti

Tretman		Indeks bolesti
K	dezinficirano zrno / sterilni pijesak	5,56
Th	Tav1 zrno/sterilni pijesak	26,3
SK	dezinficirano zrno/Fg1 pijesak	70,74
FgTh	Tav1 zrno/ Fg1 pijesak	65,93

U ovom konkretnom slučaju, gljiva *Trichoderma atroviride* nije uspjela suzbiti patogena *Fusarium graminearum*. To se može dogoditi iz raznih razloga, kao što su neodgovarajući izolat *Trichoderma*, konkurencija sa patogenom ili pod utjecajem drugih čimbenika.

Kao što je ranije spomenuto, u istraživanju o utjecaju ovog izolata provedenom na maslini, utvrđeno je poboljšanje kvalitativnih svojstava ulja nakon primjene izolata Tav1 (neobjavljeni rezultati). S obzirom kako je ovaj izolat pospješio kvalitativna svojstva masline, istražili smo kako bi isti taj izolat Tav1 reagirao na pšenicu, odnosno klijance pšenice zaražene umjetnom infekcijom *F. graminearum*.

Izolat Tav1 nije pokazao statistički značajna poboljšanja na klijancima pšenice. Kontrolna varijanta (dezinficirano zrno posijano u sterilni pijesak) se pokazala kao najbolja od svih tretmana što znači da je izolat Tav1 čak pogoršao kvalitativna svojstva pšenice.

Od samoga početka, kontrolna varijanta je imala najbolju klijavost, dok je u tretmanu u kojem je primijenjen izolat Tav1 klijavost manja. Indeks bolesti najmanji je bio u kontrolnoj varijanti, dok se s primjenom izolata povećao. U tretmanu izolata Tav1 u zaraženom supstratu nema velike učinkovitosti, što znači da gljiva nije spriječila patogena (Fg1) i smanjila zarazu.

S obzirom da u ovome slučaju ovaj izolat (Tav1) nije djelovao pozitivno na smanjenje zaraze klijanaca pšenice s *F. graminearum*, ne znači da bi isto tako djelovao svaki izolat *T. atroviride*. Nemaju svi izolati *T. atroviride* iste osobine i sposobnosti suzbijanja patogenih gljiva. Pretpostavka je da je izolat koji je korišten za suzbijanje *F. graminearum* manje efikasan u odnosu na druge izolate *T. atroviride*.

Također, posljedica negativnog učinka može biti i osjetljivost određenih sorti pšenice na *T. atroviride*, što bi moglo dovesti do suprotnih efekata u usporedbi sa kontrolom.

Važno je napomenuti da su istraživanja o ovom pitanju još uvijek u tijeku, i da negativni učinci *T. atroviride* na klijance pšenice nisu uvijek prisutni. U drugim istraživanjima *T. atroviride* se često koristi kao korisna gljiva u borbi protiv patogenih gljiva, jer može pomoći u zaštiti bilja od gljivičnih oboljenja. Međutim, kao i sa svakim biološkim agensom, važno je pažljivo proučiti odgovarajuće izolate i vrste biljaka na koje se primjenjuje, kao i uvjete i vrijeme primjene kako bi se izbjegle eventualne negativne posljedice.

4. ZAKLJUČAK

Trichoderma atroviride predstavlja važan prirodni izvor za kontrolu patogena biljaka i ima potencijal da se koristi u integriranoj biljnoj zaštiti, gdje se kombinira s drugim metodama suzbijanja kako bi se postigao optimalni učinak u zaštiti biljaka.

Stručnjake sve više zabrinjava zaštita bilja i očuvanje agroekosustava, stoga kako su rastući zahtjevi za održivom proizvodnjom u poljoprivredi, biološka kontrola je budućnost i ključna stavka integrirane zaštite bilja.

Biološka kontrola i primjena mikroorganizama kao što su *T. atroviride* su ključne komponente održivog poljoprivrednog sustava. Ova metoda ne samo da ima manji utjecaj na životnu sredinu i ljudsko zdravlje, nego može smanjiti rizik od razvoja rezistentnosti kod štetnih organizama.

Daljnja istraživanja su neophodna kako bi se identificirali najefikasniji izolati, optimizirali uvjeti primjene i identificirale situacije u kojima biološka kontrola može pružiti najbolje rezultate. Efikasnost djelovanja biološke kontrole može varirati u ovisnosti od raznih čimbenika. Ključno je provoditi istraživanja koja će osigurati bolje razumijevanje mehanizma djelovanja mikroorganizama te pronaći način za povećanje efikasnosti.

5. POPIS LITERATURE

1. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2006.): Praktikum iz fitopatologije. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
2. Ćosić, J., Krstanović, V., Jurković, D., Ledenčan, T. (2006.): Fuzarijske bolesti pšenice. Savjetodavna služba, 39: 1-8.
3. Ergović, L., Siber, T., Vrandečić, K., Popović, B. (2022.): Utjecaj biološkog preparata na zarazu klijanaca pšenice s *Fusarium graminearum*. Stručni rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
4. Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G. (2014.): Chapter Three - Potential of Fungal Feruloyl Esterases in Biotechnology. In *Advances in Applied Microbiology* Academic Press, 88: 1 – 24.
5. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004.): *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1): 43-56.
6. Harman, G. E., Kubicek, C. P. (1998.): *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis. 2: 25 – 42
7. Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., Gutiérrez, S. (2013.): The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16(1): 69-80.
8. Kovaček, I. Antifungalna učinkovitost *Trichoderma* sp. Završni rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek. Osijek, 2020.
9. Monte, E. (2001.): Understanding plant-microbe interactions in soil: principles and progress. In *Advances in agronomy*. Academic Press, 73: 3 – 37.
10. Petrović, E., Baličević, R., Ćosić, J., Vrandečić, K., Godena, S. (2023.): Biološka kontrola najznačajnijih uzročnika bolesti masline. *Glasilo biljne zaštite*, 23(3):374-390.
11. Shores, M., Harman, G. E., Mastouri, F. (2010.): Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48: 21-43.
12. Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A., Kumara, V. (2014.): Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virology & Mycology*, 3(1): 1 – 3

13. Tomasović, S., Vlahović, V., Sesar, B. (1994.): Fuzarioze pšenice sa težištem na zarazu klasa. Sjemenarstvo 11, 6, 517-546.
14. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L. (2012.): A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites .in the interactions with plants. Plant Physiology and Biochemistry, 60: 117-123.