Primjena benefitne gljive Trichoderma spp. u biološkoj kontroli poljoprivrednih kultura

Čačić, Borna

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josip Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:369021

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Borna Čačić, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

KORIŠTENJE BENEFITNE GLJIVE *TRICHODERMA* SPP. U BIOLOŠKOJ ZAŠTITI POLJOPRIVREDNIH KULTURA

Diplomski rad

Osijek, 2017

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Borna Čačić, apsolvent

Diplomski studij, Ekološka poljoprivreda

KORIŠTENJE BENEFITNE GLJIVE *TRICHODERMA* SPP. U BIOLOŠKOJ ZAŠTITI POLJOPRIVREDNIH KULTURA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Doc. dr. sc. Sandra Rašić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Renata Baličević
4. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, zamjenski član

Osijek, 2017

Sadržaj

1. Uvod ... 1
2. Pregled literature ... 2
2.1. Općenito o *Trichodermi* ... 2
2.2. Klasifikacija i morfologija ... 3
2.3. Prednosti i nedostaci djelovanja biofungicida ... 4
2.4. Mehanizmi djelovanja biofungicida i podjela ... 6
2.5. Biofungicidi na bazi gljivica ... 7
3. Benefitna gljiva *Trichoderma* u biološkoj zaštiti ... 8
3.1. Vrste roda *Trichoderma* štite usjev od bolesti ... 9
3.2. Vrste roda *Trichoderma* kao promotor rasta uz pomoć 6PP-a ... 10
3.3. Povećanje otpornosti biljke uslijed korištenja *Trichoderme* ... 11
3.4. Enzimi i sekundarni metaboliti gljivice roda *Trichoderma* spp. ... 12
3.5. *Trichoderma* u biološkoj obnovi tla ... 15
3.6. *Trichoderma* spp. kao bio-gorivo ... 16
4. Komponente primjene pripravaka na bazi gljivice roda *Trichoderma* ... 17
5. Mehanizmi djelovanja gljivice roda *Trichoderma* ... 17
5.1. Hiperparazitizam i antibioza ... 18
5.2. Nadmetanje za hranjive tvari ... 20
5.3. Biološka kontrola gljivice *Trichoderma* spp. mikoparazitizmom ... 20
5.4. Korištenje ekstrakata Trihoderme kao alternativa za korištenje živih mikroba ... 21
6. Zaključak ... 23
Popis literature: ... 24
Popis slika: ... 26
Sažetak ... 28
Summary ... 29
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA ... 30
BASIC DOCUMENTATION CARD ... 31

1. Uvod

Gljivice roda *Trichoderma* su dobro znane kao nesavršene gljivice, brzo rastuće u kulturama te kao dobri proizvođači zelenih spora. Rasprostranjene su u svim tlima širom svijeta, obično u korijenju kultura, tlu i biljom otpadu. Gljivice ovoga roda bile su poznate kao biološki agenti u kontrolni biljnih bolesti. No nakon pokusnog apliciranja 1930. godine *Trichoderma* je postala popularna i u zaštiti usjeva od napada biljnih patogena jer se kroz ovo istraživanje spoznalo kako su dio njenih sekundarnih metabolita kako hlapivi tako i ne hlapivi antibiotici. Kada je u pitanju način djelovanja gljivice ovog roda ono se zasniva na 2 procesa a to su mikoparazitizam i antibioza.

Mikoparazitizam je zasnovan na odnosu micelija antagonista i patogena nakon čega izlučevine enzima obavljaju degradaciju staničnog zida domaćina. (Kubicek et al., 2001.). Osim ovoga, gljivice roda *Trichoderma* spp. poznate su po lučenju snažnog hidrolitičkog multienzimskog kompleksa (hitinaza, beta-1,3-glukonaza, beta-1,6-glukonaza, alfa-1,3 glukonaza), proteaza te celulaza. Njihovo djelovanje u poljoprivredi je višestruko, pa tako gljivice ovoga roda imaju ulogu u protekciji usjeva od bolesti, djeluju kao vrhunski inhibitori rasta, razvijaju imunosni sistem same biljke na određene bolesti, kada je u pitanju razvoj patogenih gljivica *Trichoderma* i tu ima riješenje, a to je da luči brojne enzime koji djeluju preventivno. U konvencionalnoj poljoprivredi došlo je do ozbiljnog narušavanja biodiverziteta, te gljivice ovog roda pomažu u ponovnom uspostavljanju ravnoteže. Poznato je i djelovanje u kontroli korova. Osim gore navedenih prednosti ova gljivica je od iznimne važnosti i kada su u pitanju alternativni izvor energije.

S obzirom na zagađenost zemlje svaka alternativa za gorivo danas je dobrodošla. Upravo ovdje nalazimo još jednu prednost gljivice ovog roda, a to je da je upravo da je ona jedan od glavnih sastojaka bio-goriva.

2. Pregled literature

2.1. Općenito o *Trichodermi*

Gljivice roda *Trichoderma* spp. predstavljaju najzastupljeniju skupinu mikroorganizama kada govorimo o biološkoj zaštiti bilja. Prema procjenama čak 90% gljivica ovoga roda su antagonisti (Benitez et al., 2004).

Trichoderma spp. u biološkoj kontroli može biti učinkovita protv brojnih gljivičnih patogena. Ona se indirektno nadmeće sa patogenom za prostor i hranjive tvari promoviranjem rasta same biljke ili povećavanjem otpornosti biljke u mehanizmima kao što su antibioza ili mikoparazitizam.

Pozitivan učinak gljivica ovog roda na biljke predmet su brojnih znanstvenih istraživanja (Hermos et al., 2012.) u kojima je istražena učinkovitosti ovih gljiva u kontroli bolesti brojnih poljoprivrednih i povrtlarskih kultura, ukrasnog bilja, te pri uzgoju voća (Harman, 2000.; Howell, 2003.; Benitez et al., 2004.; Smolinska et al., 2007.). Prema provedenim studijama gljivice roda *Trichoderma* spp. mogu kontrolirati rakom zaražen korijen kod kupusnjača koje izazuva *Leptosphaeria maculans* i *L. biglobosa* (Kaczmarek Jedryczka, 2011.), a uspješnost ovisi o rezistentnosti gena patogena u odnosu na biljku koja je napadnuta. Najveći pad gljivične stope rasta uzrokovan je gljivicom *Trichoderma atroviride*. Učinkovitost gljivice roda *Trichoderma* potvrđena je i u kontrolni brojnih gljivičnih štetočina (Lewis and Lumsden, 2001.; Dolatabadi et al., 2011.). Koristi se također i u kontroli bakterija i virusa štetnika usjeva (Hanson and Howell, 2002.), no njena učinkovitost potvtđena je i u kontroli korova (Heraux et al., 2005.).

Važno je također napomenuti kako se u većini zemalja kao glavni proizvodi za biološku kontrolu koriste upravo mikroorganizmi roda *Trichoderma*. Osim što smanjuju razvoj bolesti stimuliraju rast biljaka, povećavaju otpornost biljaka na stres, te potiču bržu razgradnju komposta čime biljke brže dolaze do hranjivihi nutrijenata (Harman, 2000). Prema Berriolu i Morandiju korištenjem *Trichoderme* troškovi su znatno manji u odnosu na korištenje drugih sredstava. Prema Monte-u (2001.) korištenjem *Trichoderme* spp. reducira se upotreba kemijskih fungicida čime se povećava zdravlje biljke, te postiže čitav niz pozitivnih učinaka na okoliš u cjelini (Dubey et al., 2007.).

Iz svega navedenog može se zaključiti o brojnim pozitivnim iskustvima o učincima gljivica roda *Trichoderma*, no analizirajući iskustva različitih zemalja uočeno je da rezultati variraju ovisno o načinu pripreme pripravaka za kontrolu bolesti, te doziranju istih u praksi.

2.2. Klasifikacija i morfologija

Rod *Trichoderma* je prvi puta spomenut 1794. kao zelena plijesan koja raste na oštećenim granama i drugim supstratima (Persoon, 1794) Riječ je o aseksualnoj saprofitskoj gljivi s telomorfnim stadijem koje pripadaju redu *Hypocreales*, porodici *Hypocreaceae*. Do kraja 60-ih godina vladalo je uvriježeno mišljenje kako u rodu *Trichoderma* postoje samo dvije vrste: *Trichoderma viride* i *Trichoderma koningii*. Većina gljivica roda *Trichoderma* morfološki je vrlo slična i dugi niz godina sve se svrstavalo pod jednu, *T. Viride* (Bisby, 1939). 1969. godine taksonomija je revidirana i Rifai je opisao čak 9 vrsta s obzirom na sistem grananja konidiofora, karakteristike fijalospora, raspored fijalida i morfologiju konidija. Sredinom 90-ih godina prošlog stoljeća došlo je do nove podjele i klasifikacije roda *Trichoderma*, koja dijeli isti u rodova *Trichoderma, Pachybasium, Saturnisporum, Longibrachiatum* i *Hypocreanum*. Danas je opisano i povrđeno filogenetski preko 100 različitih vrsta.

Članovi roda *Trichoderma* od iznimne su važnosti za poljoprivredu jer pogoduju poticanjem razgradnje ostataka biljaka u tlu. Osim ovoga, od iznimne je važnosti *T. reesei* (Slika 1.), jer proizvodi enzim za razgradnju celuloze, te je zbog toga zastupljena u biotehnološkoj industriji (Kubicek and Panttila, 1998.).



Slika 1. *Trichoderma Reesei*;

URL: http://www.ifpenergiesnouvelles.com/Expertise/Research-divisions/Applied-Chemistry-and-Physical-Chemistry/Microorganisms-change-their-diet; (22.5.2017.)

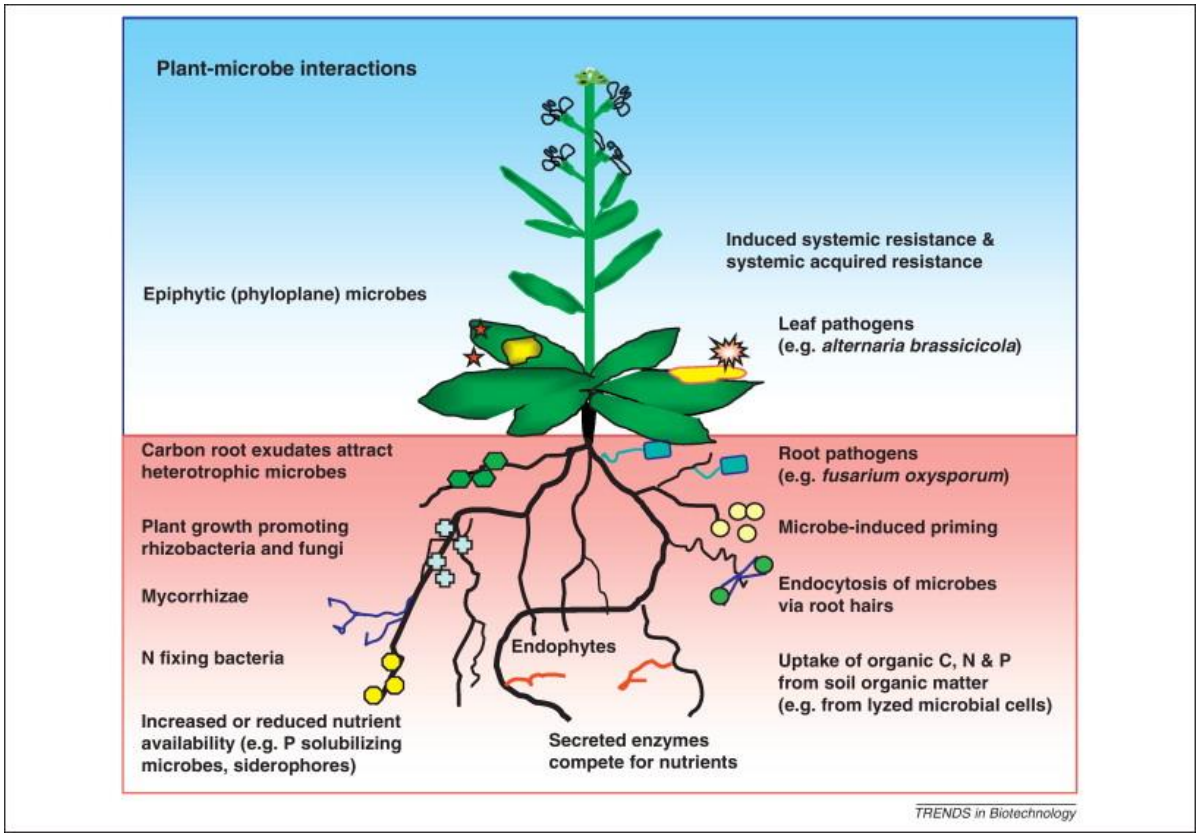
Osim ovoga neki članovi roda *Trichoderma* imaju biofungicidalno djelovanje kao npr. *T. harzianum, T. asperellum,* itd. (Papavizas, 1985.). Oni djeluju po principu mikroparazitizma tijekom kojeg sintetiziraju enzime koji imaju sposobnost razgradnje stanične stijenke patogenih gljiva, također proizvode neke antibiotike, te ulaze u kompeticiju sa patogenima za prostor i hranjive tvari. Stanište ovog roda uglavnom je tlo, dok neki žive na posebnim staništima. Benefitna svojstva gljivica roda *Trichoderma* dobro su znana preko 70 godina, no njihova upotreba u komercijalne svrhe krenula je ne tako davno. Gljivice ovog roda efikasne su kada su u pitanju patogene gljivice kao što su predstavnici rodova: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monilla*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia*, *Verticillium* (Lumsden et al., 1993.; Monte, 2001.).

2.3. Prednosti i nedostaci djelovanja biofungicida

Iako se radi o sredstvima koja su efikasna u borbi protiv patogenih gljiva kao i svako sredstvo, tako i ovo posjeduje određene prednosti i nedostatke. Radi se o sredstvima čija su baza organizmi koji su prirodnog porijekla. Ova sredstva omogućavaju razvoj održive poljoprivrede primjenom bioloških agensa u programima integrirane zaštite bilja. Ova

sredstva ne narušavaju biodiverzitet s obzirom da se radi o organizmima koji su prirodnog porijekla. Primjenom ovih sredstava smanjujemo potrebu za kemijskim sredstvima uslijed kojih može doći do uništavanja organizama koji nisu ciljana skupina. Ova sredstva su upravo zbog toga manje štetna od kemijskih preparata. Osim ovoga, prednost biofungicida je svakako kraća karenca i radna karenca, te njihova široka primjena u svim tipovima biljne proizvodnje. Primjenom biofungicida možemo trajno unijeti dobre organizme u tlo, te samim time obogatiti tlo, biodiverzitet i osigurati se kroz izvjestan broj generacija.

No kao i sve i ovi preparati imaju brojne nedostatke. Prije svega radi se o preparatima koji se teže uvode u primjenu. Za razliku od kemijskih sredstava koji imaju širok spektar djelovanja u ovom slučaju radi se o sredstvu koji ima uzak spektar djelovanja. Za razliku od kemijskih sredstava djelovanje biofungicida je znatno sporije i njihova primjena je moguća isključivo u slučaju prevencije.



Slika 2. *Trichoderma* u interakciji sa mikroorganizmima; Trends in biotechnology; URL: http://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(11)00192-2; (22.5.2017.)

S obzirom da se radi o sredstvima čija su baza organizmi iz prirode sasvim je logično da im je i rok trajanja znatno kraći od kemijskih sredstava, te da im je cijena nešto viša. Još neki od nedostataka ovih sredstava je potreba za višekratnom primjenom, te sniženje pragova štetnosti.

2.4. Mehanizmi djelovanja biofungicida i podjela

Tlo koje nije obrađivano samo po sebi predstavlja uravnoteženu sredinu, jer svi koji nastanjuju isto se konstantno bore za stanište i hranjive tvari (kompeticija) te su razvili različite načine kako se istaknuti i time potisnuti svoje konkurente (antagonisti), no uslijed čovjekovog djelovanja ova ravnoteža je narušena, odnosno, ne bih rekao narušena, već je čovjekova želja za znanjem narušila tu ravnotežu. On je ustvrdio kako u nekim slučajevima korisni organizmi sintetiziraju tvari koje su otrovne za gljive (antibioza), dok su neke vrste pravi paraziti i oni se hrane direktnim usisavanjem sadržaja stanica gljiva (mikoparazitizam). Upravo sve opisane mehanizme istovremeno koristimo u borbi protiv štetnih gljiva, pa ih zato smatramo čimbenicima borbe ili bio-čimbenicima. Govorimo li o benefitnoj gljivi može se reći: "*Trichoderma* spp. je gljiva prisutna u gotovo svim tipovima tala. Njezina uloga u posljednje vrijeme sve više dobiva na značenju u području biološke zaštite. Dokazano je da preferira područja s velikom količinom zdravog korijenja koje ujedno i potiče na rast (Romanjek-Fajdetić i sur., 2010.) te se koristi kao antagonistička gljiva za suzbijanje fitopatogenih gljiva (*Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp.)" (Parađiković i sur., 2000., Ćosić i sur., 2001., Verma i sur., 2007.). Među najzastupljenijim fungicidima našao se i Trichodex (Slika 3.) čija je baža upravo gljiva *Trichoderma harzianum* izolat T-39 to je i jedini biofungicid koji je dopušten u RH i koristi se za prevenciju gljive botrytis cinerea na vinovoj lozi i jagodama i upravo je to razlog zbog čega sam upravo odabrao ovo za temu mog diplomskog rada.



Slika 3. Biofungicid Trichodex.
Izvor: http://www.agribio.it/trichodex.htm; (22.5.2017.)

Biofungicide možemo podjeliti u 3 kategorije:

1. biofungicidi na bazi gljivica;
2. kvasaca;
3. bakterija.

o čemu će biti govora više u narednim poglavljima. S obzirom da je tema mog diplomskog rada primjena benefitne gljive *Trichoderma* spp. u narednim će poglavljima naglasak biti na biofungicidima na bazi gljivica, dok će o ostalima biti rečeno tek ponešto.

2.5. Biofungicidi na bazi gljivica

Trichoderma spp. su gljivice prisutne u većini obradivih tala. Njihovo djelovanje zasniva se na 2 procesa a to su mikoparazitizam i antibioza. Mikoparazitizam je zasnovan na odnosu micelija antagonista i patogena nakon čega izlučevine enzima obavljaju degradaciju staničnog zida domaćina. (Kubicek et al., 2001.). Osim ovoga, gljivice roda *Trichoderma* spp. poznate su po lučenju snažnog hidrolitičkog multienzimskog kompleksa (hitinaza, beta-1,3-glukonaza, beta-1,6-glukonaza, alfa-1,3 glukonaza, proteaza te celulaza. Najbolji stimulator rasta biljaka je uočen kod korištenja benefitne gljive *Trichoderme harzianum* na

osnovu brojnih pokusa. Prema navodima (Chet et. al., 2006.) klijanje je povećano za 30 posto, dok je korjenov sustav za 95 posto. *Trichoderma harzianum* je prisutna u pripravku Trichodex WP koji je registriran u Hrvatskoj. Za vrijeme cvatnje ovim pripravkom se tretira vinova loza u koncentraciji od 0,3-0,4 %. Po sezoni je potrebno obaviti 4 prskanja. Karenca za grožđe je 2 tjedna i to se odnosi na suzbijanje patogene gljive *Botrytis cinerea*. Prema Lučiću *T. harzianum* je dakle antibiotski fungicid koji ima nisku toksičnost za čovjeka luči antimikrobne supstance, uspostavlja kvalitetnu životnu sredinu, te je adekvatan za ekološku zaštitu u povrtnjacima, voćnjacima, vinogradima, te uzgoju ukrasnog bilja. U Hrvatskoj je registriran za suzbijanje gljive *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi i jagodama. Prema Thomasu (2004.) *Plantshield* na bazi *T. harzianum* se koristi za suzbijanje bolesti kao što su *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia solani* i *Pythium* spp. u Virginiji na kulturama kao što su kupusnjače i sl., te na rajčici, krastavcima i u rasadnicima drvenastih biljaka.

Još jedan u nizu bioloških fungicida a koji pripada rodu *Trichoderma* je i *T. Viride*. Pri samom nastanjivanju kada je u pitanju korjenov sustav, ova gljiva inducira lokalnu i sistemičnu otpornost na brojne patogene kao što su *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Armilaria* spp. i sl. Sekundarni metabolite ove gljive kao što su celulaza i hitinaza razgrađuju celulozu i hitin. Ovi enzimi iznimno su važni jer su uspješni u razgradnji stanične stijenke patogena, no osim toga djeluju i preventivno na iste.

3. Benefitna gljiva *Trichoderma* u biološkoj zaštiti

Gljivice roda *Trichoderma* od iznimne su važnosti u poljoprivredi. Zbog svojih brojnih benefita koje posjeduju kako same one, tako i njeni produkti današnju poljoprivrednu proizvodnju bez ove bakterije gotovo je nemoguće zamisliti. Neke od prednosti koje su karakteristične za ovu gljivicu su: **štite usjev od bolesti, djeluju kao inhibitori rasta, povećavaju otpornost same biljke na određene bolesti, neki enzimi djeluju preventivno kada je u pitanju razvoj patogenih gljivica, te pomažu u ponovnom uspostavljanju ravnoteže u tlu koja je narušena uslijed unosa brojnih kemijskih sredstava (bioobnova).**

Osim gore navedenih prednosti ova gljivica je od iznimne važnosti i kada je u pitanju alternativni izvori energije. S obzirom na zagađenost zemlje svaka alternative za gorivo danas je dobrodošla. Upravo ovdje nalazimo na još jednu prednost gljivice ovog roda, a to je da je upravo ona jedan od glavnih sastojaka bio-goriva.

3.1. Vrste roda *Trichoderma* štite usjev od bolesti

Za uspješnu zaštitu usjeva od bolesti potrebno je djelovati preventivno. Najefikasnije je djelovati u samu srž biljke, odnosno pripravak na bazi *Trichoderme* spp. najučinkovitije je aplicirati na samo sjeme. To je vrlo jednostavna i efektivna metoda. Potrebno je sjeme obasipati suhim puderom ili prahom koji sadrži gljivice roda *Trichoderma* netom prije sjetve. U komercijalne svrhe potrebno je aplicirati od 3 do 10 grama po kilogramu sjemena, ovisno o veličini (Mukhopadhyay et al., 1992). Premazivanje sjemena ovim prahom potrebno je provesti u kontroliranim uvjetima, u toplim i vlažnim uvjetima. Ova metoda ima potencijalne prednosti u odnosu na obično premazivanje sjemena samim time jer rezultira bržim i ujednačenijim pojavljivanjem sadnica. *Trichodermina* konidija klija na površini sjemena i formira zaštitni sloj na premazanom sjemenu. Takvo sjeme puno bolje podnosi nepogodne uvjete. Biološko premazivanje sjemena prahom koji je pripravljen na bazi gljivice roda *Trichoderma* može reducirati određenu količinu prethodno apliciranih bioloških agensa koji su aplicirani na sjeme. Biološko premazivanje sjemena pokazalo se uspješnim za culture kao što su: rajčica, sojino sjeme, slanutak. Osim tretiranja samog sjemena efikasnim se pokazivalo i tretiranje korjena. Korijenje sadnica može se tretirati sa sporama, staničnom suspenzijom antagonista ili dreniranjem bioagenata u posudama za rasadnike ili natapanjem korijena u bioagentnoj suspenziji prije same presade. Ova metoda najčešće je korištena za povrtne usjeve, točnije rižu, gdje je obavljen ovaj pokus (Singh and Zaidi, 2002). Namakanje korijena rajčice djeluje preventivno kada je u pitanju formiranje korijenovog čvora uzrokovano gljivicom *Meloidogyne incognita*. (Slika 4.)

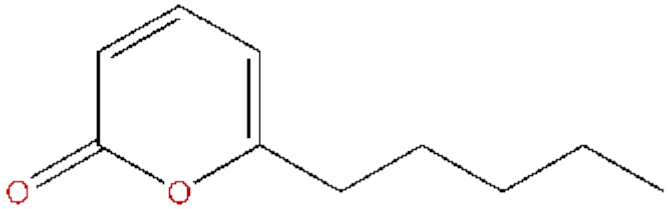
Ovaj tretman ima i ulogu promotora rasta kod ovih vrsta. Najefikasnija primjena pripravaka na bazi vrsta *Trichoderme*, kada je u pitanju zaštita usjeva od bolesti dakako je apliciranje u samo tlo. Nakon što se aplicira u samo tlo, gljivica roda *Trichoderma* se velikom brzinom kolonizira, te samim time ovaj postupak nije potrebno ponavljati tako često.



Slika 4. Korijen graška zaražen nematodom *Meloidogyne incognita;* URL: http://www.alamy.com/stock-photo-pea-roots-with-galls-caused-by-root-knot-nematode-meloidogyne-hapla-7913255.html; (22.5.2017.)

3.2. Vrste roda *Trichoderma* kao promotor rasta uz pomoć 6PP-a

Trichodema spp. nije jedino zastupljena u kontroli patogena, ona je osim ovoga dobro znana i u stimulaciji rasta same biljke i korjenovog dijela te povećavanju otpornosti biljke. (Harman, 2004.a.). Neke vrste roda *Trichoderma* u mogućnosti su prodrijeti kroz površinu i dugotrajno kolonizirati površinu korijena. U provedenom istraživanju, već nakon nekoliko mjeseci tretiranja sa *Trihodermom harzianum* u pripravku T-22 korjen biljke je bio gotovo dvostruko veći u odnosu na onu ne tretirane (Harman, 2004a). Cutler (1986, 1989) je pokazao da sekundarni metaboliti koje prizvodi *Trichoderma koningii* (koniningnin A) i *Trichoderma harzianum* (6-pentil-alfa piron, skraćeno 6PP) (Slika 5,) djeluju kao regulatori rasta biljke.



Slika 5. 6-PAP; The pherobase; URL: http://www.pherobase.com/database/compound/compounds-detail-6-pentyl-2-pyrone.php; (22.5.2017.)

Ovaj enzim je odgovoran za karakterističnu "kokos aromu" *T.harzianum* te je osim toga što služi kao promotor rasta odgovoran i za anti fungalna svojstva. 6-PP ima karakteristike hlapivih organskih komponenti (VOCs). Biosinteza VOCs-a ovisi naravno o uvjetima u kojima biljka obitava, tu prije svega mislim na dostupnost hraniva, pH medija, temperaturu i svjetlost. Prema provedenim istraživanjima korijen na koji je aplicirana ova gljivica (T-22) znatno je veći i robusniji, posebice u soje gdje dolazi do povećanja od čak 123%.(Harman, 2000).

Značajno povećanje kako mase tako i visine biljke uslijedilo je i nakon tretiranja rajčice gljivicom *T. viride* gdje je došlo do povećanja mase za 8% te same visine biljke od 28%, istraživanje je provedeno u kontroliranim uvjetima. (Lindsey and Baker, 1967). U kukuruznim vrstama također je utvrđeno stimulativno djelovanje *Trichoderme* kada je u pitanju rast biljke. Osim u povećanoj masi korijena došlo je i do povećanja broja korijenovih dlačica. Neovisno koristimo li ovu gljivicu na samome sjemenu ili tlu, *Trichoderma* izaziva velike promjene u proteomu kukuruznih biljaka čime se pojačavaju fotosintetski procesi što rezultira većom biljkom sa više energije (Harman et al. 2004.a; Shoresh and Harman, 2008). No bez obzira na sve, sama veličina biljke kako o *Trichodermi* tako ovisi i o svojim hormonima koje će lučiti, najčešće auksinima, odnosno u kojoj će mjeri lučiti. Također ovisi i o mikroorganizmima koji luče ACC deaminazu (ACCD).

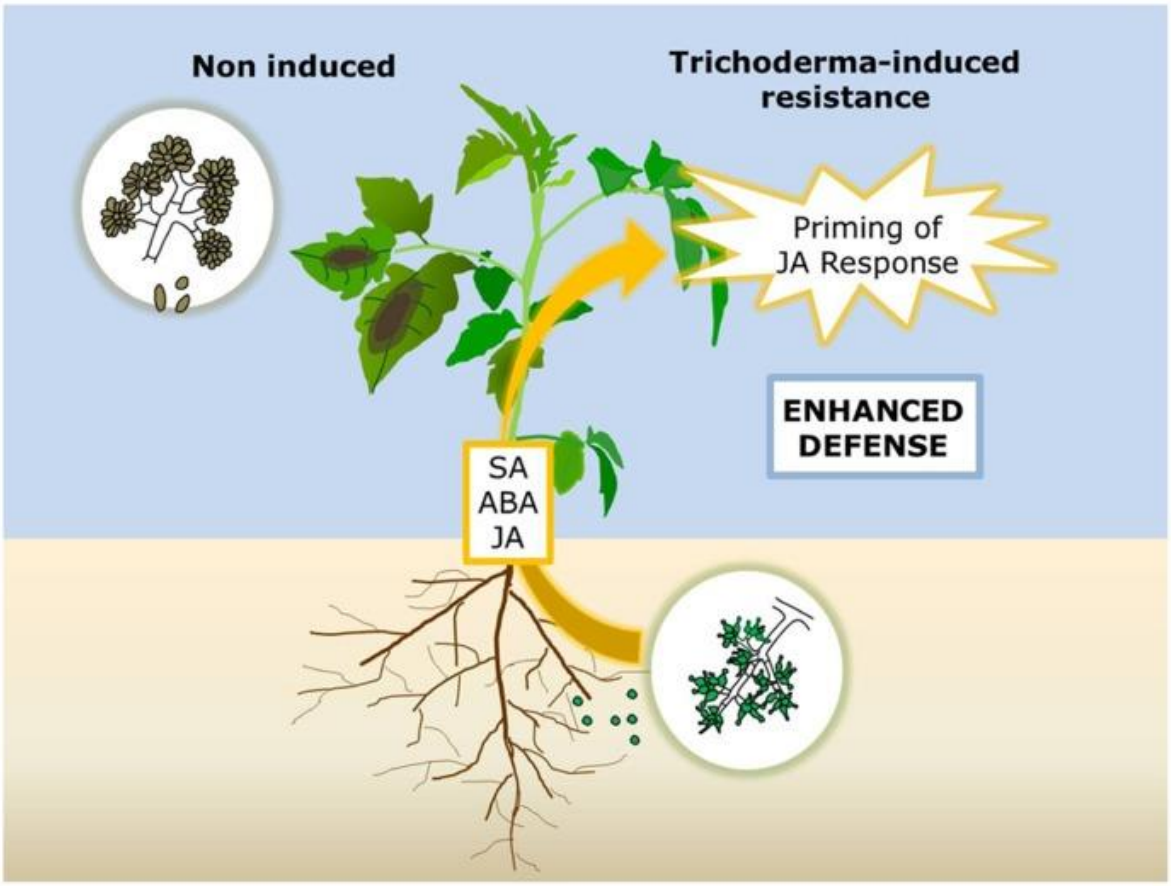
3.3. Povećanje otpornosti biljke uslijed korištenja *Trichoderme*

Kolonizacija biljke uslijed korištenja *Trichoderme* spp. smanjuje bolesti uzrokovane jednim ili više patogena. Brojna istrazivanja pokazala su da kolonizacija korjena uzrokovana

Trichodermom spp. vodi do velikih promjena u biljnom genomu i metabolizmu same biljke, koji vode do akumulacije antimikrobnih komponenti (Mastouri, 2010; Singh et al., 2011). Osim sposobnosti *Trichoderme* bilo kada je u pitanju napad ili inhibicija rasta patogena, one mogu izazvati sistemsku i lokaliziranu otpornost na biljne patogene. *Trichodermom* izazvana genska modifikacija je određena i biotskim i abiotskim čimbenicima stresa, čime je određena i RNA, DNA te metabolizam proteina. *Trichoderma* spp. je odličan izvor prirodnih proteina koji daju biljci veću otpornost na, kako biotičke tako i abiotičke uvjete stresa. HSP70 gen iz *T. harzianum* (pripravak T34). Protein koji je određen Obrambeni mehanizam biljaka koji je ojačan prisustvom *Trichoderme* često je povezan sa akumulacijom različitih antimikrobnih komponenti, kao što su phytoalexins, PR protein koji potiče jačanje staničnih ćelija i drugih dijelova u stanici biljke. (Yedida et al.,2000). Dokazano je kako je pri tretiranju krastavaca sa *T. asperellum* doslo do akumulacije mRNA dva obrambena gena (fenilpropanoida i lipoksigenaze; engl. Phenylpropanoid and lipoxygenase). Potvrđeno je da akumulacija fenolnih sekundarnih metabolite mogu također igrati bitnu ulogu u obrambenom mehanizmu biljke. Na molekularnom nivou, rezultati otpornosti ovise o koncentraciji metabolite i enzima koji su potrebni za razvijanje ovog mehanizma. Tako je od iznimne vaznosti bitna produkcija fenilalanin amonijeva liaza (PAL) i halkon sintaza, koja su važna u sintezi fitoaleksina, hitinaze i glukanaze. Ovi enzimi uključuju patogenski – povezane proteine (SAR response) i enzime odgovorne za ukljanjanje patogena kao što su *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Serysiphe* spp., *Shaerotheca* spp., *Plaspopara* spp., te *Peronospora* spp. koji ovisno o agroklimatskim uvjetima tako napadaju tlo. Generalno hladnija klima sa višom relativnom vlažnosti su draži mediji za patogene gljivice.

3.4. Enzimi i sekundarni metaboliti gljivice roda *Trichoderma* spp.

Enzimi koje proizvode gljivice roda *Trichoderma*, a pogoduju razgradnji stanične stijenke patogena su celulaza, ksilanaza, pektinaza, glukanaza, lipaze, amilaza, arabinaza i proteaza (Strakowska et al., 2014). Hitinaza je najvažniji litski enzim koji igra ključnu ulogu u razgradnji stanične stijenke drugih patogena. Iznimnu važnost također imaju proteolitički enzimi (endo i egzoproteaza) koji su odgovorni za kontrolu lučenja egzocelularnog enzima. Proteolitički enzimi također kontroliraju enzimatsku aktivnost patogena kao što su *Botrytis cinerea (*Slika 6.*), Rhizoctonia solani, Fusarium culmorum* i nematoda kao što su *Meloidogyne javanica* (Sharon et al. 2001.).



Slika 6. Model koji prikazuje induciranu otpornost *Trichoderme* protiv *Botrytis cinerea* u rajčici, URL:https://www.researchgate.net/figure/242334471_fig5_Model-for-*Trichoderma*-induced-resistance-TISR-against-Botrytis-cinerea-in-tomato-Root; (22.5.2017.)

Neki sojevi roda *Trichoderma* proizvode siderofore koje djeluju inhibitorno po određene gljive kao što su *B. Cinerea* (Slika 6.), koja zbog siderofora ne dobija dovoljno hraniva te ne postoji mogućnost njenog daljnjeg rasta i razvoja na kulturi. Gljivice roda *Trichoderma* također mogu stvoriti kiselu sredinu koja je izrazito nepovoljna za razvoj drugih patogena (Benitez et al., 2004.)

Trichoderma spp. također proizvodi velik broj antibiotika, koje uključuju acetaldehid gliotoksin i viridin, alfa – pirone, terpene, poliketide, derivate izocijanida, piperacine i kompleks sličnih peptaibola. Mnogi od ovih antibiotika djeluju sinergijski u kombinaciji sa različitim degradirajućim staničnim enzimima gljivica roda *Trichoderma*. U ovoj kombinaciji, antibiotici imaju jak inhibitorni učinak na brojne biljne patogene. Inhibitorska aktivnost kemijskih fungicida apliciranih na patogene gljive roda *Botrytis* i druge biljne patogene moze biti snažnija ukoliko u isti dodamo *Trichodermine* degradirajuće stanične

enzime. Za razliku od kemijskih sredstava *Trichodermini* degradirajući stanični enzimi nisu opasni za čovjeka, kao niti za životinje, te u okolišu stvaraju korisne rezidue u tlu što je pokazano u EPA-inom testu pri registraciji dvije Trihodermine vrste u biološkoj zaštiti u SAD-u.

Niskomolekularni spojevi i antibiotici (hlapivi i ne hlapivi) koje luče gljivice roda *Trichoderma* ometaju kolonizaciju štetnih mikroorganizama uključujući i nematode koje se nalaze u zoni korijena (Eapen and Venugopal, 1995). Većina gljivica roda *Trichoderma* proizvode hlapive i ne hlapive toksične metabolite. U nekim slučajevima, proizvodnja antibiotika korelira sa biološkom kontrolom, te tako pročišćeni antiobiotici imaju efektivnije djelovanje. Hlapive supstance koje proizvode gljivice ovog roda djeluju inhibitorno na rast micelija *Macrophomina phaseolina* i to od 22-51% (Angappan, 1992). Hlapivi antibiotici koji nastaju kao metaboliti gljivice roda *T. harzianum* i *T. atroviride* značajno usporavaju razvoj gljivičnih patogena koji su karakteristični za topolu, a to su *Cytospora chrysosperma* i *Dothiorella gregaria*. S druge strane ne hlapivi sekundarni metaboliti gljive *Trichoderme* spp. Djeluju inhibitorno na linearno povećanje patogena (Deshmukh and Pant, 1992; Pandey, 1988). Postoje također i primjeri gdje pretjerano lučenje antibiotika kao što je gliovirin od gljivice roda *T. virens*, koji u normalnim količinama štiti pamuk of *Phythium ultimuma* u ovom slučaju ima „kontra“ učinak. *Trichoderma* spp. također proizvode ugljični monoksid, amonijak, karbonilne komponente i acetaldehide koji mogu poboljšati aktivnost antagonista u tlu. (Robinson and Park, 1966.).

Poznato je više od 180 sekundarnih metabolita koji predstavljaju različite klase kemijskih spojeva (Gams and Bisset, 1998.; Reino et al., 2008.), a možemo ih podjeliti u skupine kao što su: hlapivi antibiotici, te spojevi topivi u vodi. *T. viride*, *T. harzianum* i *T. koningii* su u stanju proizvesti 6PP (6-pentil-α-piron) koji pripada skupini hlapivih antibiotika i od iznimne je važnosti u biokontroli vrsta kao što su *B. cinerea, R. solani* i *Fusarium oxysporum*.

Gljivice roda *Trichoderma* osim što proizvode spojeve koji su dobri u borbi sa patogenima također proizvode i zeaksantin i giberelin, odnosno spojeve koji ubrzavaju klijavost. Mnogo sojeva proizvode i kiseline kao što su glukonska, limunska i kumarinska, što uzrokuje oslobađanje fosfora, odnosno njegovih iona i mikroelemenata koji će kasnije biti dostupni biljkama (Harman et al., 2004). Ovo je potvrđeno na primjeru krastavca, koji je nakon primjene *T. harzianum* povećao masu korijena i nadzemnog dijela biljke, no osim mase utvrđen je veći udio mikroelemenata. Osim kod krastavaca potvrđeno je pozitivno

djelovanje toda *Trichoderma* na prinos jagoda (Porrasu et al., 2007.). Gljivice roda *Trichoderma* također potiču sustavni otpor u biljkama. Brojne studije pokazuju da različite skupine metabolita mogu igrati ulogu elicitora odn. nastajanje tzv. inducirane otpornosti u interakcijama *Trichoderme* s biljkama (Harmann et al., 2004.).

Gljivice roda *Trichoderma* su u stanju proizvoditi enzime i brojne sekundarne metabolite, uglavnom antibiotike, koji ih čine važnim mikroorganizmima sa stajališta ekologije, poljoprivrede i industrije.

Sekundarne komponente i antibiotici koje proizvodi *Trichoderma* spp. Od iznimne su važnosti u biološkoj kontroli ovoga antagonista (Vinale et al., 2008; Ajitha & Lakshmidevi, 2010). Sivasithamparam i Ghisalberti (1998.) ustanovili su kako *Trichoderma* spp. proizvodi nekoliko sekundarnih metabolita u koje spadaju antibakterijski i antifungalni antibiotici kao što su poliketidi, pironi i terpeni. Sekundarni metaboliti, uključujući metabolite, koji nisu direktno vezani uz rast biljke, razvitak ili reprodukciju su po kemijskom sastavu znatno razlikuju od prirodnih komponenti mogu imati značnu ulogu u simbiozi, transportu metala, razlikovanju i stimulaciji ili inhibiciji formiranja spora (Demain&Fang, 2000; Vinale et al., 2008.). Antibiotici su često povezivani sa biološkom kontrolom. *Paracelsin* je prvi sekundarni metabolit okarakteriziran kao antibiotik koji proizvodi *Trichoderma* spp. (Bruckner & Graf, 1983.; Bruckner et al., 1984.).

3.5. *Trichoderma* u biološkoj obnovi tla

Današnja istraživanja, kada je u pitanju biološka obnova, koja je potrebna uslijed trovanja tla kemijskim sredstvima su većinom provedena u kontroliranim uvjetima (laboratoriju), no sam koncept korištenja gljivica za bioobnovu je relativno stariji, tako je poznato kako *Trichoderma* spp. doprinosi razgradnji aromatičnih ugljikovodika (PAH), te utječe na brojne mikorizalne gljive, kako pozitivno, tako i negativno (Aguilar and Barea, 1997). U samoj biološkoj obnovi, kada je u pitanju tlo, osim same *Trichoderme* spp. pomažu i brojna detoksificirajuće tvari koje se mogu aplicirati skupa sa samom *Trichodermom* spp. Tako se održava kako zdravo tlo, tako i sam okoliš. *Trichoderma* spp. inokulirana u tlo može se razmnožavati veoma brzo zbog prirodne otpornosti na brojne toksične komponente, kao što su fungicide, herbicidi, insekticidi i fenolne komponente (Chet et al., 1997.). *Trichoderma* spp. također igra važnu ulogu u biološkoj obnovi tla "zatrovanog" uslijed godinama korištenih pesticida. Ona ima snažnu sposobnost u dekradaciji širokog spektra insekticida kao

što su: organokloridi, organofosfati i karbonati. Kao što je rečeno, efikasnost bioloških aktivnih tvari upitna je uslijed "zatrovanog" okoliša uslijed korištenja brojnih fungicida u poljoprivrednoj proizvodnji. Upravo zbog toga bilo je potrebno testirati otpornost same *Trichoderme* spp. na štetne tvari prisutne u okolišu, kako bi se ustvrdila efikasnost same gljivice. (Sawant and Mukhopadhay, 1990.; Pandey and Upadhyay, 1998.; Sharma et al., 1999.; Nallathambi et al., 2001.; Sushir and Pandey, 2001.; Bhatti and Sabalpara, 2001.; Patibanda et al., 2002.; Lal and Maharshi, 2007., Madhusudan et al., 2010.). *Trichoderma* spp. pokazala je bolju otpornost prema širem spektru fungicida nego brojni drugi mikroorganizmi te njena sposobnost razmnožavanja u zatrovanom okolišu nije ugrožena. (*Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment Rajesh R. Waghunde1*, Rahul M. Shelake2and Ambalal N. Sabalpara).

3.6. *Trichoderma* spp. kao bio-gorivo

Iz dana u dan svjedoci smo sve većeg zagađenja našeg planeta, planeta sa kojeg ne možemo, a svejedno ga tretiramo kao da nije naš, zemlje. Tako se iz dana u dan traže alternativni izvore energije kako bi se u što manjoj mjeri koristile otrovne supstance. Idealan supstitut za gorivo ovo nalazi se upravo u gljivici ovog roda, točnije u pripravku u koji se dodaje gljivica ovoga roda. Ovakva goriva se proizvode od poljoprivrednog otpada u koji se dodaje celulaza ili hemicelulaza proizvedena od strane benefitne gljivice *Trichoderma* spp., primjerice *Trichoderma reesei* (Schuster and Schmoll, 2010.). Za istraživače ovo predstavlja ozbiljan izazov jer je potrebno postići ekonomsku održivost uz visoku učinkovitost. Gljivice roda *Trichoderma* mogu se primjeniti i u suvremenom kultiviranom uzgoju u kojem je najveći naglasak stavljen na očuvanje okoliša. Počeci samih proizvoda kojih služe u biološkoj kontroli bazirani su na istraživanjima u kojima je došlo do otkrića zelenog fluorescentnog proteina s povećanom aktivnosti enzima hitinaze. (Kowsari et al., 2014). Gledamo li generalno o pozitivnim učincima ove gljivice, odnosno pripravaka čija je priprava bazirana upravo na gljivici ovoga roda ona je od iznimne vaznosti u zaštiti povrća kultura kao što su luk, mrkva, crvena repa, kopar, te rotkvica.

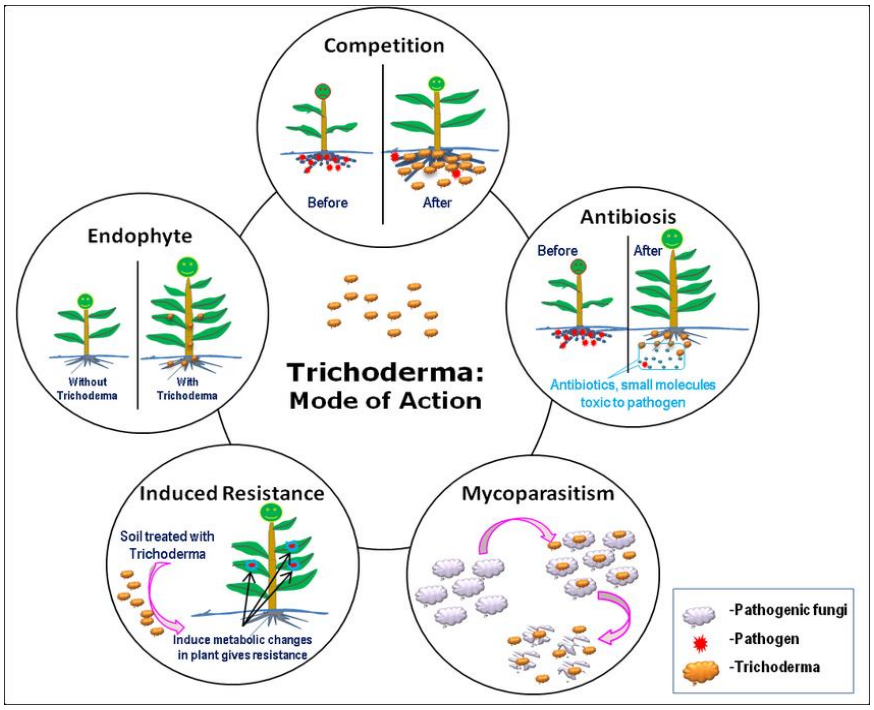
4. Komponente primjene pripravaka na bazi gljivice roda *Trichoderma*

Gljivice roda *Trichoderma* idealan su supstitut kemijskim sredstvima, no ne i jednako efikasni, barem iz razloga jer oni djeluju veoma polagano, no za razliku od kemijskih sredstava. One ne truju tlo, već svojom kolonizacijom u tlu obogaćuju isto. Da bi se postigao željeni efekt potrebno je prije svega zadovoljiti 3 važne komponente u procesu primjene pripravaka, a to su: subjekt u biološkoj kontroli, u ovom slučaju gljivica roda *Trichoderma* mora biti ili već prisutna u tlu i aktivna, ili proizvedena, te unešena u tlo naknadno (npr. Pripravak Trichodex.) Gljivice ovog roda bilo već prisutne ili unesene u tlo mehaničkim putem moraju bit spremne ući u kompeticiju i biti adaptivni u sredini u kojoj će djelovati kako bi opstale. Prema istraživanjima provedenima u Ženevi korištena je kombinacija fuzije protoplasta i korisnih derivata 2 soja. Fuzija protoplasta uvela je veliku genetičku raznolikost kada govorimo o potomstvu, no vrlo mal postotak je imao bolje karakteristike od divljih sojeva. Soj 1295 – 1222 (22. Potomstvo soja s fuzijom sojeva T12 i T95) imao je znatno bolje karakteristike u odnosu na prethodna istraživanja. No, razvoj prave biološke kontrole počeo je otkrićem soja koji je bio daleko efikasniji od svojih prethodnika. U istraživanju, korištena je gljivica bakterije *T. harzianum* soj 1295-22 i *T. virens* soj 41. Druga bitna komponenta je pronaći jeftino riješenje kada je riječ o subjektu u samoj biološkoj kontroli. Sam proces mora rezultirati biomasom čiji rok trajanja neće ovisiti o samim uvjetima skladištenja. Često je teže zadovoljiti potrebe proizvoda za primjenu u poljoprivredi no istih u farmaceutskoj industriji. Ukoliko želimo material koji će biti efikasan u poljoprivredi on mora biti vrlo povoljan, te rezultirati proizvodom koji neće imati posebne zahtjeve kada je u pitanju skladištenje. Sa *Trichodermom* spp. to je vrlo lako izvodivo. No najveća prepreka u proizvodnji ovakvih sredstava dakako je kako nedostatak tehnologije, tako i sredstva upućena za istraživanje o metodama proizvodnje bioloških organizama. Treća bitna stavka kod ovoga je ta da u ovom slučaju univerzalno riješenje ne postoji, te se svakoj kulturi mora pristupiti individualno vodeći računa kako o samoj kulturi tako i o tlu na kojem će ona biti uzgajana.

5. Mehanizmi djelovanja gljivice roda *Trichoderma*

Gljivice ovog roda izrazito su efikasne i korisne po gotovo svaku biljnu kulturu. One su sposobne na različite načine nadmetati se sa drugim stanovnicima tla kako bi biljci omogućili prije potrebne tvari za rast, razvoj i razmnožavanje. (Slika 7.) U narednom djelu rečeno je

nešto više upravo o načinima na kojima se ona nadmeće sa drugim stanovnicima tla za prijeko potrebne tvari biljci. Hiperparazitizam je samo jedan od načina na koji *Trichoderma* spp. uspjeva pobjediti patogena uslijed uništenja stanične stijenke istog. Za razliku od hiperparazitizma za antibiozu nije potrebno dovesti do smrti štetnika već se ona bazira na antagonističkom međudjelovanju Trihoderme i drugih patogena. Ona se temelji na stvaranju sekundarnih metabolita koji djeluju inhibitorno na parazitske gljivice. Osim ova dva procesa *Trichoderma* ima odličnu sposobnost kada je u pitanju vezivanje nutritivni hranjivih sastojaka iz tla, uslijed čega povremeno dolazi do smrta patogena jer mu je onemogućen dovoljan dotok nutritivnih sastojaka potrebnih za rast i razvoj. Direktna interakcija između Trichoderme i patogena naziva se mikoparazitizam te je to također jedan od načina djelovanja benefitne gljivice ovog roda.



Slika 7. Načini djelovanja gljivice roda *Trichoderma*; *Trichoderma*: significant fungus for agriculture and environment;

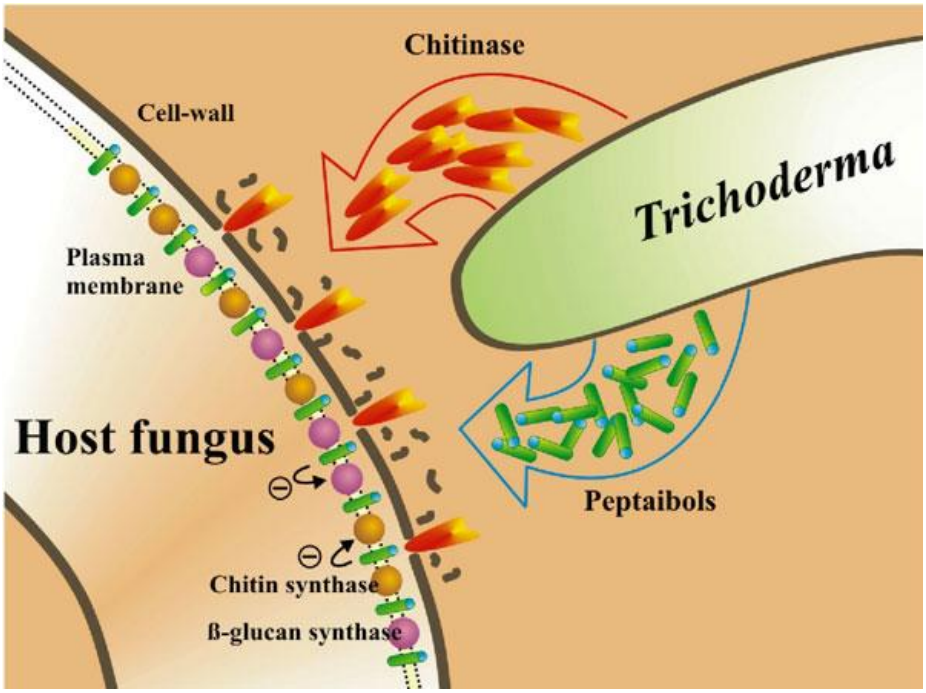
URL:https://www.researchgate.net/publication/303703234_*Trichoderma*_A_significant_fungus_for_agriculture_and_environment; (22.5.2017.)

5.1. Hiperparazitizam i antibioza

Gljivice roda *Trichoderma* su prisiljene natjecati se sa brojnim drugim organizmima za hranjive tvari i prostor. Mehanizmi kojima dolaze do hranjivih tvari uglavnom su

hiperparazitizam, kompeticija i antibioza, a organizmi sa kojima se ona nadmeće za kako hranjive tvari tako i prostor uglavnom su patogene gljivice, štetne po usjev.

Hiperparazitizam definira odnos antagonista i patogena. Da bi do toga došlo primarno je prepoznati patogen, te ga nakon toga i napasti. Napadanjem se postupno prodire u patogene stanice što dovode do smrti štetnika (Vinale et al., 2008.). U ovom procesu znatnu ulogu ima CWDE (eng. Cell Wall degrading Enzymes), odnosno litički sintetizirani enzimi od strane gljivice roda *Trichoderma* (Slika 8.), kako bi se olakšala degradacija stanične stijenke patogena izgrađene od hitina, glukana i polisaharida, te dovelo do smrti iste.



Slika 8. Prodiranje *Trichoderme* u stanicu domaćina uz pomoć sekundarnih metabolita koji joj pomažu u tome, Institute of chemical engineering;
URL: http://healthyhay.vt.tuwien.ac.at/division/project.php?project_id=6;U (22.5.2017.)

Osim hiperparazitizma važno je spomenuti i antibiozu, mehanizam antagonističkog međudjelovanja *Trichoderme* spp. i drugih patogena. Ona se temelji na stvaranju sekundarnih metabolita koji djeluju inhibitorno na parazitske gljivice.

Bioinokulantske gljivice, u ovom slučaju *Trichoderma* mogu vrlo lako ugušiti parazitske nematode kroz ovaj proces čime se jača imunosni sustav domaćina.

5.2. Nadmetanje za hranjive tvari

Nedostatak hranjivih tvari najčešći je uzrok ugibanja mikroorganizama prisutnih u tlu (Benitez et al., 2004.). Kompeticija za hranjive tvari način je na koji Trihoderma igra važnu ulogu u biološkoj kontroli (Harman, 2000). Ove gljivice luče nekoliko siderofora koje vežu željezu i zaustavljaju rast patogena. *Trichoderma* spp. ima odličnu sposobnost kada je u pitanju vezivanje nutritivni hranjivih sastojaka iz tla. Efikasnost dostupnih hranjivih tvari ovisi o mogućnosti *Trichoderme* spp. da u ATP pretvori brojne šećere koji su derivirani iz različitih polimera prisutnih u gljivičnom okruženju, primjerice: celuloza, glukan i hitin. Dodavanjem pripravka T35, koji je na bazi gljivice *T. harzianum* lako se može kontrolirati prisutnost *F. Oxysporum*, jer u tom slučaju dolazi do kompeticije za kolonizaciju rizosfere, te samih hranjivih tvari, a biološka kontrola je efektivnija što je koncentracija hranjivih tvari u tlu niža (Tjamos et al., 1992). *T. harzianum* poznata je i u borbi protiv patogene gljive *Botrytis cinerea,* ovdje dolazi do nadmetanja za hranjive tvari, a *Botrytis cinerea* je iznimno osjetljiva pri niskom udjelu hranjivih tvari, te u tom slučaju vrlo lako dolazi do ugibanja.

5.3. Biološka kontrola gljivice *Trichoderma* spp. mikoparazitizmom

Direktna interakcija između *Trichoderme* spp. i patogena naziva se mikoparazitizam. Opće je poznato da je *Trichoderma* spp. iznimno važna u biološkoj kontroli. Mikoparazitiram predstavlja niz mezanizama koji uključuju proizvodnju brojnih litičkih enzima važni za razgradnju stanične stijenke patogena. Chet et al. 1998.) je ovaj proces podjelio u 4 stavke, a to su: kemotrofizam i prepoznavanje, vezivanje i namotavanje, prozdiranje stanicne stijenke domaćina, te probavljanje stanice domaćina. U početku potrebno je detektirati drugu gljivicu, nakon čega se *Trichoderma* spp. nastanjuje tik do nje te počne proizvoditi litičke enzime koji su od iznimne važnje za razgradnju stanične stijenke patogena. Nakon toga svoje hife namotava oko domaćina, u ovom slučaju patogena, te prodire u stanicu domaćina uz pomoć litičkih enzima koji pogoduju razgradnji stanične stijenke patogena, što dovodi do smrti hife domaćina (patogena) (Steyaert et al., 2003.) Proizvodnja i regulacija litičkih enzima kao što su hitinaza, glukanaza i proteaza od ključne su važnosti u mikoparazitimu odnosno biološkoj kontroli (Mukherjee et al., 2008.). Najpoznatiji primjer mikoparazitizma je primjena *T. harzianum* u borbi protiv *R. solani*. *R. solani* je jedna od fitopatogena koji napada rajčicu koja se uzgaja u kontroliranim uvjetima.

5.4. Korištenje ekstrakata Trihoderme kao alternativa za korištenje živih mikroba

Korištenje antimikrobnih komponenti proizvedenih u biološkoj kontroli ima brojne prednosti naspram korištenja živih organizama u svim aspektima bilo kada je riječ industrijska proizvodnja, komercijalizacija ili sama aplikacija istih. *Trichoderma* spp. proizvodi velik broj litičkih enzima, a većina od njih ima antifungalno djelovanje. Proizvodnja enzima za razgradnju stanične stijenke može biti inducirana dodavanjem raznih izvora ugljika u medij za rast kao što su različiti šećeri, koloidni hitin, pročišćena stanična stijenka gljiva ili pak gljivična biomasa. Generalno, ovi enzimi su stabilni pri sobnoj temperaturi te imaju sličnu efikasnost kao komercijalni fungicide i zadržavaju svoju biološku aktivnost bilo da su aplicirani na biljku eksterno u kontroliranim uvjetima ili u proizvodnji u skladištenju nakon žetve. Kombinacija ovih gljivičnih enzima sa različitim klasama sintetičkih fungicida, najčešće azol i drugih afektivnih spojeva stanične membrane imaju jako djelovanje kada je u pitanju inhibitorno djelovanje na rast patogena. Korištenje enzima gljivice roda *Trichoderma* sposobnih za razgradnju stanične stijenke patogena imaju višestruko djelovanje i bitni su kada je u pitanju kontrola bolesti samih biljaka. U usporedi između hitinaze i glukanaze koje proizvodi *Trichoderma* i slični enzimi proizvedeni od strane biljaka pokazuju da gljivični litički enzimi su puno efikasniji u borbi protiv patogenih gljivica. Oni su sposobni degradirati ne samo "slabu" staničnu stijenku, već i jaku staničnu stijenku sastavljenu od hitin-glukan kompleksa te dormantne klamidospore i spore. Oni su također efikasni u borbi protiv razvoja bolesti i infektivnih patogena. Pročišćeni enzimi za degradaciju stanične stijenke koji potječu od različitih sojeva *Trichoderme* su efikasni u borbi protiv klijavosti spora i rasta micelija brojnih patogena kao što su rodovi: *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Ustilago*, *Venturia* i *Colletotrichum*. Ovi enzimi efikasni su i u organizmima koji su slični gljivicama kao što su *Oomycetes pythium* i *Phytophthora* koji ne sadrže hitin. Iako je preporučljivo, korištenje pročišćenih enzima nije nužno koristiti u kontroli bolesti biljaka. Moguće je koristiti i filtrate *Trichoderme* koji su proizvedeni u različiti kontroliranim uvjetima ili biljne proizvode za kontrolu patogena. Kao što je navedeno, antifungalno djelovanje enzima *Trichoderme* spp. za razgradnju stanične stijenke može biti poboljšano sinergističkim djelovanjem više kombinacija enzima sa različitim litičkim procesima. *Trichodermini* degradirajući stanični enzimi kombinirani sa metabolitima bakterija, kao što su lipo depsipeptidi koji su product bakterija roda *Pseudomonas*, sinergijski

djeluju antifungalno na različite biljne patogene. Antagonistička sposobnost *Enterobacter cloacae* protiv spora gljivica roda *Botrytis*, *Fusarium* i *Uncinula* povećana je kada se *Trichodermini* degradirajući stanični enzimi i metaboliti bakterijske kulture apliciraju na živu bakteriju.

6. Zaključak

Gljivice roda *Trichoderma* spp. posjeduju brojne kvalitete i imaju odličan potencijal za korištenje u poljoprivredi. One svojim djelovanjem mogu smanjiti djelovanje brojnih stresora na biljku. Prednost ove gljivice je što je za razliku od brojnih kemijskih sredstava zastupljenih u konvencionalnoj bezopasna. Ubrzo nakon apliciranja ima brzu sposobnost kolonizacije, a njene prednosti su višestruke.

Izuzetno je korisna u zaštiti usjeva od bolesti, jer neke od njih imaju sposobnost mjenjanja genetskog materijala tako da biljka postaje otpornija. Osim ovoga, dokazano je kako je riječ o gljivici koja djeluje kao promotor rasta posebice uz pomoć 6-PAP-a. Sekundarni metaboliti *Trichoderme* spp. posjeduju brojne prednosti, a to su: stvaraju induciranu otpornost biljke ka određenim patogenima, izuzetno su efikasni u kontroli korova, a neke čak imaju sposobnost izmjene genetskog materijala. Enzimi *Trichoderme* spp. iznimno su efikasni u razgradnji stanične stijenke štetnika koji napada određene kulture što dovodi do ugibanja štetnika.

Uslijed korištenja kemijskih sredstava u konvencionalnoj poljoprivredi dolazi do ozbiljnog narušavanja biodiverziteta u tlu. Kao posljedica, sve je teže uspostaviti organsku proizvodnju dok god se u tlu nalaze štetne rezidue i teški metali, odn. produkata nakupljanja nastalog dugogodišnjim korištenjem sredstava za suzbijanje štetnika i zaštitu od bolesti biljaka. Gljivice *Trichoderma* spp. imaju sposobnost ponovnog uspostavljanja ravnoteže u tlu, te tako "resetiraju" tlo na početno stanje prije korištenja kemikalija. Brojni su načini borbe ove gljivice za hranjive tvari koje omogućuje biljci i jedno je sigurno a to je da je riječ o gljivici koja bi trebala biti neizostavna u uzgoju svake kulture. Njene prednosti su višestruke, a glavna je ta, da je potpuno bezopasna kako za čovjeka tako i za okoliš.

Popis literature:

1. Parađiković, N., Ćosić, J., Baličević, R., Vinković, T., Vrandečić, K., Ravlić, K. (2012.): Utjecaj kemijskih i bioloških mjera na rast i razvoj presadnica paprike i suzbijanje fitopatogenih gljiva *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani.* Glasnik zaštite bilja, 3:50-55.
2. Błaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., Jędryczka, M. (2014.): *Trichoderma* spp. – Application and prospets for use in organic farming and industry. J. Plant, Protect, Research, 54:309-314.
3. Schuster, A., Schmoll, M. (2010.): Biology and biotechnology of *Trichoderma.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 87:787-799.
4. Monte, E., Llobell, A. (2003.): *Trichoderma* in organic agriculture. Proceedings V World Avocado Congress, 725-733.
5. Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., Hossain, K. (2014.): *Trichoderma* spp.: A biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. Pak. J. Bot., 46:1489-1493.
6. Vurro, M., Gressel, J. (Eds.) (2007.): Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. Springer Press, Amsterdam, Netherlands.
7. Harman, G. E. (1997.): *Trichoderma* for biocontrol of plant pathogens: From basic research to commercialized products. Biocontrol conference page
8. Heromsa, R., Viterbo, A., Chet, I. Monte, E.: Plant (2012.) – beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158:17-25
9. Elad, Y., Chet, I., Katan, J. (1980.): *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani.* Phytopathology, 70:119-121.
10. Mukherjee, P. K., Nautiyal, C. S., Mukhopadhyay, A. N. (2008.): Molecular mechanisms of biocontrol by *Trichoderma* spp. Soil biology, 15:243-262.
11. Kumar S., Thakur M., Rani A. (2014.): *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. African J. Agricultural Res., 9:3838-3852.

12. Rifai, M. A. (1969.): A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Pap., 116:1-56.

13. Papavizas, G. C. (1985.): *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol., 23:23-54.

14. Błaszczyk L., Strakowska, J., Chełkowski J., Gąbka-Buszek A., Kaczmarek J. (2016.): *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. J. Appl. Genet., 57: 397-407.

15. Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A., Pozo M. J. (2013.): Deciphering the hormonal signalling network behing the systemic resistance induced by *Trichoderma* harzianum in tomato. Front. Plant. Sci., 4:206.

16. Waghunde, R., Madadev Shelake, R., Sabalpara N., Ambalal (2016.): *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. African journal of agricultural research, 11:1952-1965.

17. Gams, W., Bissett, J. (2015.): Morphology and identification of *Trichoderma.* Pest management in horticultural ecosystems, 21:194-202.

18. Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L.: Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Glicoladium*

19. Harman, G. E.; Nash, G. T., Nelson, E. B. (1988.): Enhancement of *Trichoderma* induced biological control of pythium seed rot and pre-emergence damping – off peas. Soil boil. Biochem., 20, 145-150.

20. Bellows, Thomas S., Fisher, T. W., Caltagirone, L. E., Dahisten, D.L., Gordh, G., Huffaker, C.B. (1999.): Handbook of Biological Control: Principles and Applications of Biological Control. Academic Press, University of California

21. Walters, D. (Ed.) (2009.): Disease control in crops: Biological and environmentally – friendly approaches. Wiley-Blackwell, Chichester, U.K.

Popis slika:

Slika 1.

Naziv**:** *Trichoderma Reesei;*

Izvor: http://www.ifpenergiesnouvelles.com/Expertise/Research-divisions/Applied-Chemistry-and-Physical-Chemistry/Microorganisms-change-their-diet; (22.5.2017.)

Stranica: 4

Slika 2.

Naziv: *Trichoderma* u interakciji sa mikroorganizmima;

Izvor: http://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(11)00192-2; (22.5.2017.)

Stranica: 5

Slika 3.

Naziv: Biofungicid Trichodex;

Izvor: http://www.agribio.it/trichodex.htm (22.5.2017.)

Stranica: 7

Slika 4.

Korijen graška zaražen nematodom *Meloidogyne incognita;*
Izvor*:* http://www.alamy.com/stock-photo-pea-roots-with-galls-caused-by-root-knot-nematode-meloidogyne-hapla-7913255.html (22.5.2017.)

Stranica: 10

Slika 5.

Naziv: 6-PAP;

Izvor: http://www.pherobase.com/database/compound/compounds-detail-6-pentyl-2-pyrone.php; (22.5.2017.)

Stranica: 11

Slika 6.

Naziv**:** Model koji prikazuje induciranu otpornost *Trichoderme* protiv *Botrytis cinerea* u rajčici;

Izvor: http://www.researchgate.net/figure/242334471_fig5_Model-for-*Trichoderma*-induced-resistance-TISR-against-Botrytis-cinerea-in-tomato-Root; (22.5.2017.)

Stranica: 13

Slika 7.

Naziv: Načini djelovanja gljivice roda *Trichoderma*; *Trichoderma*: significant fungus for agriculture and environment,

Izvor:https://www.researchgate.net/publication/303703234_*Trichoderma*_A_significant_fungus_for_agriculture_and_environment; (22.5.2017.)

Stranica: 18

Slika 8.

Naziv: Prodiranje *Trichoderme* u stanicu domaćina uz pomoć sekundarnih metabolita koji joj pomažu u tome, Institute of chemical engineering;

Izvor: http://healthyhay.vt.tuwien.ac.at/division/project.php?project_id=6; (22.5.2017.)

Stranica: 19

Sažetak

Gljivice roda *Trichoderma* sveprisutne su u tlu. Za razliku od brojnih kemijskih sredstava što se koriste u poljoprivredi za zaštitu od štetnika, promociju rasta biljaka ili nečeg drugog ove gljivice su u potpunosti bezopasne kako za okoliš tako i za čovjeka. Kroz godine korištenja kemijskih sredstava u konvencionalnoj poljoprivredi došlo je do ozbiljnog zagađenja okoliša i trovanja tla, a gljivice roda *Trichoderma* svojom brzom kolonizacijom u tlu pomažu ponovnom uspostavljanju ravnoteže u tlu u kojem je biodiverzitet ozbiljno narušen. Njezini enzimi i sekundarni metaboliti imaju sposobnost razgradnje stanične stijenke patogena koja dovodi do smrti istog, te time djeluje preventivno u sprečavanju napada određene kulture. Ovo je samo jedan od načina kako djeluju gljivice ovog roda, one imaju također i sposobnost nadmetanja za hranjive tvari procesima kao što su mikoparazitizam, hiperparazitizam, antibioza i slično.

Summary

Different strains of *Trichoderma fungi* are found in all kinds of soil. Difference between them and chemicals that are used in conventional agriculture for prevention of pathogens, growth promotion or else is that these are completely safe for humans and the environment. Throughout the years of using chemicals in conventional agriculture, our environment became much more poisoned and field thogh, but different strains of fungi *Trichoderma* are colonizing very fast and thus helping to establish balance in the environment that is needed because of disrupted biodiversity. Their enzymes and secondary metabolites are able to degradate cell wall of pathogen and cause death of pathogen, preventing the attack of pathogen on some plants. This is just one of many ways in which they act. They alse have the ability to compete for nutrients, air and water, through the processes such as micoparasytism, hiperparasytism, antibiosis or else.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku **Diplomski rad**
Sveučilišni diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Primjena benefitne gljive *Trichoderma* spp.
u biološkoj kontroli poljoprivrednih kultura

Borna Čačić

Sažetak: Gljivice roda *Trichoderma* sveprisutne su u tlu. Za razliku od brojnih kemijskih sredstava što se koriste u poljoprivredi za zaštitu od štetnika, promociju rasta biljaka ili nečeg drugog ove gljivice su u potpunosti bezopasne kako za okoliš tako i za čovjeka. Kroz godine korištenja kemijskih sredstava u konvencionalnoj poljoprivredi došlo je do ozbiljnog zagađenja okoliša i trovanja tla, a gljivice roda *Trichoderma* svojom brzom kolonizacijom u tlu pomažu ponovnom uspostavljanju ravnoteže u tlu u kojem je biodiverzitet ozbiljno narušen. Njezini enzimi i sekundarni metaboliti imaju sposobnost razgradnje stanične stijenke patogena koja dovodi do smrti istog, te time djeluje preventivno u sprečavanju napada određene kulture. Ovo je samo jedan od načina kako djeluju gljivice ovog roda, one imaju također i sposobnost nadmetanja za hranjive tvari procesima kao što su mikoparazitizam, hiperparazitizam, antibioza i slično.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: prof. Dr.sc. Suzana Kristek
Broj stranica: 31
Broj grafikona i slika: 8
Broj tablica: 0
Broj literaturnih navoda: 21
Ključne riječi: bakterije, gljivice, *Trichoderma*, biološka kontrola

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc. dr. sc. Sanda Rašić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Renata Baličević, član
4. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, V. Preloga .

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Agriculture in Osijek **Graduate thesis**
University Graduate Studies, course: organic agriculture

Use of benefit fungi *Trichoderma* spp.
In biological protection of agricultural crops

Borna Čačić

Summary: Different strains of *Trichoderma* fungi are found in all kinds of field. Difference between them and chemicals that are used in conventional agriculture for prevention of pathogens, growth promotion or else is that these are completely safe for humans and the environment. Throughout the years of using chemicals in conventional agriculture, our environment became much more poisoned and field thogh, but different strains of fungi *Trichoderma* are colonizing very fast and thus helping to establish balance in the environment that is needed because of disrupted biodiversity. Their enzymes and secondary metabolites are able to degradate cell wall of pathogen and cause death of pathogen, preventing the attack of pathogen on some plants. This is just one of many ways in which they act. They alse have the ability to compete for nutrients, air and water, through the processes such as micoparasytism, hiperparasytism, antibiosis or else.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: prof. dr.sc. Suzana Kristek
Number of pages: 31
Number of figures: 8
Number of tables: 0
Number of references: 21
Keywords: bacteria, *Trichoderma*, biological protection, fungi

Thesis defended on date:

Reviewers:
1. Doc. dr. sc. Sanda Rašić, assistant professor - president
2. Prof. dr. sc. Suzana Kristek, full professor - mentor
3. Izv. prof. dr. sc. Renata Baličević, associate professor - member
4. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, associate professor - substitute member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, V. Preloga 1.