

Utjecaj celomske tekućine gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*) na rast tri vrste fitopatogenih gljiva

Kujavec, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:130720>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Martina Kujavec

**Utjecaj celomske tekućine gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*) na rast tri vrste fitopatogenih
gljiva**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku****Odjel za biologiju****Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Biologija****Diplomski rad**

**Utjecaj celomske tekućine gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*)
na rast tri vrste fitopatogenih gljiva**

Martina Kujavec

Rad je izrađen na: Odjel za biologiju, Osijek**Mentor:** Dr.sc. Mirna Velki, doc.**Komentor:** Dr.sc. Sandra Ečimović, doc.**Kratak sadržaj diplomskog rada:**

Celomociti su stanice koje se nalaze u celomskoj tekućini gujavica, a jedna od glavnih funkcija im je zaštita organizma od patogena. Fitopatogene gljive uzrokuju bolesti usjeva vrlo bitnih za poljoprivredu te velike ekonomske štete. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti ima li celomska tekućina tri različite vrste gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*) inhibitorni utjecaj na rast tri vrste fitopatogenih gljiva (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* i *Sclerotinia sclerotiorum*). Pored toga, jedan od ciljeva bio je utvrditi koji ekstrakt celomske tekućine ima najveći inhibitorni utjecaj na rast fitopatogenih gljiva. Rezultati pokazuju da celomska tekućina sve tri gujavice ima inhibitorni utjecaj na rast sve tri fitopatogene gljive. Najveći inhibitorni utjecaj postigao je ekstrakt gujavice *E. andrei* na rast gljive *R. solani*.

Broj stranica: 41**Broj slika:** 20**Broj tablica:** 0**Broj literaturnih navoda:** 72**Jezik izvornika:** hrvatski jezik**Ključne riječi:** celomska tekućina, gujavice, fitopatogene gljive, inhibicija rasta**Datum obrane:** 11. travnja 2019. godine**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr. sc. Zorana Katanić, doc., predsjednik
2. Dr. sc. Mirna Velki, doc., član
3. Dr. sc. Rosemary Vuković, doc., član
4. Dr. sc. Senka Blažetić, doc., zamjena člana.

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD**University Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Master thesis****Department of Biology****Graduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural science**Scientific Field:** Biology

**Effect of earthworm coelomic fluid (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*)
on growth of three phytopatogenic fungi species**

Martina Kujavec

Thesis performed at: Department of Biology**Supervisor:** Mirna Velki, PhD, Assistant Professor**Cosupervisor:** Sandra Ečimović, PhD, Assistant Professor**Short abstract:**

Coelomocytes are cells present in the coelomic fluid of earthworms and one of the main aspects of their function is the protection against pathogens. Phytopathogenic fungi are responsible for crop disease and cause great economic damages. The aim of this study is to determine if the coelomic fluid extract of three different earthworm species (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* and *Allolobophora chlorotica*) has an inhibitory effect on the growth of three different species of phytopathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotinia sclerotiorum*). Additionally, the aim is to determine which coelomic fluid extract has the biggest inhibitory effect on the growth of phytopathogenic fungi. The results showed that all three earthworm species had inhibitory effect on the growth of three phytopathogenic fungi. The greatest inhibitory effect was achieved with the *E. andrei* coelomic fluid extract on the growth of *R. solani* fungi.

Number of pages: 41**Number of figures:** 20**Number of tables:** 0**Number of references:** 72**Original in:** Croatian**Key words:** coelomic fluid, earthworms, phytopathogenic fungi, growth inhibition**Date of the thesis defence:** 11th April 2019**Reviewers:**

1. Zorana Katanić, PhD, assistant professor, chair
2. Mirna Velki, PhD, assistant professor, member
3. Rosemary Vuković, PhD, assistant professor, member
4. Senka Blažetić, PhD, assistant professor, member.

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Zahvaljujem se, prvenstveno mentorici doc. dr. sc. Mirni Velki za svo strpljenje, stručnu pomoć i preneseno znanje tijekom izrade i pisanja diplomskog rada, za sve savjete, veliko hvala!

Također, zahvaljujem se komentorici doc. dr. sc. Sandri Ečimović za svu pomoć tijekom izrade rada.

Posebnu zahvalu upućujem prof. dr. sc. Karolini Vrandečić i gospođi Rajki Latković sa Zavoda za zaštitu bilja, Fakulteta za agrobiotehničke znanosti u Osijeku. Hvala za svu pomoć i savjete tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su mi uveseljavali studentske dane i zbog kojih je sve bilo lakše.

Na kraju, mojoj obitelji koja mi je sve omogućila, veliko hvala za vašu neizmjernu podršku!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Gujavice	1
1.2. Celomociti.....	2
1.3. Fitopatogene gljive.....	5
1.3.1. <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> i <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	5
1.4. Interakcije gujavica i gljiva.....	7
1.5. Cilj rada.....	8
2. MATERIJALI I METODE	9
2.1. Eksperimentalni organizmi	9
2.1.1. Gujavice	9
2.1.2. Gljive.....	11
2.2. Priprema fiziološke otopine i gujavica za ekstrakciju celomocita	11
2.3. Priprema ekstrakta celomocita i određivanje koncentracije celomocita	12
2.3.1. Priprema ekstrakta celomocita.....	12
2.3.2. Određivanje koncentracije celomocita.....	13
2.4. Tretiranje gljiva i mjerenje promjera micelija	14
2.5. Statistička obrada podataka.....	15
3. REZULTATI.....	16
3.1. Rezultati mjerenja promjera micelija vrste <i>M. phaseolina</i> tretirane ekstraktima celomske tekućine različitih gujavica – <i>E. andrei</i> , <i>D. veneta</i> i <i>A. chlorotica</i>	16
3.2. Rezultati mjerenja promjera micelija vrste <i>R. solani</i> tretirane ekstraktima celomocita različitih gujavica – <i>E. andrei</i> , <i>D. veneta</i> i <i>A. chlorotica</i>	18
3.3. Rezultati mjerenja promjera micelija vrste <i>S. sclerotiorum</i> tretirane ekstraktima celomske tekućine različitih gujavica – <i>E. andrei</i> , <i>D. veneta</i> i <i>A. chlorotica</i>	21

3.4. Postotci inhibicije rasta micelija	24
4. RASPRAVA	29
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33

1. UVOD

1.1. Gujavice

Gujavice pripadaju koljenu kolutićavci (Annelida), razredu pojasnici (Clitellata) te podrazredu maločetinaši (Oligochaeta). Bilateralno su simetrične životinje, a karakterizira ih specifična segmentiranost tijela gdje se u svakom kolutiću ponavljaju anatomske značajke prethodnog kolutića. Izvana tijelo obavija tanka pigmentirana epiderma. Na svakom kolutiću, izuzev prva dva (prostomij i peristomij), nalaze se četiri snopa četina koje životinji pomažu pri kretanju zajedno sa vanjskim slojem prstenastih te unutarnjim slojem longitudinalnih mišića. Gujavice su dvospolci, oplodnja se događa obostrano te se iz pojasa (eng. *clitellum*) izlučuje kokon u kojem se razvija zametak i to bez ličinačkog stadija. Prisutnost dobro razvijenog pojasa signalizira spolnu zrelost jedinke. Sljedeća vrlo važna osobina gujavica je celomska šupljina. Celomska šupljina ima kolutićavi raspored, a ispunjena je celomskom tekućinom kojoj je jedna od funkcija potporna funkcija hidroskeleta. Segmenti celomske šupljine međusobno su povezani transverzalnim septama, a svaki segment šupljine sadrži par nefridija i dorzalnu poru tj. celomoporu koja ga povezuje sa vanjskom okolinom. Mnoge gujavice izbacuju celomsku tekućinu kroz celomopore na tijelu, kao odgovor na mehanički ili kemijski podražaj. Izbacivanje se također odvija i u stresnim uvjetima, a ima mnogo funkcija, te su neke od njih zaštita od predatora, sprječavanje isušivanja ili poticanje disanja kroz kožu (Habdija i sur., 2011; Bilej i sur., 2010; Dominguez, 2004; Edwards i Bohlen, 1996).

Po klasifikaciji gujavica prema Bouche-u (1977, 1972), kako je navedeno u Chatelain i Mathieu (2017), klasificirane su u tri funkcionalne skupine ili tri ekotipa. Prve su epigejne gujavice kojima pripadaju *Eisenia andrei* i *Dendrobaena veneta*. Dorzalno su pigmentirane gujavice koje žive na površini tla, u organskom horizontu te se hrane organskom tvari. Zatim endogejne vrste gujavica, kojima pripada *Allolobophora chlorotica*. Endogejne vrste se hrane i žive u tlu te tvore horizontalne tunele, slabo su pigmentirane te im je potrebno više vremena kako bi dosegle maksimalnu veličinu i masu tijela. Treća skupina su anecične vrste poput *Lumbricus terrestris*. Anecične vrste grade vertikalne tunele u kojima žive, a hrane se na površini tla te organski materijal odvlače u svoje vertikalne tunele. Vrlo su važne jer modificiraju dostupnost resursa za ostale organizme u tlu odvlačeći organski materijal dublje u tlo gdje utječu na kemijske i fizičke

promjene tla. Imaju sporu reproduktivnu brzinu te su najveće od navedena tri tipa (Blouin i sur., 2013; Dominguez i Edwards, 2011; Dominguez 2004).

Gujavice su iznimno važni organizmi za uspješno funkcioniranje ekoloških sustava tla. Imaju velik broj povoljnih utjecaja na tlo kao što je kopanje tunela kojim utječu na agregaciju tla, na mikro i makro pore u tlu koje pak posljedično utječu na aeraciju tla, regulaciju vode u tlu te u konačnici redukciju aneksije tla (Blouin i sur., 2013). Gujavice su važne i za pedogenezu i razvoj profila nekog tla zbog trofičkih razloga. Naime gujavice imaju mogućnost probaviti i do 30 puta veću količinu organske tvari nego što je njihova masa tijela. Utječu na kemijski sastav tla, razgradnjom organske tvari i mineralizacijom iste, te proizvodnjom humusa obogaćuju tlo nutrijentima, uglavnom dušikom, koji tada biljke koriste za rast što su mnoga istraživanja i dokazala (Postma-Blaauw i sur., 2006; Cortez i Hameed, 2001; Blair i sur., 1997). Van Groenigen i sur. (2014) navode da gujavice utječu na povećanje prinosa usjeva čak i do 25%, misli se upravo zbog oslobađanja dušika iz organske tvari.

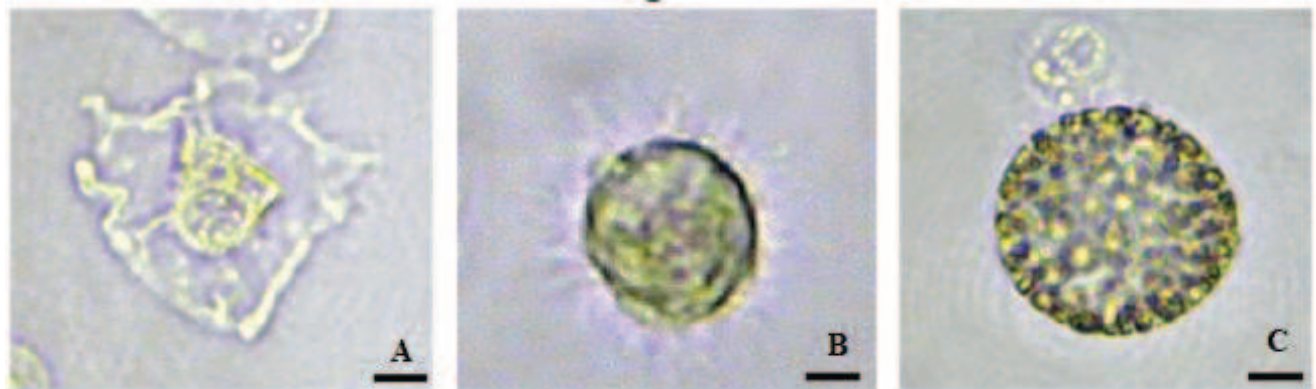
Gujavice također utječu i direktno na organizme nekog ekosustava, ulazeći u simbiozne interakcije s mikroorganizmima tla, gljivama i bakterijama, te funkcioniraju kao domaćini, ali i prijenosnici mikroorganizama (Fusaro i sur., 2018). Zbog njihove djelatnosti u tlu, utjecaja na aktivnost drugih organizama te promjena kemijskih, fizičkih i mikrobioloških svojstava tla, gujavice se naziva inženjerima ekosustava (Bartlett i sur., 2010). Gujavice imaju visoke stope metabolizma i reprodukcije pomoću kojih su lako prilagodljive okolišnim uvjetima površine tla (Dominguez, 2004).

1.2. Celomociti

Gujavice su protostomne životinje i imaju pravu celomsku šupljinu koja je, kao što je već navedeno, ispunjena celomskom tekućinom. U celomskoj tekućini nalaze se slobodne stanice – celomociti. Celomociti potječu iz mezenhimalnog dijela celomske šupljine. Razlikujemo dvije subpopulacije celomocita, a to su eleociti i amebociti. Celomska šupljina nije sterilna i uvijek sadrži gljive, bakterije i protozoe iz vanjske okoline, sadržava oko 6×10^5 bakterija po mL (Engelmann i sur., 2016; Bilej i sur., 2010).

Prema Bilej i sur (2010) celomociti se dijele u tri skupine. Eleocite, hijaline amebocite i granularne amebocite (Slika 1). Eleociti su slobodne kloragogene stanice, derivirane su od kloragogenog tkiva koje oblaže stijenke crijeva, a imaju nutritivnu i pomagačku funkciju te

sudjeluju u održavanju pH celomske tekućine (Homa, 2018). Eleociti, ili kako autori Opper i sur., (2013) navode kloragociti, mogu se podijeliti u dvije skupine stanica, a to su periferni kloragociti/eleociti koji se nalaze na stijenci crijeva i centralni kloragociti/eleociti na tiflozolisu. Amebociti su stanice derivirane iz mezotelijalne stijenke celoma (Plytycz i sur., 2009), imaju obrambenu funkciju te predstavljaju efektorne imunocite. Amebociti su uključeni u citotoksičnost, fagocitozu i proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinki (ROS-a), kao što je proizvodnja katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze (Homa, 2018).



Slika 1. Prikaz celomocita (A – hijalini amebocit, B – granularni amebocit i C – eleocit) gujavice *Allobophora chlorotica* (preuzeto i modificirano prema Kurek i sur., 2007).

Celomociti sudjeluju u obrambenim mehanizmima usmjerenima protiv bakterija, parazita te stranih tijela. Sudjeluju u fagocitozi, upalnom procesu, enkapsulizaciji te sintezi i sekreciji humoralnih faktora (Tahseen, 2009). Dok amebociti imaju sposobnost fagocitacitoze eleocitni celomociti nemaju tu mogućnost nego imaju metaboličku funkciju kao i funkciju stvaranja bioaktivnih molekula te humoralnih faktora kao što su aglutinini i opsonini (Homa, 2018; Mácsik i sur., 2015). Eleociti sadrže riboflavin koji ima antioksidativnu aktivnost te također potiče komponente imunskog sustava gujavica (Plytycz i sur., 2009). Amebociti mogu i enkapsulirati razne mikroorganizme koji su preveliki da bi se fagocitirali, kao što su nematodni paraziti, tada se stvara „smeđe tijelo“, ono se stvara zbog melanina, koji se stvara kao posljedica propfenoloksidazne kaskade (eng. *prophenoloxidase cascade*). Profenoloksidazna kaskada je niz reakcija u kojima se stvaraju intermedijeri koji u konačnici tvore produkte – kao što je melanin koji će enkapsularizirati patogen. „Smeđe tijelo“ se kasnije izbacuje kroz celomopore u okolinu ili

se uklanja djelovanjem autonomije (Homa, 2018; Engelmann i sur., 2016; Bilej i sur., 2010). U istraživanju Olchawa i sur. (2003), kako je navedeno u Santocki i sur. (2016), celomociti koji su eksperimentalno ekstrahirani iz *D. veneta* obnavljaju se za 4 tjedna te je taj proces prema autorima temperaturno ovisan. Poput leukocitnih stanica kralježnjaka, celomociti gujavica mogu stvarati ekstracelularne zamke (eng. *extracellular trap*) slične neutrofilnim ekstracelularnim zamkama.

Urođeni imunitet kod gujavica održavaju celomociti te imunološki aktivne molekule u celomskoj tekućini kao što su fetidin, lizenin (eng. *lysenin*), lumbricin 1, celomski citolitički faktor i dr. Fetidin ili EFAF (*Eisenia foetida andrei* faktor) je hemolitički protein koji se sastoji od dva glikoproteina, jednog od 45-kDa i drugog od 40-kDa. Luče ga kloragociti i eleociti. EFAF sudjeluje u citotoksičnoj aktivnosti celomske tekućine, ima bakteriolitičke sposobnosti te također je posrednik opsonina te sudjeluje u zgrušavanju celomske tekućine (Bilej sur., 2010; Engelmann, 2004a).

Lizenin je protein molekularne težine 41-kDa izoliran iz celomske tekućine gujavica, proizvode ga kloragociti, a ekspresija mu je modulirana prisutnošću Gram- pozitivnih bakterija (Homa, 2018; Sekizawa i sur., 1996). Lizenin je toksin koji može tvoriti pore u plazma membrani, ima antimikrobnu aktivnost te se može vezati za nano-čestice te tako poboljšati njihovu fagocitozu celomocitima. Otkriveno je također da se lizenin veže za sfingomijelinske komponente na membranama (Mácsik i sur., 2015). Lizenin i fetidin pripadaju istoj multimolekularnoj proteinskoj obitelji, homologni su te su im sekvence aminokiselina vrlo slične. Oba proteina imaju hemolitičku aktivnost koja ovisi o prisutnosti sfingolipida što je povezano sa vezanjem lizenina za sfingomijelin (Opper i sur., 2013 Bruhn i sur., 2006).

Celomski citolitički faktor ili CCF-1 ima ulogu u prepoznavanju faktora i njihovoj imobilizaciji te se nalazi u stanicama perifernih kloragocita (Homa, 2018). CCF-1 je zaštitna molekula za prepoznavanje urođene imunosti kod gujavica, homologna TNF-alfa (eng. *Tumor necrosis factor alpha*) kod sisavaca. Nakon prepoznavanja dolazi do pokretanja profenoloksidazne kaskade i stvaranja melanina za enkapsulaciju većih parazita (Field i sur., 2004). Lumbricin 1, prvotno pronađen u *Lumbricus rubelus*, prolinom je bogat peptid koji ima sekvencu od 62 amino kiseline. Ima antimikrobnu aktivnost protiv bakterija i gljivica, ali ne i hemolitičku aktivnost (Cho i sur., 1998). Izolirano je nekoliko antimikrobnih peptida (AMP) sličnih lumbricinu, od kojih PP-1 ima 76%-tnu homologiju sekvence aminokiselina s lumbricinom 1. AMP vjerojatno imaju ulogu u održavanju imunološke homeostaze (Bodó i sur., 2019; Wang i sur., 2003). U celomocitima su

također pronađene i obrambene molekule kao što su SOD i citokine molekule (TNF-alfa i TGF-alfa) (Engelmann i sur., 2004a).

1.3. Fitopatogene gljive

Fitopatogene gljive uzrokuju bolesti biljaka, uglavnom poljoprivredno važnih usjeva te tako smanjuju kvalitetu i kvantitetu usjeva. Fitopatogene gljive uglavnom pripadaju koljenu Ascomycota i Basidiomycota. Spore gljiva rasprostranjuju se vjetrom, vodom ili vektorima. Nakon prijenosa spore na biljku, u povoljnim uvjetima započinje germinacija spore. Nakon germinacije razvijaju se hife koje rastu po površini biljke (Doehleman i sur., 2017). Fitopatogene gljive imaju različite strategije zaraze domaćina. Neke gljive sudjeluju u razgradnji kutikule i stanične stijenke, a neke pak imaju specijalizirane hifalne strukture (apressori) kojima probijaju epidemu te tako ulaze u biljku. Ostale strategije uzrokuju zarazu kroz rane na epidermi ili otvore na tkivu biljke, kao što su npr. puči. Nakon kolonizacije biljke neke gljive žive i kao biotropi, tada uzimaju hranu i nutrijente od domaćina i pri tome ne uništavaju stanice domaćina. Druge žive kao nekrotropi te takve vrste ubijaju svoje domaćine toksinima. Također neke gljive su prvo biotropi, a kasnije postaju nektotropi i njih se naziva hemibiotrofnim patogenima (Idnurm i Howlett, 2001).

Zbog sve veće potrebe za povećanjem poljoprivrednih prinosa, potreba je i za suzbijanjem i kontroliranjem zaraza koje šire fitopatogene gljive. Kemijska kontrola gljivičnih zaraza fungicidima sve češće se zamjenjuje alternativnim metodama (Chet i Inbar, 1994). Prema Eilenberg (2006) koncept biološke kontrole se temelji na upotrebi živih organizama s ciljem suzbijanja nekog patogena. Prema brojnim istraživanjima bakterije, koje proizvode antifungalne tvari, poput bakterija iz roda *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Trichoderma*, koriste se kao način biološke kontrole protiv gljivičnih oboljenja biljaka (Huang i sur., 2012; Yu i sur., 2002; Pal i sur., 2001).

1.3.1. *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* i *Sclerotinia sclerotiorum*

Rhizoctonia solani

Fitopatogena je gljiva koja pripada koljenu Basidiomycota, razredu Agariomycetes, a porodici Ceratobasidiaceae. Dvije osnovne osobine roda *Rhizoctonia* su proizvodnja sklerocija, različitih od sklerocija koje proizvodi rod *Sclerotium*, te udruženje micelija gljive sa korijenom

biljke domaćina (Ajayi-Oyetunde i Bradley, 2018). U tlu se nalazi u obliku sklerocija te ne stvara aseksualne spore (Huang i sur., 2012). Nanosi velike ekonomske štete sadnicama, sveprisutna je pa se pojavljuje kod kultiviranih, ali i nekultiviranih staništa i to u gotovo svim dijelovima svijeta. *R. solani* zaražava trave (Poacea), mahunarke (Fabaceae) i pomoćnice (Solanaceae). Ekonomske štete uzrokuje i zarazom različitih kultiviranih travnjaka kao što su golf tereni i nogometna igrališta, gdje uzrokuje truljenje dijelova travnjaka (Martin, 1987). Simptomi na domaćinima uključuju truljenje sjemena, korijena i hipokotila, trulež sadnica, lezije na listovima te crne lezije na korijenu i sjemenu (Ajayi-Oyetunde i Bradley, 2018; García i sur., 2006). Saprofitna aktivnost, dugotrajnost sklerocija te širok spektar domaćina čine bolesti koje uzrokuje *R. solani* vrlo dugotrajnima i raširenim (Ersahin i sur., 2009).

Macrophomina phaseolina

Također je fitopatogena gljiva koja pripada koljenu Ascomycota, razredu Dothideomycetes, a redu Botryosphaerales (Web1). Uzrokuje zarazu više od 500 biljnih porodica jednosupnica i dvosupnica uzrokujući bolesti truleža stabljike i bolest ugljenaste truleži na soji, suncokretu, kukuruzu i pamuku gdje stvara sklerocije na odumrlom tkivu što daje ugljenast izgled (Kaur i sur., 2012, Ashraf i Javaid, 2007, Su i sur., 2001). Može kolonizirati živo i mrtvo tkivo, invaziju joj omogućuju enzimi, endoglukani koji degradiraju stanične stijenke. Fitotoksini koje proizvodi utječu na geminaciju sjemena te surpresiju biljnog odgovora. Osim što je oportunistički biljni patogen, istraživanja pokazuju da se ponekad pojavljuje i kao ljudski patogen uzrokujući jake gljivične infekcije. Nema spolnu fazu pa se oslanja na mutaciju, hifalnu fuziju i mitotičku rekombinaciju za stvaranje genetičkih varijacija (Kaur i sur., 2012).

Sclerotinia sclerotiorum

S. sclerotiorum (Lib.) de Bary nekrotropni je fungalni patogen koji pripada koljenu Ascomycota, razredu Discomycetes i redu Helotiales. Uzrokuje zarazu preko 400 vrsta od kojih brojne imaju veliku poljoprivrednu važnost (suncokret, soja, leća, kikiriki i dr). Tvori paperjast micelij koji se nakuplja u sklerocije koje imaju važnu ulogu u ciklusu bolesti biljke koju zaražuju te ostaju održive u tlu do 8 godina. Gljiva ima dvojaku mogućnost zaraze domaćina, putem askospora koje se prenose vjetrom te zaražuju biljku na koju dospiju (karpogena germinacija) ili putem micelija u kojem hife napadaju domaćina (Clarkson i sur., 2003)

1.4. Interakcije gujavica i gljiva

Gljive i gujavice imaju kompetitivan odnos prema izvorima hrane, ali gljive su i važan izvor hrane za gujavice kao i indikatori kvalitete hrane gujavicama. Gujavice mogu raširiti spore gljiva svojim aktivnostima kao što su hranjenje ili kretanje. Ali gujavice također svojim aktivnostima mogu i smanjiti širenje spora gljiva tako što uklanjanju lišće i ostale dijelove biljke na kojima se gljive nalaze (Bonkowski i sur., 2000; Edwards i Fletcher, 1988). Aktivnost gujavica može utjecati na distribuciju mikroorganizama u tlu i kolonizaciju korijena, ekspresiju gljivičnog oboljenja korijena i na gustoću mikroorganizama (Doubé i sur., 1994).

Gujavice su bitne za detoksifikaciju tla pomažući pri degradaciji pesticida te posredujući remedijaciji tla. Istraživanja pokazuju da je aktivnost gujavica povezana sa smanjenjem bolesti biljaka uzrokovanih fitopatogenim gljivama te u konačnici povećanim rastom biljaka od 60% do 80%. Također pokazuju da vermikompost može smanjiti težinu bolesti (Elmer, 2009). Vermikompost je okolišno prihvatljiv način organskog upravljanja otpadom, produkt je biološke degradacije i stabilizacije organske tvari koje se događaju uslijed dekompozicije otpada pomoću interakcija između gujavica i mikroorganizama (Aracon i sur., 2003; Matos i Arruda, 2003). Vermikompost uzrokuje povećanje germinacije, prinosa usjeva i rasta biljaka. Predpostavka je da se povećanje prinosa događa zbog povećanja mikrobne populacije u vermikompostu koje proizvode hormone rasta koji se vežu na humate te tako postaju manje topivi i dostupniji biljkama (Edwards i Aracon, 2004). Stephens i Davoren (1997, 1993) navode da gujavice imaju povoljan utjecaj na trave (kao što su je višegodišnji ljulj i pšenica) zaražene *Rhizoctoniom*. Nakon izlaganja zaraženih trava gujavicama, došlo je do povećanog rasta te smanjenja bolesti. U istraživanju s *Rhizoctoniom* na rotkvicama i krastavcu dodatak vermikomposta smanjio je drastično pojavu bolesti. Pretpostavlja se da se to događa uslijed mikrobijalnog antagonizma (Edwards i Arancon, 2004; Ersahin i sur., 2009). Istraživanja pokazuju da gujavice također mogu smanjiti simptome i jačinu bolesti „bijela noga“ na pšenici koju uzrokuje *R. solani* (Bonkowski i sur., 2000).

1.5. Cilj rada

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti ima li celomska tekućina inhibitorni utjecaj na tri vrste fitopatogenih gljiva (*Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* i *Sclerotinia sclerotiorum*). Također, cilj je bio istražiti na koju fitopatogenu gljivu ekstrakt celomske tekućine ima najveći inhibitorni učinak, te odrediti razlike u inhibiciji rasta fitopatogenih gljiva tretiranih ekstraktom celomske tekućine različitih vrsta gujavica (*Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizmi

2.1.1. Gujovice

U provedenom istraživanju korištene su tri vrste gujavica – *Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* i *Allolobophora chlorotica*. Sve vrste nabavljene su od lokalnog uzgajivača. U istraživanju su korištene odrasle, spolno zrele gujovice koje su imale dobro i jasno izražen pojas.

Eisenia andrei

E. andrei (Slika 2) je epigejna vrsta gujavica, koja ima kratak životni ciklus. Od izlijeganja iz kokona do postizanja spolne zrelosti te polijeganja vlastitog kokona prolazi svega 45 do 51 dan. Nadalje, otporna je vrsta koja može tolerirati različit raspon vlažnosti i temperature, lako se uzgaja te je jedna od najčešće korištenih vrsta gujavica u eksperimentalne svrhe (Dominguez, 2004; Dominguez i sur., 2005).



Slika 2. Vrsta *E. andrei* (Autorska fotografija).

Dendrobaena veneta

D. veneta (Slika 3) je velika, epigejna, sporije živuća vrsta gujavice kojoj je životni ciklus dulji, a traje 100 do 150 dana. Može tolerirati šire raspone vlažnosti, ali ima manju toleranciju ekstremnijih temperatura pa joj tako pogoduju blaže temperature između 15 °C i 25 °C (Domiguez, 2004).



Slika 3. *D. veneta* i ekstrakt celomske tekućine (Autorska fotografija).

Allolobophora chlorotica

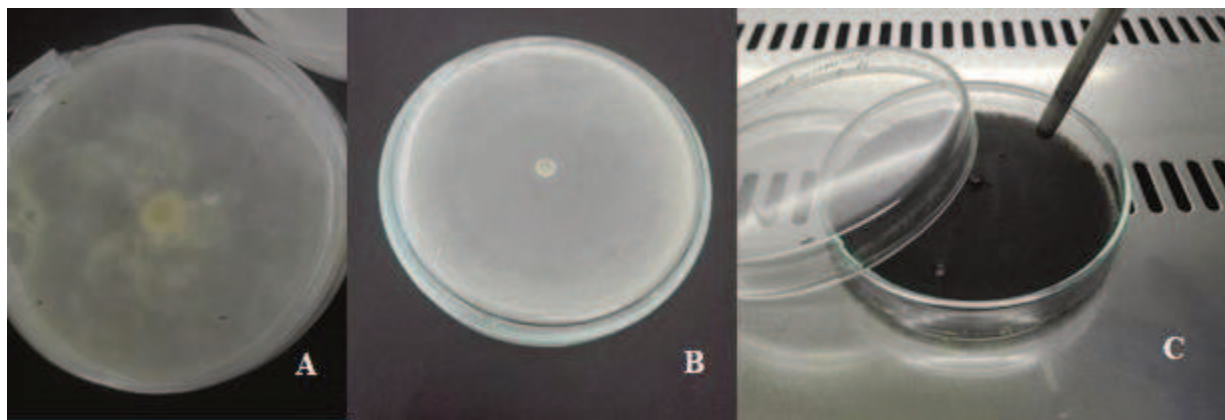
Zeleno-smeđa vrsta endogejne gujavice *A. chlorotica* (Slika 4) najveća je od sve tri korištene vrste, te preferira hladnije temperature. Kada su uvjeti povoljni može se pronaći na oko 8 cm ispod površine tla, no kako bi izbjegla suho tlo i nepovoljne temperature zakopava se i dublje (Ellis i sur., 2010). Za svrhe eksperimenta zbog svojih preferencija prema vlažnim i hladnijim staništima, držane su na vlažnom supstratu u hladnjaku pri 5°C.



Slika 4. *A. chlorotica* pri ekstrakciji celomske tekućine pomoću ekstrakcijskog pufera (Autorska fotografija).

2.1.2. Gljive

Utjecaj celomske tekućine, tri gore navedene vrste gujavica, istražen je na tri vrste fitopatogenih gljiva – *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* i *Sclerotinia sclerotiorum* (Slika 5). Gljive su uzgojene na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku u Laboratoriju za fitopatologiju. Za potrebe istraživanja gljive su za svako ponavljanje eksperimenta presađene tjedan dana ranije u nove Petrijeve zdjelice.



Slika 5. Gljive A - *Rhizoctonia solani*, B - *Sclerotinia sclerotiorum* i C - *Macrophomina phaseolina* (autorske fotografije).

2.2. Priprema fiziološke otopine i gujavica za ekstrakciju celomocita

Fiziološka otopina koja je korištena kao medij za ekstrakciju celomske tekućine pripremljena je topljenjem 3,25 g NaCl, 0,07 g KCl, 0,06 g CaCl₂, 0,1 g NaH₂CO₃ i 0,05 g NaH₂PO₄ u 500 mL destilirane, prethodno sterilizirane, vode. Sterilizacijom vode je izbjegnuta kontaminacija.

Gujavice su, prije svake ekstrakcije celomocita, izvađene iz tla i stavljene na čišćenje probavila koje je trajalo 24 sata. Gujavice su ostavljene u Petrijevoj zdjelici na vlažnom filter papiru, prekrivene aluminijskom folijom koja je imala perforacije za strujanje zraka. Čišćenje probavila provodilo se kako bi se smanjila kontaminacija ekstrakta celomocita. Nakon čišćenja

probavila, gujavice su zasebno isprane u destiliranoj vodi, a zatim su isprane i u fiziološkoj otopini korištenoj za ekstrakciju celomocita.

2.3. Priprema ekstrakta celomocita i određivanje koncentracije celomocita

2.3.1. Priprema ekstrakta celomocita

Nakon čišćenja i ispiranja svaka gujavica je stavljena u Petrijevu zdjelicu zajedno sa 4 mL fiziološke otopine. Celomociti su ekstrahirani iz *E. andrei* i *D. veneta* koristeći struju modificiranog punjača od 5 V (Slika 6). Svaka jedinka je tretirana strujom u trajanju od oko 30 sekundi. U tom vremenu gujavica je ispustila celomsku tekućinu u okolnu fiziološku otopinu. 4 mL fiziološke otopine korišteno je za ekstrakciju celomocita 15 gujavica te se ponavljalo ovisno o potrebnom ukupnom volumenu ekstrakta (u prosjeku ukupno oko 6 ponavljanja, tj. 90 gujavica). Ekstrakcija se odvijala na ledu te su se prikupljeni ekstrakti celomocita poolirali pri čemu su se pokušale izbjeći nečistoće koje su gujavice eventualno tijekom ekstrakcije ispustile.



Slika 6. Ekstrakcija celomocita vrste *E. andrei* koristeći modificirani punjač (Autorska fotografija).

Dovoljna količina ekstrakta nije mogla biti dobivena iz gujavice *A. chlorotica* primjenom struje pa je za ekstrakciju celomocita korišten ekstrakcijski pufer (Slika 7). Za pripremu ekstrakcijskog pufera korišteno je: 71.2 mM NaCl, 5% v/v etanol, 50.4 mM gvajakol-gliceril-eter,

5 mM Ea_2 -EDTA, a pH je podešen na 7.3 (Engelmann i sur., 2004b). Gujovice su stavljene u staklenu čašu te je dodano 8 mL ekstrakcijskog pufera. Ostavljene su oko 30 sekundi do 1 minute u puferu kako bi ispustile celomsku tekućinu. Korišteno je 8 mL ekstrakcijskog pufera na 15 gujavica. Nakon ekstrakcije puferom ekstrakti su centrifugirani 1 minutu te se nakon toga odlio supernatant, a talog se resuspendirao u fiziološkoj otopini.



Slika 7. Ekstrakcija celomocita vrste *A. chlorotica* koristeći ekstrakcijski pufer (Autorska fotografija).

Za svaki tretman gljiva celomskom tekućinom pripremao se svježi ekstrakt celomocita te se taj isti ekstrakt koristio za tretiranje gljiva isti dan.

2.3.2. Određivanje koncentracije celomocita

Za određivanje koncentracije celomocita korištena je Bürker-Türkova komorica. Jedna kap ekstrakta stavljena je pod stakalce na komorici. Pod svjetlosnim mikroskopom brojalo se 64 kvadratića komorice po pravilu da se broje svi celomociti u kvadratu, te oni koji su se nalazili na desnoj i lijevoj granici kvadratića. Nakon prebrojavanja svih celomocita koji se nalaze unutar 64 kvadratića komorice, izračunao se srednji broj celomocita po jednom kvadru, a onda i broj celomocita u 1 mL celomske tekućine. Koncentracija po 1 ml izračunala se pomoću slijedeće formule, gdje je volumen kvadra 0,04 mL:

$$\text{Broj stanica u 1 mL} = \text{srednji broj stanica} \cdot 1 / \text{volumen kvadra} \cdot \text{razrjeđenje}$$

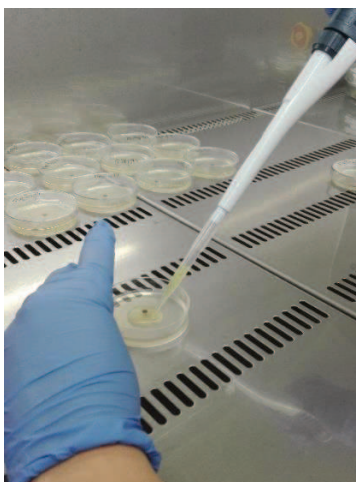
Nakon izračuna koncentracije celomocita, pripremljeni su ekstrakti određenih koncentracija. Preliminarnim istraživanjem utvrđeno je da su potrebne koncentracije 2000, 3500 i 5000 celomocita/mL za gljive *M. phaseolina* te *R. solani*, te 5000, 6000 i 7000 celomocita/mL za *S. sclerotiorum*. Iz gujavice *A. chlorotica* nije bilo moguće ekstrahirati 6000 i 7000 celomocita/mL, tako da su korištene koncentracije od 2000, 3500 i 5000 celomocita/mL za gljivu *S. sclerotiorum*. Potrebne koncentracije su pripremljene razrjeđivanjem ekstrahirane celomske tekućine sa fiziološkom otopinom. Kontrola se sastojala samo od fiziološke otopine za gujavice *E. andrei* i *D. veneta*. Za izradu kontrolne otopine kod gujavice *A. chlorotica* korištena je fiziološka otopina i pufer koji je korišten za ekstrakciju celomocita.

2.4. Tretiranje gljiva i mjerenje promjera micelija

Sve tri korištene vrste gljiva te hranjiva podloga osigurane su od strane Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Izlijevanje podloge, nasađivanje gljive te tretiranje gljive izvodilo se u laminaru, koji je prije početka rada dezinficiran alkoholom. Sav potreban pribor, koji je uključivao metalne iglice, metalni nož za kružne isječke te pipete također je dezinficiran alkoholom, a metalni pribor se još i provukao kroz plamenik.

U male Petrijeve zdjelice promjera 6 cm pomoću pipete stavljeno je 5 mL hranjive podloge, a u veće Petrijeve zdjelice promjera 9 cm 20 mL hranjive podloge. Pomoću noža učinjeni su kružni isječki gljive promjera 4 mm. Nakon što se hranjiva podloga ohladila, u središte Petrijeve zdjelice je pomoću metalne iglice položen kružni isječak gljive tako da je gornja strana micelija okrenuta prema dolje.

Odmah nakon nasađivanja gljive, svaki inokulat tretirao se ekstraktom celomocita (2000, 3500 i 5000 celomocita/mL za gljive *M. phaseolina* i *R. solani* te 5000, 6000 i 7000 celomocita/mL za *S. sclerotiorum*) i kontrolnom otopinom (Slika 8). Za gljive *R. solani* i *M. phaseolina* korišten je volumen od 1 mL za sva razrjeđenja uključujući i kontrolu, dok je kod *S. sclerotiorum* bio potreban volumen od 2 mL svakog razrjeđenja i kontrole zbog upotrebe veće Petrijeve zdjelice promjera 9 cm.



Slika 8. Tretiranje *M. phaseolina* jednim od razrjeđenja celomske tekućine (Autorska fotografija).

Nakon tretiranja ekstraktom celomocita, Petrijeve zdjelice s gljivom pažljivo su omotane parafilmom i stavljene u inkubator. Uvjeti u inkubatoru postavljeni su na temperaturu od 22 °C i svjetlosni režim od 12 sati svjetlosti i 12 sati tame.

Svaka 24 sata od tretiranja gljiva provodilo se mjerenje promjera micelija. Promjer micelija izmjeren je ručnim ravnalom te su označena mjesta mjerenja, na kojima se svaka 24 sata provodilo ponovno mjerenje sve dok micelij gljive nije prerastao hranjivu podlogu.

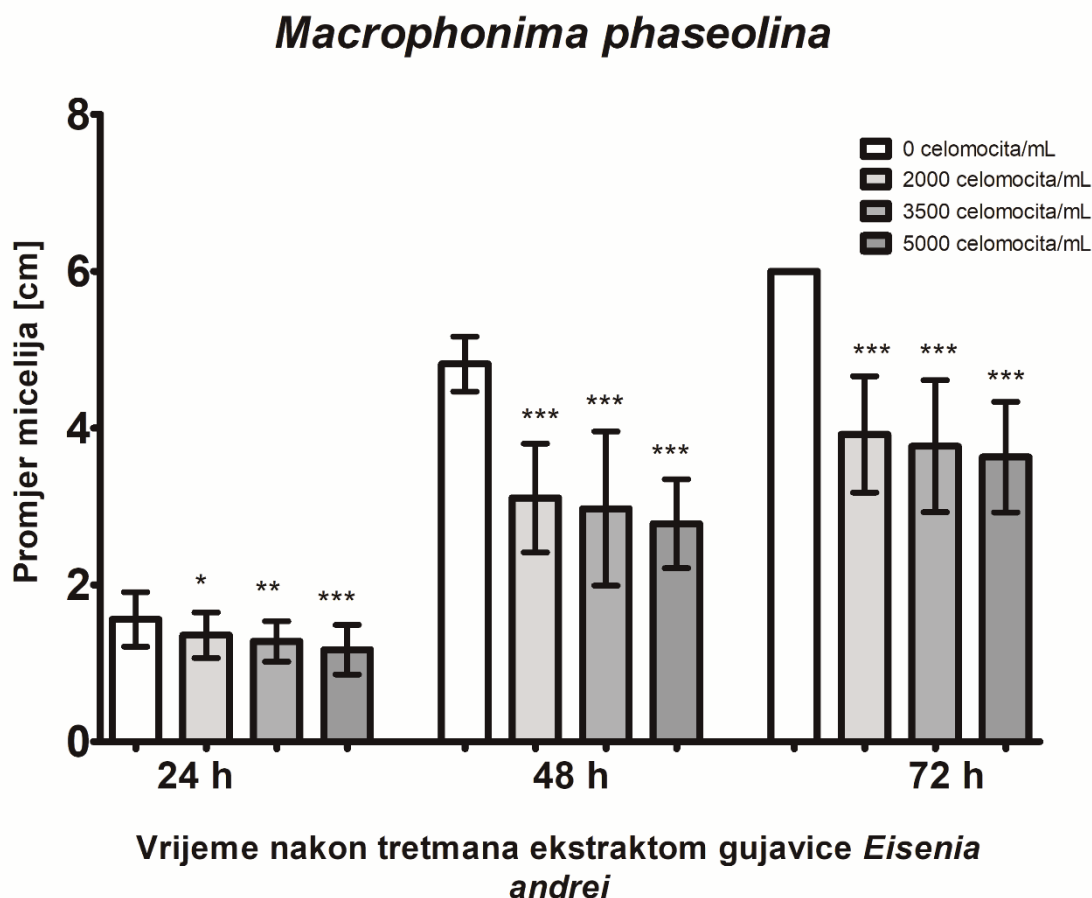
2.5. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u programu GraphPad Prism 5. Utvrđena je normalna distribucija podataka Shapiro–Wilkis testom i homogenost varijanci Bartlettovim testom. Statistički značajne razlike između kontrolnih skupina i tretiranih skupina određene su pomoću jednosmjerne (*one-way*) analize varijance (ANOVA). Nakon određivanja postojanja razlika među skupinama proveden je Dunnett-ov *post hoc* test kako bi se utvrdila višestruka usporedba između skupina. Testirana je značajnost na razini 5%.

3. REZULTATI

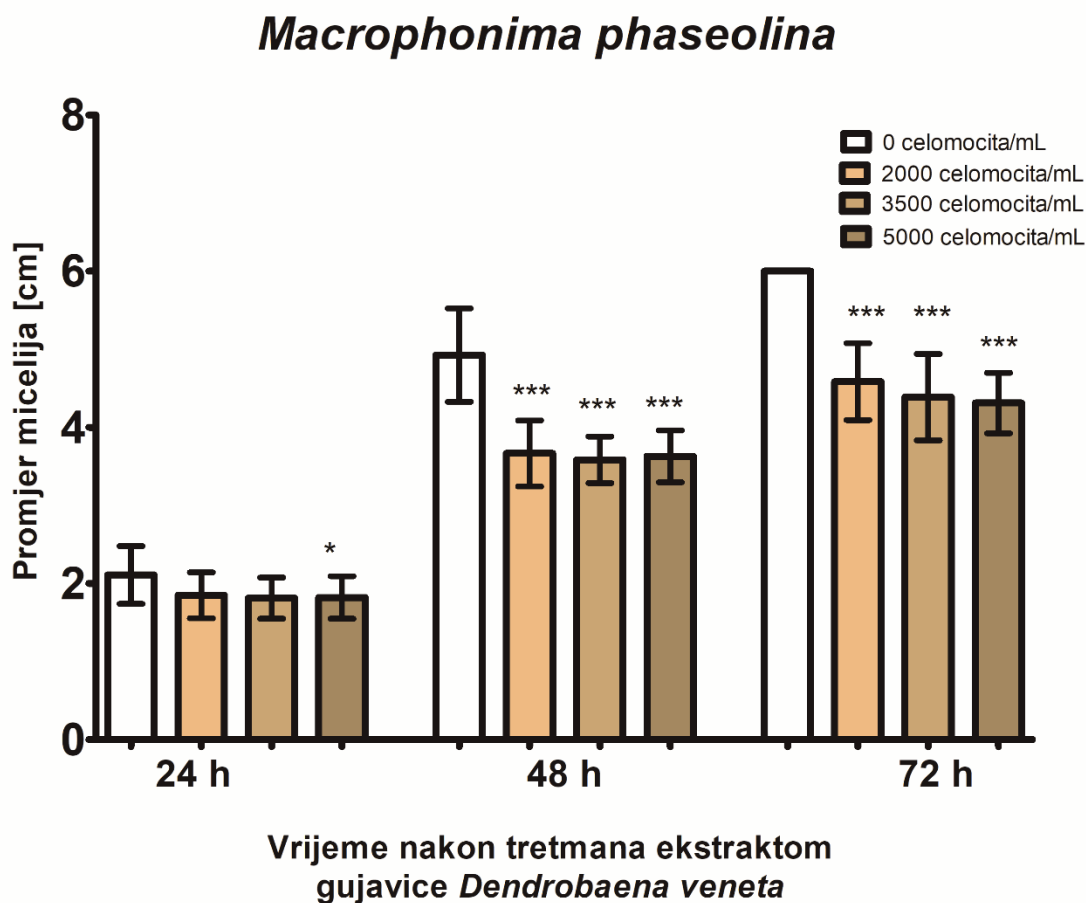
3.1. Rezultati mjerenja promjera micelija vrste *M. phaseolina* tretirane ekstraktima celomske tekućine različitih gujavica – *E. andrei*, *D. veneta* i *A. chlorotica*

Rezultati su pokazali da kod tretmana gljive *M. phaseolina* ekstraktom celomocita gujavice *E. andrei* postoje statistički značajne razlike između kontrole i svih razrjeđenja i to pri svakom vremenu (24, 48 i 72 sata nakon tretmana) mjerenja promjera gljive. Najmanji promjer micelija zabilježen je kod tretmana ekstraktom celomocita koncentracije 5000 celomocita/mL i to pri svakom vremenu (24, 48 i 72 sata nakon tretmana) mjerenja promjera micelija. Iz rezultata je također vidljivo smanjenje porasta micelija sa povećanjem koncentracije ekstrakta celomocita (Slika 9).



Slika 9. Rezultati mjerenja promjera micelija *M. phaseolina* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *E. andrei*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

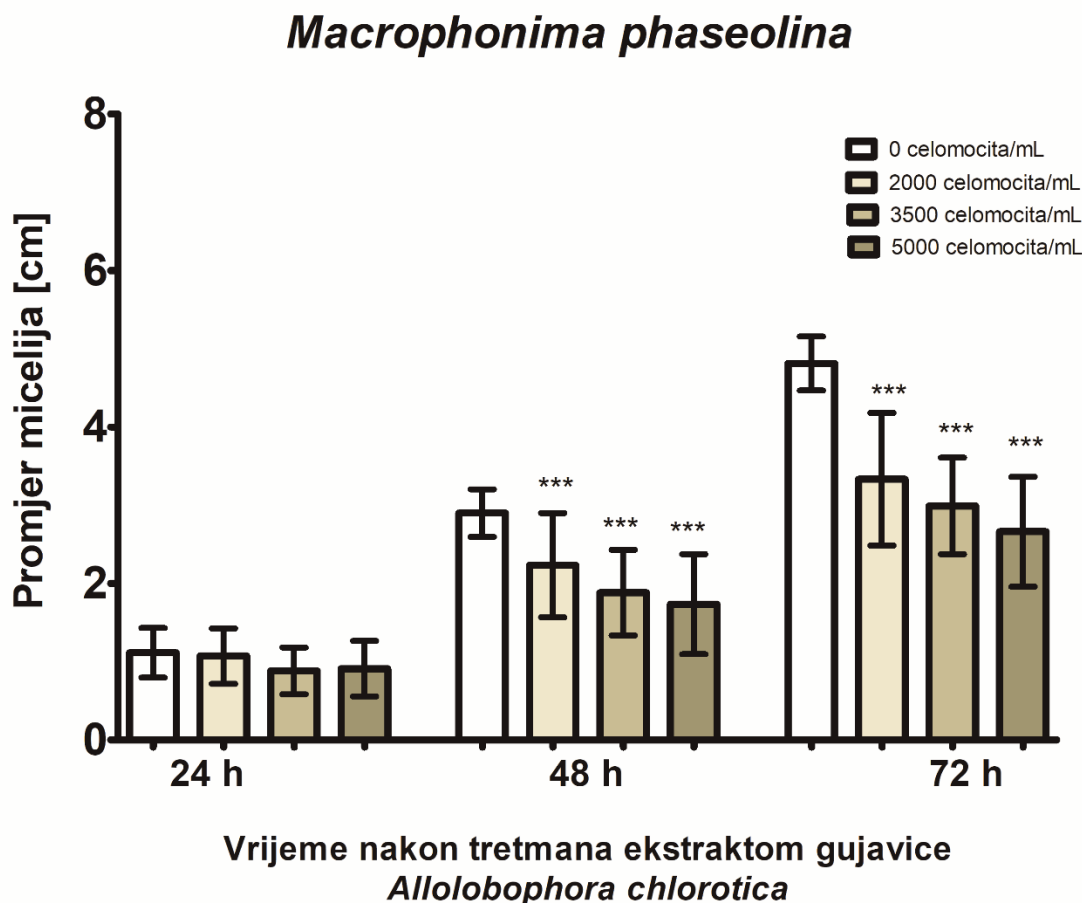
Kod tretmana gljive *M. phaseolina* s ekstraktom celomocita gujavice *D. veneta* statistički značajne razlike bile su vidljive već 24 sata nakon primjene ekstrakta celomocita koncentracije 5000 celomocita/mL u odnosu na kontrolu, dok su pri 48 i 72 sata statistički značajne razlike vidljive između kontrole i svih koncentracija ekstrakta celomocita. Pri mjerenju micelija 48 sati nakon tretmana najmanji promjer micelija izmjeran je pri tretmanu koncentracijom ekstrakta od 3500 celomocita/mL. Rezultati mjerenja 72 sata nakon tretmana pokazali su smanjenje porasta micelija s porastom koncentracije ekstrakta celomocita (Slika 10).



Slika 10. Rezultati mjerenja promjera micelija *M. phaseolina* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *D. veneta*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Kod tretmana gljive *M. phaseolina* ekstraktom celomocita gujavice *A. chlorotica* rezultati su pokazali da nema statistički značajnih razlika u rastu gljive u odnosu na kontrolu 24 sata nakon tretmana. Statistički značajne razlike zabilježene su između kontrole i svih koncentracija

ekstrakata celomocita 48 i 72 sata nakon tretmana. Pri mjerenju micelija 48 i 72 sata nakon tretmana također je vidljiv trend smanjenja porasta micelija s porastom koncentracije ekstrakta celomocita (Slika 11).

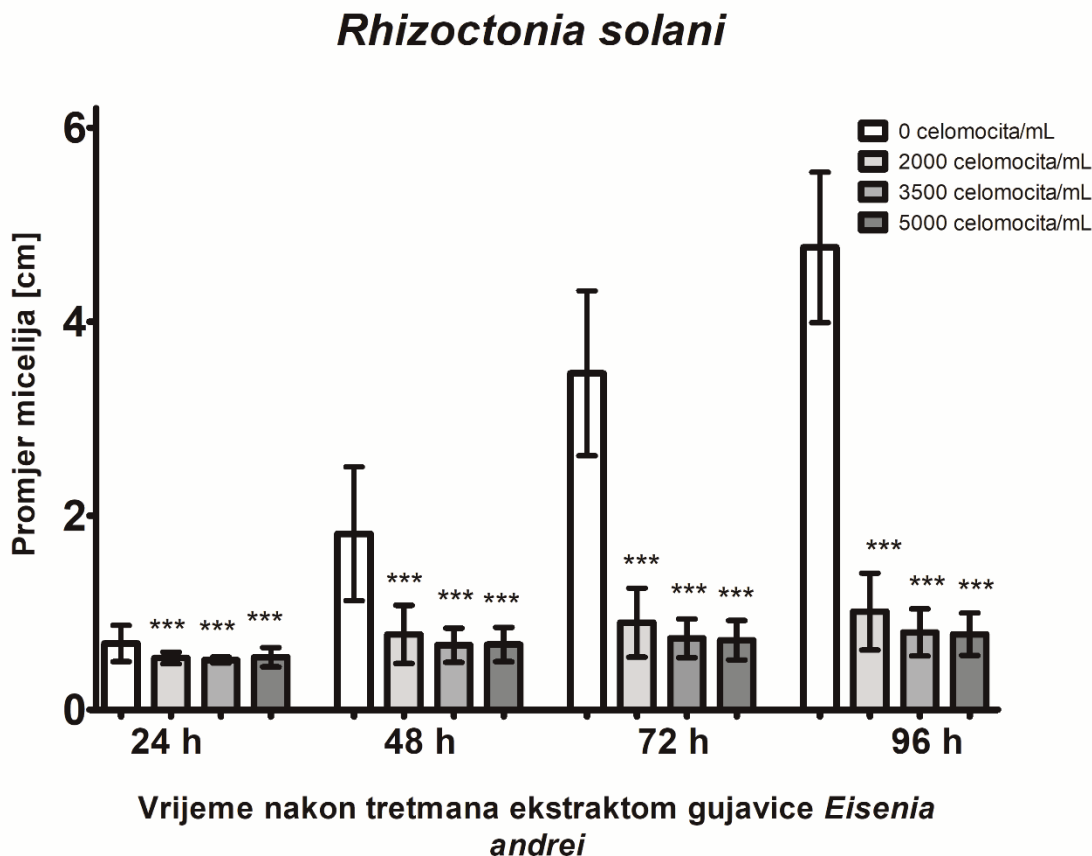


Slika 11. Rezultati mjerenja promjera micelija *M. phaseolina* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *A. chlorotica*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

3.2. Rezultati mjerenja promjera micelija vrste *R. solani* tretirane ekstraktima celomocita različitih gujavica – *E. andrei*, *D. veneta* i *A. chlorotica*

Rezultati mjerenja promjera gljive *R. solani* koja je prethodno tretirana ekstraktima celomocita gujavice *E. andrei* su pokazali statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama ekstrakta celomocita u svim vremenima mjerenja promjera micelija. 72 i 96

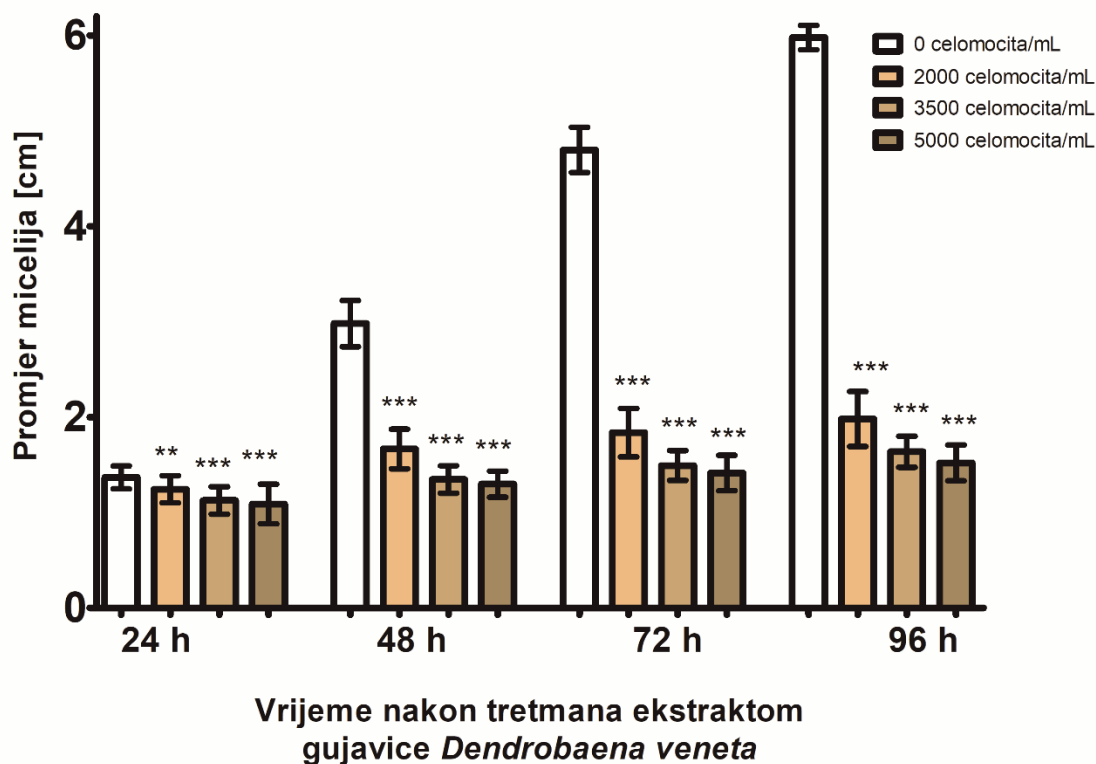
sati nakon tretmana vidljiv je trend smanjenja porasta micelija s porastom koncentracije ekstrakta celomocita. 24 i 48 sati nakon tretmana najmanji promjeri micelija izmjereni su pri 3500 celomocita/mL (Slika 12).



Slika 12. Rezultati mjerenja promjera micelija *R. solani* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *E. andrei*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Tretman gljive *R. solani* ekstraktom celomocita *D. veneta* također je uzrokovao statistički značajne razlike između svih koncentracija ekstrakta celomocita u odnosu na kontrolu te također pri svim vremenima mjerenja promjera micelija (Slika 13). Trend smanjenja porasta micelija s porastom koncentracije ekstrakta celomocita vidljiv je i ovdje kao i kod tretmana sa ekstraktom celomocita *E. andrei*, ali u ovom slučaju je vidljiv pri svim vremenima mjerenja promjera micelija.

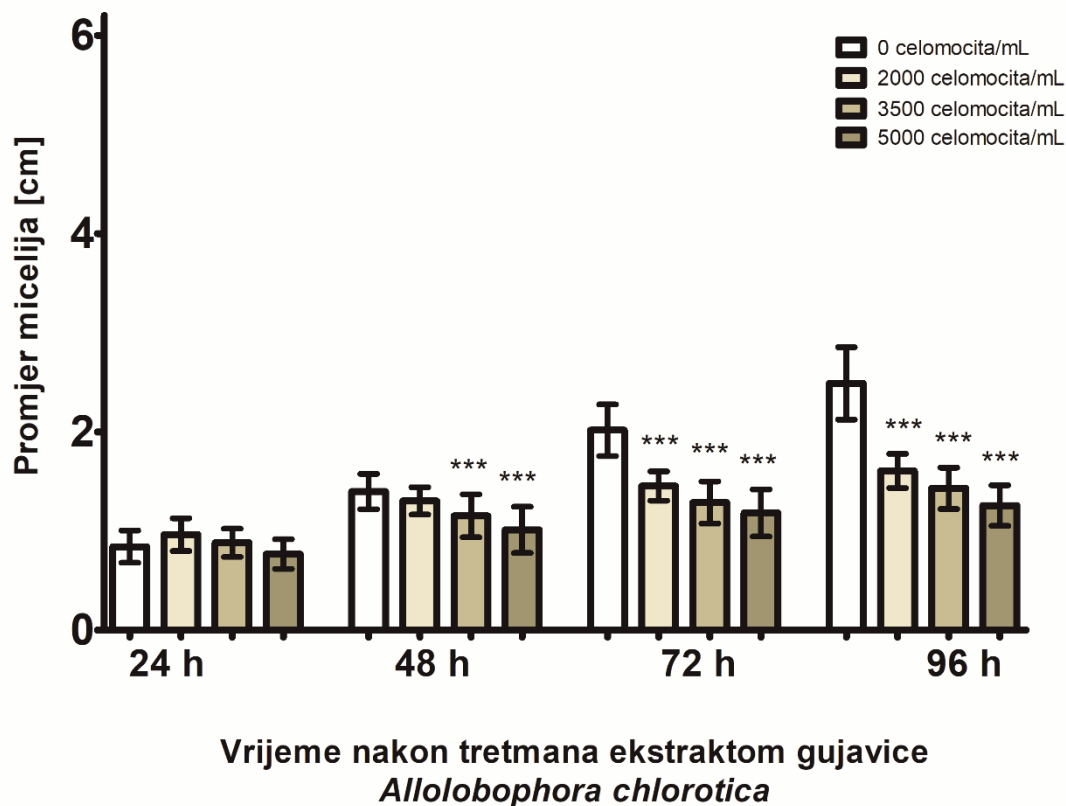
Rhizoctonia solani



Slika 13. Rezultati mjerenja promjera micelija *R. solani* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *D. veneta*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Rezultati mjerenja promjera micelija *R. solani* nakon tretmana ekstraktom celomocita gujavice *A. chlorotica* prikazani su na Slici 14 i pokazuju da 24 sata nakon tretmana nije bilo statistički značajnih razlika u rastu gljive u odnosu na kontrolu. Kod ostalih vremena (48, 72 i 96 sati) vidljiv je trend smanjenja porasta micelija s porastom koncentracije ekstrakta celomocita. Trend smanjenja porasta micelija statistički je značajan u odnosu na kontrolu pri svim vremenima mjerenja i pri svim koncentracijama, osim u slučaju koncentracije od 2000 celomocita/mL 48 sati nakon tretmana, iako je i tu uočen trend smanjenja porasta micelija.

Rhizoctonia solani

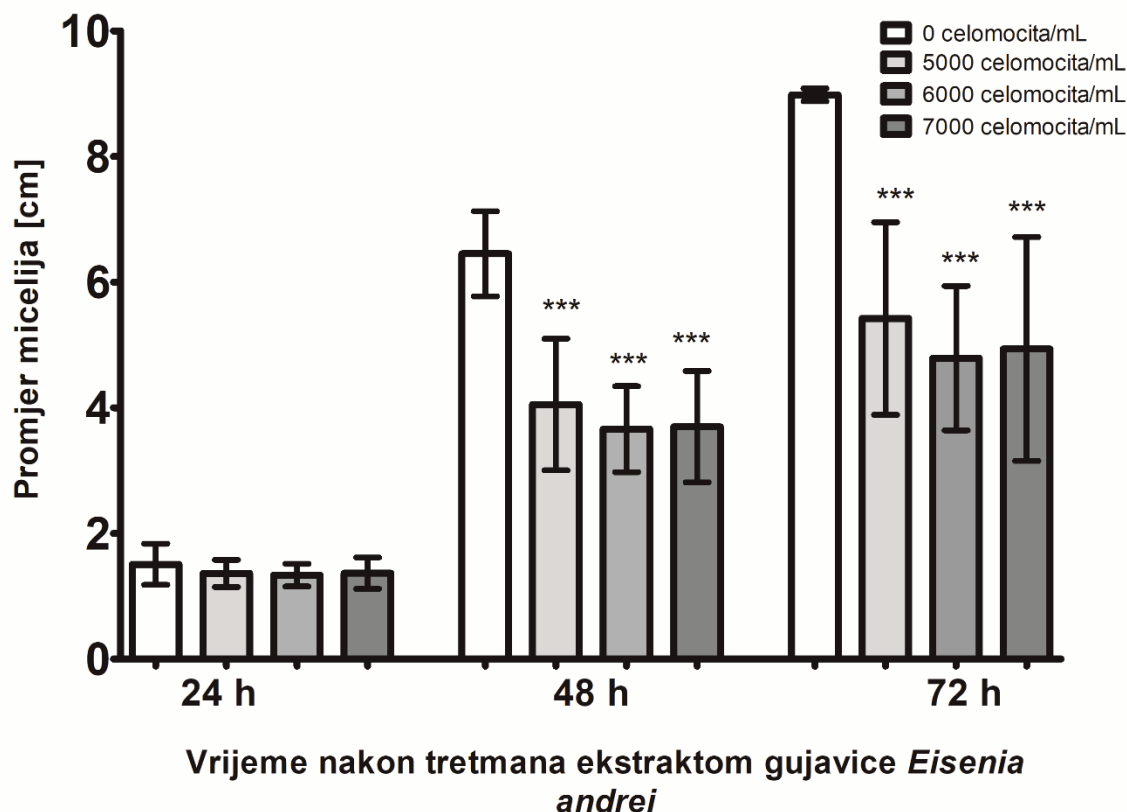


Slika 14. Rezultati mjerenja promjera micelija *R. solani* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *A. chlorotica*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

3.3. Rezultati mjerenja promjera micelija vrste *S. sclerotiorum* tretirane ekstraktima celomske tekućine različitih gujavica – *E. andrei*, *D. veneta* i *A. chlorotica*

Analiza rezultata porasta micelija gljive *S. sclerotiorum* tretirane različitim koncentracijama ekstrakta celomocita gujvice *E. andrei* pokazala je statistički značajne razlike između kontrole i koncentracija od 5000, 6000 i 7000 celomocita/mL 48 i 72 sata nakon tretmana (Slika 15). Najveću inhibiciju porasta micelija imao je ekstrakt celomocita koncentracije 6000 celomocita/mL u oba slučaja. 24 sata nakon tretmana nije utvrđena statistički značajna razlika u porastu micelija gljive u odnosu na kontrolu.

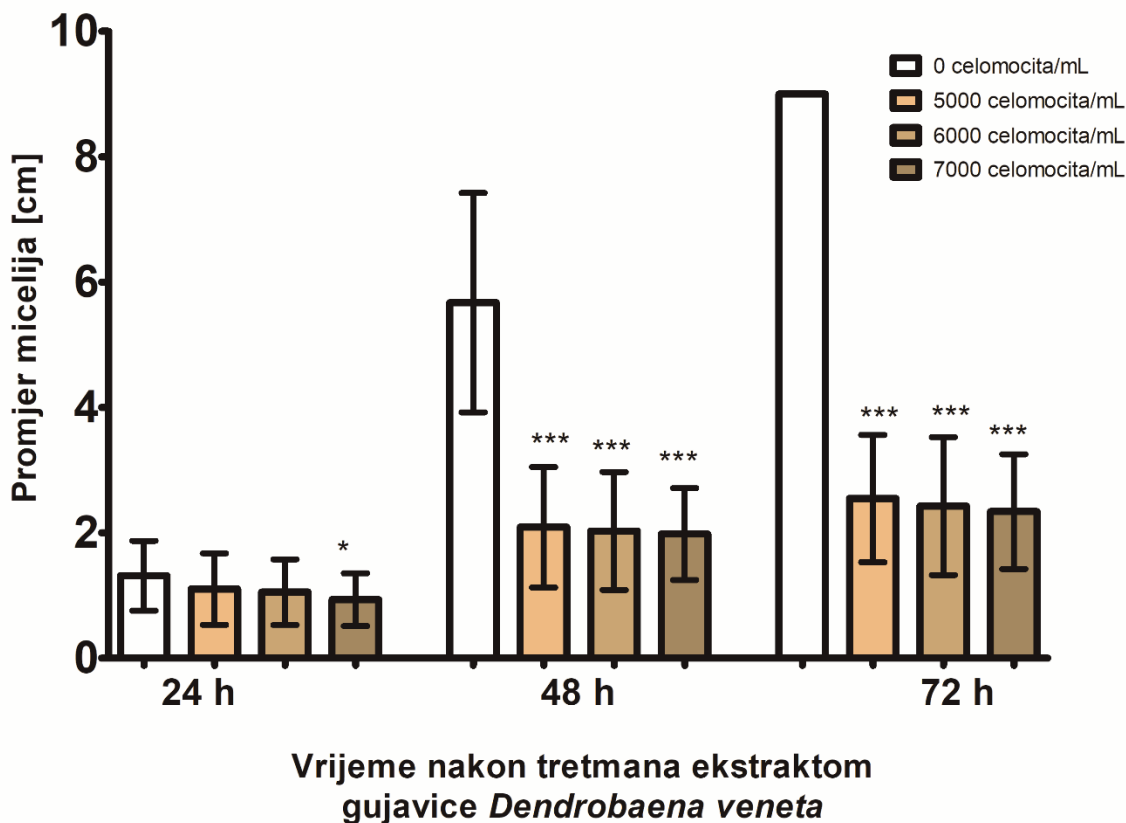
Sclerotinia sclerotiorum



Slika 15. Rezultati mjerenja promjera micelija *S. sclerotiorum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujavice *E. andrei*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Rezultati mjerenja promjera micelija *S. sclerotiorum* nakon tretmana ekstraktom celomocita gujavice *D. veneta* prikazani su na Slici 16 i pokazuju da statistički značajnu inhibiciju rasta micelija gljive 24 sata nakon tretmana ekstraktom koncentracije od 7000 celomocita/mL te 48 i 72 sata nakon tretmana kod svih koncentracija ekstrakta celomocita (5000, 6000 i 7000 celomocita/mL). Također je vidljiv trend smanjenja porasta micelija *S. sclerotiorum* s porastom koncentracije ekstrakta celomocita, pri svim vremenima mjerenja promjera micelija nakon tretmana ekstraktom celomocita vrste *D. veneta*.

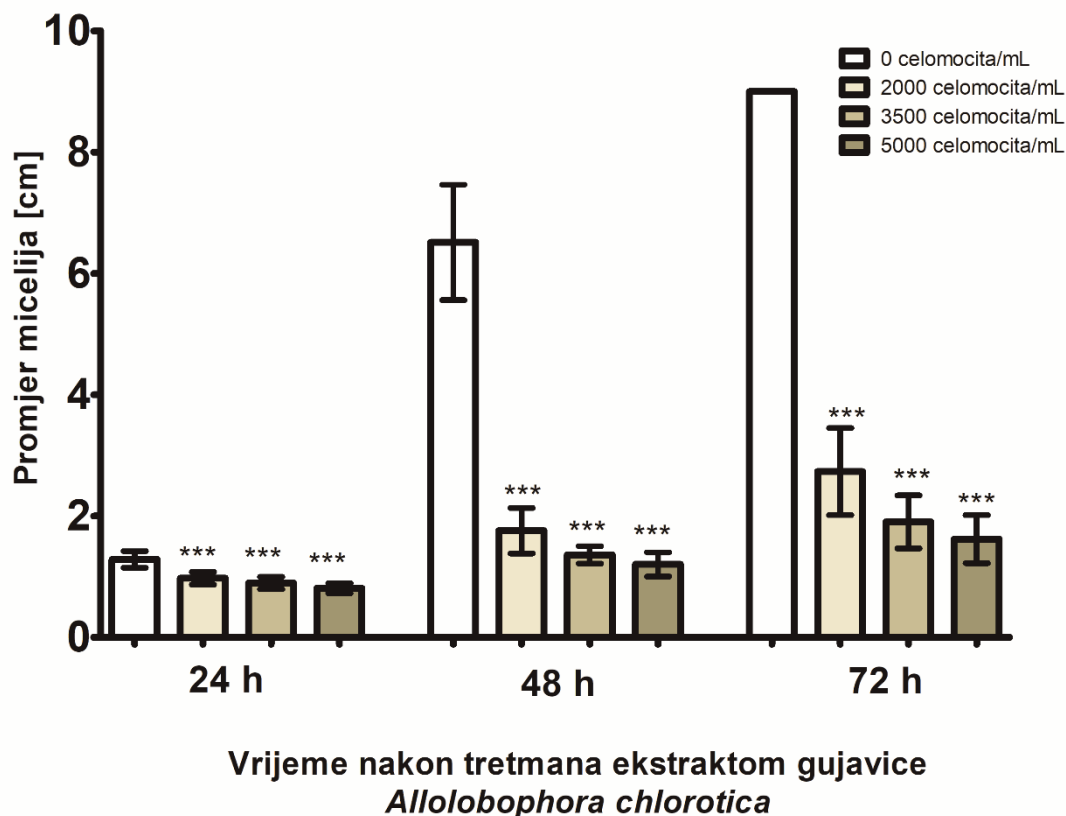
Sclerotinia sclerotiorum



Slika 16. Rezultati mjerenja promjera micelija *S. sclerotiorum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujaviće *D. veneta*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Rezultati mjerenja micelija gljive *S. sclerotiorum* tretirane ekstraktom celomocita gujaviće *A. chlorotica* prikazani su na Slici 17. Rezultati su pokazali statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu kod svih koncentracija ekstrakata te pri svim vremenima (24, 48 i 72 sata nakon tretmana) mjerenja promjera micelija. Nadalje, sve navedene koncentracije uzrokovale su smanjenje porasta micelija gljive *S. sclerotiorum* s porastom koncentracije ekstrakta celomocita gujaviće *A. chlorotica*.

Sclerotinia sclerotiorum



Slika 17. Rezultati mjerenja promjera micelija *S. sclerotiorum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana trima koncentracijama ekstrakta celomocita gujovice *A. chlorotica*. Statistički značajne razlike označene su kao: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

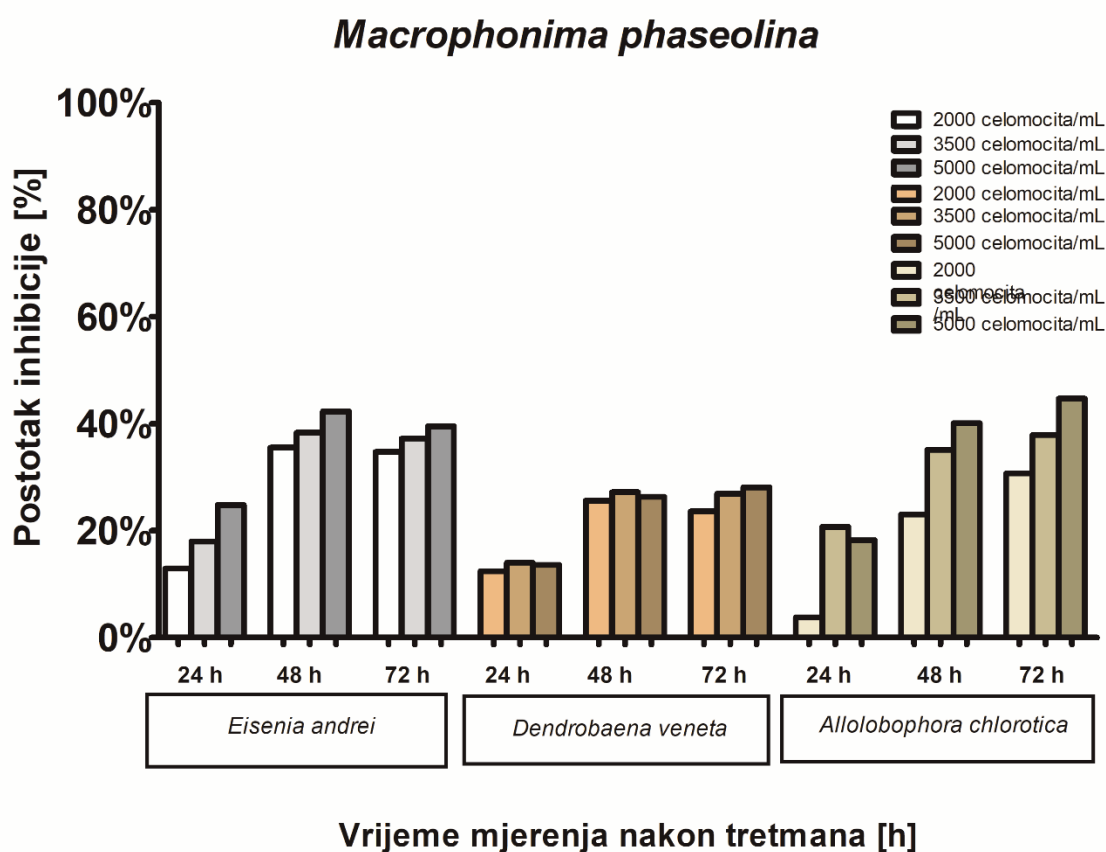
3.4. Postotci inhibicije rasta micelija

U slučaju inhibitornog učinka ekstrakta celomocita gujovice *E. andrei* na rast micelija gljive *M. phaseolina*, najveći postotak inhibicije rasta (42,3%) uzrokovao je ekstrakt koncentracije 5000 celomocita/mL i to 48 sati nakon tretmana. Najmanji postotak inhibicije (12,9%) uočen je pri tretmanu ekstraktom celomocita razrjeđenja 2000 celomocita/mL nakon 24 sata.

Pri tretmanu sa ekstraktom celomocita *D. veneta*, najveću inhibiciju (28,1%) uzokovala je najveća koncentracija ekstrakta, 5000 celomocita/mL, 72 sata nakon tretmana. Najmanju inhibiciju

rasta (12,4%) uzrokovao je tretman ekstraktom celomocita najmanje koncentracije, 2000 celomocita/mL, nakon 24 sata.

Najveća inhibicija rasta micelija kod ekstrakta *A. chlorotica* uočena je pri primjeni koncentracije ekstrakta od 5000 celomocita/mL 72 sata nakon tretmana. To je ujedno i najveći postotak inhibicije rasta micelija vrste *M. phaseolina* (44,7%). Najmanja inhibicija nakon primjene ekstrakta celomocita gujavice *A. chlorotica* uočena je pri koncentraciji od 2000 celomocita/mL 24 sata nakon tretmana, a to je ujedno i najmanji postotak inhibicije ekstraktom celomocita *A. chlorotica*, te je iznosio 3,8% (Slika 18).



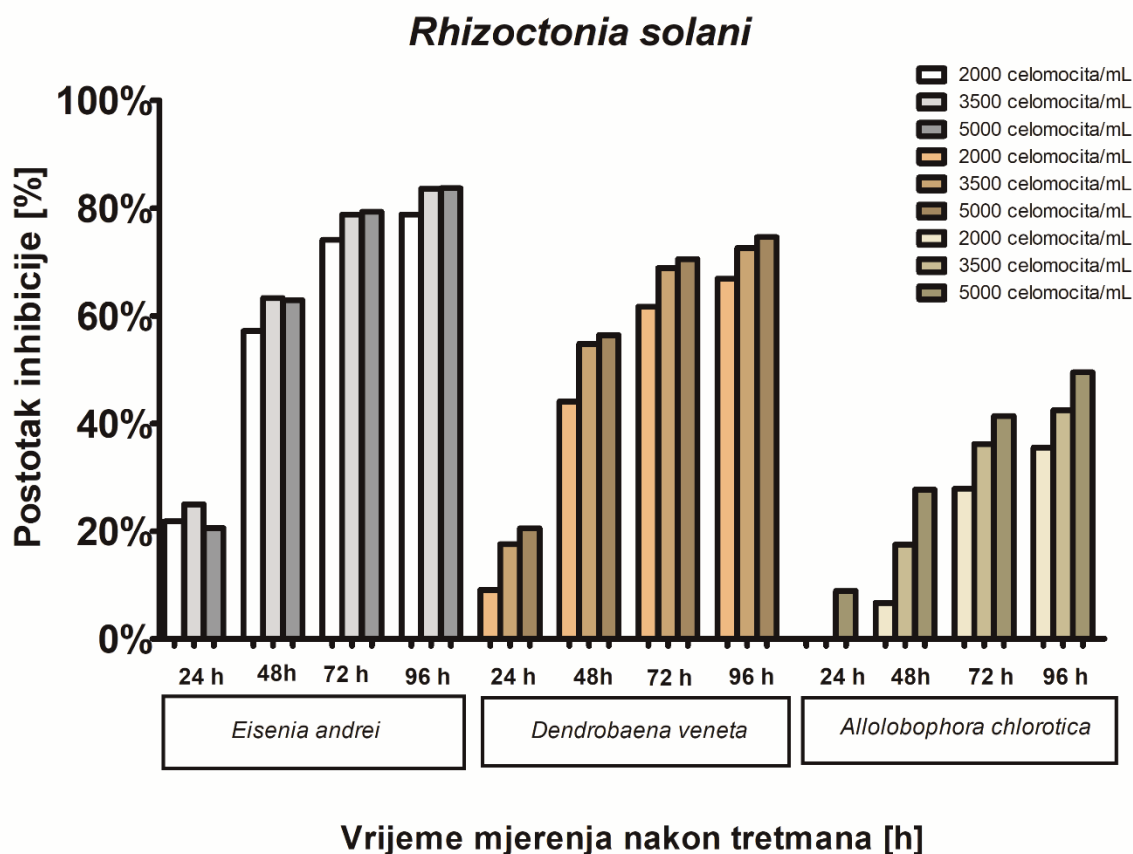
Slika 18. Inhibicija rasta micelija gljive *M. phaseolina* tretirane ekstraktima celomocita gujavica *E. andrei*, *D. veneta* i *A. chlorotica*, izražena u postotcima (%).

Prema rezultatima, najveću inhibiciju vrste *R. solani* uzrokovao je ekstrakt celomocita gujavice *E. andrei* najveće koncentracije, 5000 celomocita/mL, 96 sati nakon tretmana. Pri tome je postignuto 83,7% inhibicije rasta što je ujedno i najveći postotak inhibicije zabilježen u ovom

radu. Najmanja inhibicija rasta (20,6%) zabilježena je kod koncentracije od 5000 celomocita/mL 24 sata nakon tretmana.

Najveću inhibiciju (74,6%) pri tretmanu ekstraktom *D. veneta*, uzrokovao je ekstrakt celomocita koncentracije 5000 celomocita/mL 96 sati nakon tretmana. Najmanja inhibicija (9,1%) zabilježena je pri primjeni ekstrakta celomocita koncentracije 2000 celomocita/mL 24 sata nakon tretmana.

Pri tretmanu ekstraktom celomocita *A. chlorotica* nije uočena inhibicija u dva slučaja u kojima su primjenjeni ekstrakti celomocita koncentracije 2000 i 3000 celomocita/mL 24 sata nakon tretmana. Najveća inhibicija od 49,5% zabilježena je pri tretmanu sa ekstraktom koncentracije 5000 celomocita/mL 96 sati nakon tretmana. Najmanju inhibiciju (6,7%) postigla je primjena ekstrakta koncentracije 2000 celomocita/mL 48 sati nakon tretmana (Slika 19).



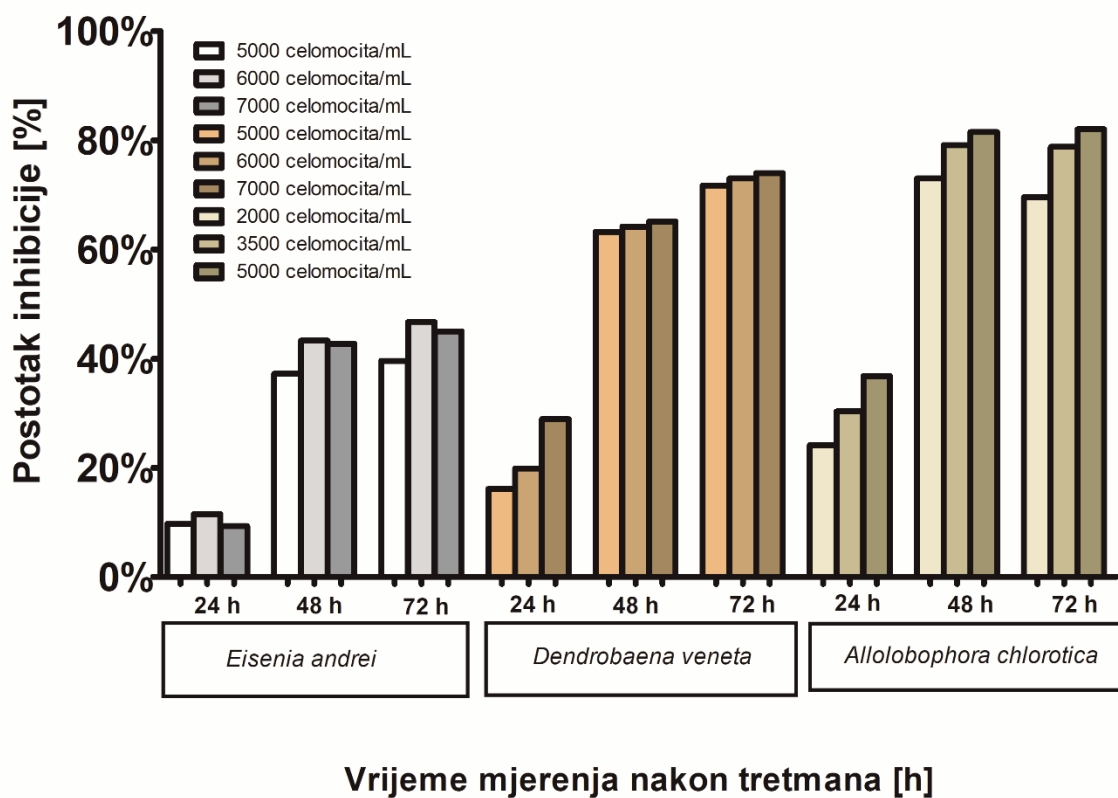
Slika 19. Inhibicija rasta micelija gljive *R. solani*, tretirane ekstraktima celomocita gujavica *E. andrei*, *D. veneta* i *A. chlorotica*, izražena u postotcima (%).

Prema podacima (Slika 20) najveća inhibicija od 46,7% micelija gljive *S. sclerotiorum* postignuta je ekstraktom celomocita *E. andrei* koncentracije 6000 celomocita/mL 72 sata nakon tretmana. Najmanja inhibicija (9,3%) zabilježena je pri primjeni ekstrakta koncentracije 7000 celomocita/mL 24 sata nakon tretmana.

Najveća inhibicija (74%) micelija uzrokovana tretmanom celomocita *D. veneta* zabilježena je primjenom ekstrakta koncentracije 7000 celomocita/mL 72 sata nakon tretmana. Najmanji postotak inhibicije od 16,1% zabilježen je primjenom ekstrakta koncentracije 5000 celomocita/mL mjeren 24 sata nakon tretmana.

Tretman ekstraktom celomocita gujavice *A. chlorotica*, koncentracije 5000 celomocita/mL mjeren 72 sata nakon tretmana, uzrokovao je najveći postotak inhibicije *S. sclerotiorum* od 82%. Iako su korištene manje koncentracije ekstrakta *A. chlorotica* (2000, 3500 i 5000 celomocita/mL), za razliku od ekstrakata celomocita *E. andrei* i *D. veneta* (5000, 6000 i 7000 celomocita/mL), inhibicija je najveća primjenom ekstrakta celomocita *A. chlorotica*. Najmanja inhibicija (24,1%) ekstraktom celomocita *A. chlorotica* zabilježena je pri koncentraciji od 2000 celomocita/mL 24 sata nakon tretmana.

Sclerotinia sclerotiorum



Slika 20. Inhibicija rasta micelija gljive *S. sclerotiorum*, tretirane ekstraktima celomocita gujavica *E. andrei*, *D. veneta* i *A. chlorotica*, izražena u postotcima (%).

4. RASPRAVA

Celomociti gujavica sastavni su dio celomske tekućine te imaju brojne funkcije u organizmu gujavica od zacjeljivanja rana, fagocitoze, enkapsulacije stranih tvari, održavanja pH celomske tekućine, detoksifikacije, koagulacije celomske tekućine i drugih (Kurek i sur., 2007). Celomska tekućina također sadrži i brojne aktivne molekule kao što su lizenin, fetidin, lumbricin 1 te celomski citolitički faktor koje imaju važne imunološke uloge (Engelmann i sur., 2005). Brojna istraživanja usmjerena su prema identifikaciji takvih molekula, kao i prema određivanju funkcije i aktivnosti imunološki aktivnih molekula u celomskoj tekućini gujavica (Kauschke i sur., 2001; Kobayashi i sur., 2001; Bruhn i sur., 2006; Park i sur., 2017; Bodo i sur., 2019).

Gujavice ulaze u trofički kompetitivne interakcije sa gljivama tijekom raspada organske tvari, također gljive služe gujavicama kao dobar izvor hrane, te tako gujavice ujedno i smanjuju rizik od zaraze biljaka fitopatogenim gljivama tako što smanjuju njihovu biomasu (Wolfarth i sur., 2011a; Edwards i Fletcher, 1988). Gljive ujedno djeluju i kao indikatori kvalitete hrane gujavicama (Bonkowski i sur., 2000). Neka istraživanja dokazuju potencijalnu kontrolu te smanjenje bolesti biljaka uzrokovane fitopatogenim gljivama djelovanjem gujavica, te također pokazuju povećanje rasta i oporavak biljaka zaraženim gljivama (Elmer 2009; Stephens i Davoren, 1997; Stephens i sur., 1993). Također, istraživanja su pokazala da gujavice, točnije vrste *L. terrestris* i *Aporrectodea caliginosa* koje su korištene u istraživanjima, imaju mogućnost razgradnje mikotoksina (Wolfarth i sur., 2016; Wolfarth i sur., 2011b). Nadalje, istraživanja koja su proučavala utjecaj celomocita na stanicama tumora sisavaca i stanicama fibroblasta miša (HEp-2 i HeLa), pokazala su da je aktivnost celomocita izrazito citotoksična te da je uzrokovala lizu stanica koje su bile izložene celomskoj tekućini (Engelman i sur., 2004b; Yanqin i sur., 2007). Također, predloženo je da je citotoksičnost povezana s aktivnošću lizenina koji se veže sa sfingomijelinom kod kralježnjaka te tako uzrokuje lizu stanica (Mácsik i sur., 2015).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da celomska tekućina gujavica ima inhibitorni utjecaj na rast sve tri vrste istraživanih fitopatogenih gljiva – *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Od tri ekstrakta celomocita korištenih za tretiranje gljive *M. phaseolina*, ekstrakt celomocita *A. chlorotica* postigao je najveću inhibiciju rasta micelija, dok je najmanju inhibiciju rasta micelija postigao ekstrakt celomocita gujavice *D. veneta*. Što se tiče gljive *S. sclerotiorum* najveću inhibiciju rasta micelija postigao je ekstrakt celomocita

A. chlorotica, dok je ekstrakt celomocita *E. andrei* bio najmanje uspješan pri inhibiciji rasta micelija. Najveću inhibiciju rasta micelija u odnosu na sve ekstrakte, ali i na sve istraživane gljive postigao je ekstrakt celomocita vrste *E. andrei* kojim je tretirana gljiva *R. solani*. Najmanju inhibiciju rasta *R. solani* prouzročio je ekstrakt celomocita *A. chlorotica*. U gotovo svim slučajevima najveća korištena koncentracija ekstrakta celomocita (5000 ili 7000 celomocita/ml) prouzročila je najveću inhibiciju rasta micelija. Osim kod tretmana gljive *S. sclerotiorum* ekstraktom celomocita *E. andrei* gdje je najveću inhibiciju postigao ekstrakt koncentracije 6000 celomocita/mL. Važno je napomenuti razliku u rastu kontrola kod svake ispitivane vrste gljiva. Naime kontrole nisu u svakom slučaju jednako brzo rastle. Gljive *R. solani* i *M. phaseolina* tretirane ekstraktom celomocita *A. chlorotica* rastle su sporije nego kada su bile tretirane ekstraktima celomocita drugih vrsta gujavica. Razlika u rastu kontrola nastala je vjerojatno zbog korištenja ekstrakcijskog pufera za ekstrakciju celomocita te gujavice, a koji je također dodan uz fiziološku otopinu za tretman kontrola kako bi rezultati bili vjerodostojni. Kod gljive *S. sclerotiorum* tretirane ekstraktima celomocita *A. chlorotica* to nije bio slučaj, vjerojatno zbog ubrzanog rasta te gljive.

Istraživanje koje je prethodilo ovome dokazalo je da celomska tekućina gujavica *Eisenia fetida* i *D. veneta* ima negativan utjecaj na rast micelija fitopatogene gljive *Fusarium oxysporum* te da su najveće razlike u inhibiciji u odnosu na kontrolu uočene 72 sata nakon tretmana (Plavšin i sur., 2017). Takvi rezultati poklapaju se i slični su u usporedbi s rezultatima dobivenima ovim istraživanjem gdje su također najbolje vidljive razlike između kontrole i tretiranih skupina 72 sata nakon tretmana dok su pri prvom mjerenju 24 sata nakon tretmana te razlike manje izražene.

Istraživanja utjecaja celomske tekućina na gljive su rijetka i tek je jedno takvo poznato u literaturi (Plavšin i sur., 2017), pa prema tome niti mehanizam kojim celomska tekućina uzrokuje inhibiciju rasta micelija gljiva nije još poznat. Vjerojatno je povezan sa hemolitičkim, antibakterijskim, citotoksičnim te proteolitičkim funkcijama celomske tekućine i celomocita (Kobayashi i sur., 2004). Aktivne molekule u celomskoj tekućini mogle bi biti odgovorne za inhibiciju rasta micelija. Od poznatih aktivnih molekula celomske tekućine moguće je da je odgovoran lizenin ili lumbricin 1. Lumbricin 1 ima antimikrobno djelovanje protiv bakterija i gljiva (Cho i sur., 1998). Lizenin koji se, kao što je već navedeno, veže sa sfingomijelinom te stvara pore, a interakcija dovodi do citotoksičnosti (Kobayashi, 2004) bi također mogao biti uključen u lizu stanica gljiva. Gljive su eukarioti te kao kod svih eukariota, membrane im sadrže

sfingolipide (Thevissen i sur., 2005), a ako se za neke od sfingolipida može povezati lizenin ili ako gljive sadrže sfingomijelin u svojim membranama, što nije navedeno u literaturi, bilo bi moguće da lizenin uzrokuje lizu membrana i stanica gljiva.

Fitopatogene gljive odgovorne su za zarazu velikog broja biljaka, a ponajprije usjeva. Zaražujući usjeve fitopatogene gljive uzrokuju velike poljoprivredne i ekonomske štete. Fitopatogene gljive koje su korištene u ovom istraživanju također uzrokuju zarazu brojnih biljaka, neke od njih uzrokuju zarazu pamuka, soje, suncokreta, krumpira, graha, duhana i drugih (Kaur i sur., 2012; Garcia i sur., 2006). Fungicidi su sredstva za sprječavanje bolesti koje uzrokuju fitopatogene gljive, predstavljaju dobru obranu protiv zaraze, ali zbog pojave rezistentnih genotipova (Ma i Michailides, 2005), te također zbog štetnog utjecaja fungicida na gujavice (Römbke i sur., 2007; Van Zwieten i sur., 2004), ali i na druge beskralježnjake u tlu, potrebno je istražiti ostale mogućnosti suzbijanja bolesti uzrokovanih fitopatogenim gljivama koje neće negativno djelovati na ostale organizme, pogotovo na gujavice koje se smatraju „ekološkim inženjerima“ i čije su uloge u tlu poput dekompozicije i mineralizacije organske tvari i proizvodnje humusa, aeracije tla i poboljšanja vodnog režima tla te modifikacije dostupnosti resursa od vrlo velike važnosti i nezamjenjive u okolišu.

5. ZAKLJUČAK

1. Celomska tekućina tri vrste istraživanih gujavica ima inhibitorni utjecaj na rast tri vrste fitopatogenih gljiva.
2. Najveći inhibitorni učinak postigao je ekstrakt gujavice *E. andrei* kojim je tretirana gljiva *R. solani*.
3. Najveću inhibiciju rasta micelija *M. phaseolina* postigao je ekstrakt celomocita *A. chlorotica*.
4. Najveću inhibiciju rasta micelija *S. sclerotiorum* postigao je ekstrakt celomocita *A. chlorotica*.

6. LITERATURA

Ajayi-Oyetunde, O. O., Bradley, C. A. (2018) *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology* 67: 3-17.

Arancon, N. Q., Edwards, C. A., Bierman, P., Metzger, J. D., Lee, S., Welch, C. (2003) Effects of vermicomposts on growth and marketable fruits of field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia* 47: 731-735.

Ashraf, H., Javaid, A. (2007) Evaluation of antifungal activity of Meliaceae family against *Macrophomina phaseolina*. *Mycopath* 5: 81-84.

Bartlett, M. D., Briones, M. J., Neilson, R., Schmidt, O., Spurgeon, D., Creamer, R. E. (2010) A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. *European Journal of Soil Biology* 46: 67-73.

Bilej, M., Procházková, P., Šilerová, M., Josková, R. (2010) Earthworm Immunity. U: Söderhäll K. (ur.) *Invertebrate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 708. Springer, Boston, MA, 66-79.

Blair, J. M., Parmelee, R. W., Allen, M. F., McCartney, D. A., Stinner, B. R. (1997) Changes in soil N pools in response to earthworm population manipulations in agroecosystems with different N sources. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 361-367.

Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., Dai J., Dendooven L., Peres G., Tondoh J.E., Brun J.J., Cluzeau, D. (2013) A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* 64: 161-182.

Bodó, K., Boros, Á., Rumpler, É., Molnár, L., Böröcz, K., Németh, P., Engelmann, P. (2019) Identification of novel lumbricin homologues in *Eisenia andrei* earthworms. *Developmental and Comparative Immunology* 90: 41-46.

Bonkowski, M., Griffiths, B. S., Ritz, K. (2000) Food preferences of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia* 44: 666-676.

Bruhn, H., Winkelmann, J., Andersen, C., Andrä, J., Leippe, M. (2006) Dissection of the mechanisms of cytolytic and antibacterial activity of lysenin, a defence protein of the annelid *Eisenia fetida*. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 597-606.

Chatelain, M., Mathieu, J. (2017) How good are epigeic earthworms at dispersing? An investigation to compare epigeic to endogeic and anecic groups. *Soil Biology and Biochemistry* 111: 115-123.

Chet, I., Inbar J. (1994) Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37-43.

Cho, J. H., Park, C. B., Yoon, Y. G., Kim, S. C. (1998) Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1408: 67-76.

Clarkson, J. P., Staveley, J., Phelps, K., Young, C. S., Whipps, J. M. (2003) Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* 107: 213-222.

Cortez, J., Hameed, R. H. (2001) Simultaneous effects of plants and earthworms on mineralisation of ¹⁵N-labelled organic compounds adsorbed onto soil size fractions. *Biology and Fertility of Soils* 33: 218-225.

Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., Sharon, A. (2017) Plant pathogenic fungi. U: J., Howlett, B., Crous, P., Stukenbrock, E., James, T., Gow, N. (ur.) *The fungal kingdom*. Washington, DC:ASM Press, 703– 726.

Dominguez, J. (2004) State of the art and new perspectives on vermicomposting research. U: Edwards, C.A. (ur.) *Earthworm Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 401–424.

Dominguez, J., Edwards, C. A. (2011) Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. U: Arancon, N., Sherman, R. (ur.) Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Waste and Environmental Management. CRC Press, Boca Raton, USA, 25–31.

Domínguez, J., Velando, A., Ferreiro, A. (2005) Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?. *Pedobiologia* 49: 81-87.

Doube, B. M., Stephens, P. M., Davoren, C. W., Ryder, M. H. (1994) Interactions between earthworms, beneficial soil microorganisms and root pathogens. *Applied Soil Ecology* 1: 3-10.

Edwards, C. A., Arancon, N. Q. (2004) Vermicomposts suppress plant pest and disease attacks. *BioCycle* 45: 51-54.

Edwards, C. A., Fletcher, K. E. (1988) Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24: 235-247.

Edwards, C., Bohlen, P. (1996) Earthworm morphology. U: Biology and Ecology of Earthworms. 3rd ed., London, Springer Science and Business Media.

Eilenberg, J. (2006) Concepts and visions of biological control. U: Eilenberg, J., Hokkanen, H. M. T. (ur.) An ecological and societal approach to biological control. Dordrecht, the Netherlands, Springer, 1-11.

Ellis, S. R., Hodson, M. E., Wege, P. (2010) The soil-dwelling earthworm *Allolobophora chlorotica* modifies its burrowing behaviour in response to carbendazim applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1424-1428.

Elmer, W. H. (2009) Influence of earthworm activity on soil microbes and soilborne diseases of vegetables. *Plant Disease* 93: 175-179.

Engelmann, P., Molnár, L., Pálincás, L., Cooper, E. L., Németh P. (2004b) Earthworm leukocyte populations specifically harbor lysosomal enzymes that may respond to bacterial challenge. *Cell and Tissue Research* 316: 391-401.

Engelmann, P., Hayashi, Y., Bodó, K., Ernszt, D., Somogyi, I., Steib, A., Orbán, J., Pollák, E., Nyitrai, M., Németh, P., Molnár, L. (2016) Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocyte subsets: Linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations. *Developmental and Comparative Immunology* 65: 41-52.

Engelmann, P., Kiss, J., Csöngéi, V., Cooper, E. L., Németh, P. (2004a) Earthworm leukocytes kill HeLa, HEp-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 61: 215-227.

Ersahin, Y. S., Haktanir, K., Yanar, Y. (2009) Vermicompost suppresses *Rhizoctonia solani* Kühn in cucumber seedlings. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116: 182-188.

Field, S.G., Kurtz, J., Cooper, E. L., Michiels, N. K. (2004) Evaluation of an innate immune reaction to parasites in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology* 86: 45-49.

Fusaro, S., Gavinelli, F., Lazzarini, F., Paoletti, M. G. (2018) Soil Biological Quality Index based on earthworms (QBS-e). A new way to use earthworms as bioindicators in agroecosystems. *Ecological Indicators* 93: 1276-1292.

García, V. G., Onco, M. P., Susan, V. R. (2006) Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4: 55-79.

Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011) Kolutićavi Coelomata. U: *Protista-Protozoa; Metazoa-Invertebrata*. Alfa d.d., Zagreb, 286-300.

Homa, J. (2018) Earthworm coelomocyte extracellular traps: structural and functional similarities with neutrophil NETs. *Cell and Tissue Research* 371: 407-414.

Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X., Shen, Q. (2012) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research* 167: 135-143.

Idnurm, A., Howlett, B. J. (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* 2: 241-255.

Kaur, S., Dhillon, G. S., Brar, S. K., Vallad, G. E., Chand, R., Chauhan, V. B. (2012) Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology* 38: 136-151.

Kauschke, E., Komiyama, K., Moro, I., Eue, I., König, S., Cooper, E. L. (2001) Evidence for perforin-like activity associated with earthworm leukocytes. *Zoology* 104: 13-24.

Kobayashi, H., Ohta, N., Umeda, M. (2004) Biology of lysenin, a protein in the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *International Review of Cytology* 236: 45-99.

Kobayashi, H., Ohtomi, M., Sekizawa, Y., Ohta, N. (2001) Toxicity of coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* to vertebrates but not invertebrates: probable role of sphingomyelin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology and Pharmacology* 128: 401-411.

Kurek, A., Homa, J., Kauschke, E., Plytycz, B. (2007) Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *European Journal of Soil Biology* 43: S121-S126.

Ma, Z., Michailides, T. J. (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.

Mácsik, L. L., Somogyi, I., Oppér, B., Bovári-Biri, J., Pollák, E., Molnár, L., Németh, P., Engelmann, P. (2015) Induction of apoptosis-like cell death by coelomocyte extracts from *Eisenia andrei* earthworms. *Molecular Immunology* 67: 213-222.

Martin, B. (1987) Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. *Plant Disease* 71: 47.

Matos, G. D., Arruda, M. A. Z. (2003) Vermicompost as natural adsorbent for removing metal ions from laboratory effluents. *Process Biochemistry* 39: 81-88.

Olchawa, E., Czerny, B., Plytycz, B. (2003) Effects of temperature and soil bacteria on restoration of the immune system and reproduction of earthworms. *Acta Agrophysica* 1: 705-710.

Oppér, B., Bognár, A., Heidt, D., Németh, P., Engelmann, P. (2013) Revising lysenin expression of earthworm coelomocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 39: 214-218.

Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R., Singh, C. S. (2001) Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 156: 209-223.

Park, I. Y., Cha, J. R., Ok, S. M., Shin, C., Kim, J. S., Kwak, H. J., Yu, Y.S., Kim, Y.K., Medina, B., Cho, S.J., Park, S.C. (2017) A new earthworm cellulase and its possible role in the innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 67: 476-480.

Plavšin, I., Velki, M., Ečimović, S., Vrandečić, K., Čosić, J. (2017) Inhibitory effect of earthworm coelomic fluid on growth of the plant parasitic fungus *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Soil Biology* 78: 1-6.

Plytycz, B., Lis-Molenda, U., Cygal, M., Kielbasa, E., Grebosz, A., Duchnowski, M., Andre, J., Morgan, A. J. (2009) Riboflavin content of coelomocytes in earthworm (*Dendrodrilus rubidus*)

field populations as a molecular biomarker of soil metal pollution. *Environmental Pollution* 157: 3042-3050.

Postma-Blaauw, M. B., Bloem, J., Faber, J. H., Van Groenigen, J. W., De Goede, R. G., Brussaard, L. (2006) Earthworm species composition affects the soil bacterial community and net nitrogen mineralization. *Pedobiologia* 50: 243-256.

Römbke, J., Garcia, M. V., Scheffczyk, A. (2007) Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 590-598.

Santocki, M., Falniowski, A., Plytycz, B. (2016) Restoration of experimentally depleted coelomocytes in juvenile and adult composting earthworms *Eisenia andrei*, *E. fetida* and *Dendrobaena veneta*. *Applied Soil Ecology* 104: 163-173.

Sekizawa, Y., Hagiwara, K., Nakajima, T., Kobayashi, H. (1996) A novel protein, lysenin, that causes contraction of the isolated rat aorta: its purification from the coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida*. *Biomedical Research* 17: 197-203.

Stephens, P. M., Davoren, C. W. (1997) Influence of the earthworms *Aporrectodea trapezoides* and *A. rosea* on the disease severity of *Rhizoctonia solani* on subterranean clover and ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 511-516.

Stephens, P. M., Davoren, C. W., Doube, B. M., Ryder, M. H., Bengner, A. M., Neate, S. M. (1993) Reduced severity of *Rhizoctonia solani* disease on wheat seedlings associated with the presence of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* 25: 1477-1484.

Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W., Russin, J. S. (2001) Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91: 120-126.

Tahseen, Q. (2009) Coelomocytes: Biology and possible immune functions in invertebrates with special remarks on nematodes. *International Journal of Zoology* 2009: 1-13.

Thevissen, K., Francois, I. E. J. A., Aerts, A. M., Cammue, B. P. A. (2005) Fungal sphingolipids as targets for the development of selective antifungal therapeutics. *Current Drug Targets* 6: 923-928.

Van Groenigen, J. W., Lubbers, I. M., Vos, H. M., Brown, G. G., De Deyn, G. B., Van Groenigen, K. J. (2014) Earthworms increase plant production: a meta-analysis. *Scientific Reports* 4: 6365.

Van Zwieten, L., Rust, J., Kingston, T., Merrington, G., Morris, S. (2004) Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils. *Science of the Total Environment* 329: 29-41.

Wang, X., Wang, X., Zhang, Y., Qu, X., Yang, S. (2003) An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization. *Biotechnology Letters* 25: 1317-1323.

Wolfarth, F., Schrader, S., Oldenburg, E., Weinert, J. (2011b) Contribution of the endogeic earthworm species *Aporrectodea caliginosa* to the degradation of deoxynivalenol and *Fusarium* biomass in wheat straw. *Mycotoxin Research* 27: 215-220.

Wolfarth, F., Schrader, S., Oldenburg, E., Weinert, J., Brunotte, J. (2011a) Earthworms promote the reduction of *Fusarium* biomass and deoxynivalenol content in wheat straw under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1858-1865.

Yanqin, L., Yan, S., Zhenjun, S., Shijie, L., Chong, W., Yan, L., Yuhong, G. (2007) Coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HeLa cells in vitro. *European Journal of Soil Biology* 43: S143-S148.

Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., Bertagnolli, B. L. (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biology and Biochemistry 34: 955-963.

Web izvor:

Web1. Catalogue of life: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., 1947.
<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/eabe4315d2e262ee8d956d19ec59dc66>
(16.2.2019.).