UTJECAJ CELOMSKE TEKUĆINE GUJAVICA NA RAST FITOPATOGENE GLJIVICE FUSARIUM OXYSPORUM

Plavšin, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:151:142990

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

Ivana Plavšin

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

UTJECAJ CELOMSKE TEKUĆINE GUJAVICA NA RAST FITOPATOGENE GLJIVICE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Plavšin

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

UTJECAJ CELOMSKE TEKUĆINE GUJAVICA NA RAST FITOPATOGENE GLJIVICE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, mentor
3. Doc. dr. sc. Sandra Ečimović, član

Osijek, 2016.

Za početak se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Karolini Vrandečić na ukazanoj prilici za izradu ovog rada, izdvojenom vremenu i prenesenom znanju.

Hvala svim članovima Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku koji su, posredno ili neposredno, doprinijeli izradi ovog rada i mom obrazovanju. Posebno hvala gospođi Rajki Latković na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala dr. sc. Mirni Velki na korisnim savjetima i podršci tijekom cijelog studija.

Hvala svim kolegama koji su bili uz mene tijekom studija, a posebno hvala kolegi i prijatelju Tomislavu.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci koju su mi pružali sve ove godine.

Sadržaj

1. UVOD **1**
1.1. Fitopatogene gljive 1
1.1.1. Rod *Fusarium* 2
1.1.1.1. Taksonomija vrste *Fusarium oxysporum* 4
1.1.1.2. Biologija vrste *Fusarium oxysporum* 5
1.1.1.3. Značaj vrste *Fusarium oxysporum* 7
1.2. Gujavice – „inženjeri“ ekoloških sustava 8
1.2.1. Celomska tekućina gujavica 9
1.2.2. Sastav celomske tekućine gujavica 10
1.3. Biološka raznolikost kao temelj zdravlja tla 11
1.4. Cilj istraživanja 12
2. PREGLED LITERATURE **13**
3. MATERIJAL I METODE **15**
3.1. Uzgoj eksperimentalnih gljivica 15
3.2. Uzgoj eksperimentalnih gujavica 15
3.3. Priprema ekstrakta celomske tekućine 16
3.4. Postavljanje eksperimenta 17
3.5. Statistička obrada podataka 18
4. REZULTATI **19**
4.1. Smanjenje porasta micelija gljivice 19
4.2. Inhibicija rasta micelija gljivice 22
5. RASPRAVA **25**
6. ZAKLJUČAK **27**
7. POPIS LITERATURE **28**
8. SAŽETAK **34**
9. SUMMARY **35**
10. POPIS TABLICA **36**
11. POPIS SLIKA **37**
12. POPIS GRAFIKONA **39**
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **40**
BASIC DOCUMENTATION CARD **41**

1. UVOD

Gljive su jedno od carstava u domeni eukariotskih organizama. Pretpostavlja se da ovom carstvu pripada oko milijun i pol vrsta od čega je do danas opisano tek oko 70 000.

Budući da ne sadrže klorofil, nemaju sposobnost samostalno se prehraniti te su stoga heterotrofni organizmi. Tijelo gljiva može biti građeno od jedne ili više stanica. Kod najprimitivnijih gljiva tijelo je gola protoplazmatska membrana – plazmodij. Kod razvijenih, tijelo je građeno od tankih, izduženih stanica – hifa. Hife rastu izduživanjem vrha i stvaraju splet koji čini vegetativno tijelo gljiva i naziva se micelij (Jurković i sur., 2010).

Gljive se razmnožavaju vegetativno (nespolno) dijeljenjem hifa i sporama (posebne strukture koje omogućavaju preživljavanje nepovoljnih uvjeta i širenje parazita tijekom vegetacijske sezone). Spolnim razmnožavanjem nastaju spore nakon spajanja fiziološki različitih spolnih stanica (gameta) (Jurković i sur., 2010).

1.1. Fitopatogene gljive

Gljive su danas najbrojniji živi uzročnici bolesti biljaka, a bolesti koje uzrokuju nazivaju se mikozama. Od približno 70000 poznatih vrsta gljiva, 10000 ih je patogeno za biljke.

Gljive koje parazitiraju biljke su mikroskopskih veličina i relativno jednostavne građe. Micelij je uglavnom smješten u unutrašnjosti biljnog tkiva, iako kod nekih vrsta može biti i na površini biljaka (epifitni micelij). Budući da nemaju sposobnost fotosinteze, gljive mogu biti saprofiti i paraziti. Paraziti mogu biti obligatni ili isključivi, koji žive isključivo na ili u živoj stanici. Fakultativni paraziti jedan dio života provode na biljci domaćinu i uzrokuju bolesti, a drugi dio života žive saprofitski.

Simptomi bolesti nakon napada fitopatogenih gljiva ovise o vrsti gljive, biljci i organu koji je zaražen, vremenu zaraze i okolišnim uvjetima. Najčešće su to pjegavost, venuće, nekroza, suha trulež i različite morfološke promjene (Kišpatić, 1992).

1.1.1. Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* obuhvaća više od 2000 vrsta među kojima prevladavaju pravi saprofiti dok je samo manji broj fakultativnih parazita koji izazivaju bolesti u svim granama biljne proizvodnje (Wolfarth i sur., 2011; Ilić i sur., 2012). Izuzetno brzo prilagođavanje na različite, pa i ekstremne uvjete, omogućila je ovom rodu fitopatogenih gljivica da se proširi na sve zemljopisne širine (Jurković, 2010).

Sve vrste roda *Fusarium* imaju dobro razvijen višestanični micelij i konidije kao organe nespolnog razmnožavanja. Konidije su jednostanične ili višestanične. Višestanične konidije oblika su kiflice. Osim konidija, formira i hlamidiospore koje uglavnom služe kao organi za preživljavanje nepovoljnih uvjeta (Jurković i sur. 2010).

Sadrži veliki broj vrsta među kojima prevladavaju saprofiti dok su ostale vrste fakultativni paraziti i žive normalno u tlu. Bolesti koje izazivaju pripadnici ovog roda nazivaju se fuzarioze (Slika 1), a često se odlikuju pojavom bijele ili ružičaste prevlake na oboljelim organima koju čine nakupine konidija. Veliki broj vrsta razvija se u provodnim elementima biljnog tkiva, uzrokujući tip oboljenja koji se naziva traheomikoza (Kišpatić, 1992).



Slika 1. Fuzarioza klipa kukuruza.

(Izvor: http://www.fermaime.com/?id=20&l=1044)

Ove gljivice se mogu razviti na gotovo svim vrstama uzgajanih biljaka (žitarice, lan, pamuk, banana, cvijeće, ukrasno bilje itd.). Mnoge vrste roda *Fusarium* razvijaju se na žitaricama na kojima izazivaju različita oboljenja (Slika 2) i mogu prouzročiti velike ekonomske gubitke. Žitarice mogu biti zaražene od trenutka klijanja pa sve do same žetve. Parazit može prodrijeti i u sjeme koje tada gubi klijavost, a može sadržavati i različite toksine koje ovi paraziti proizvode (Josifović, 1956). Toksini ovih vrsta mogu biti izuzetno štetni za zdravlje ljudi i životinja (Surai i sur., 2008).

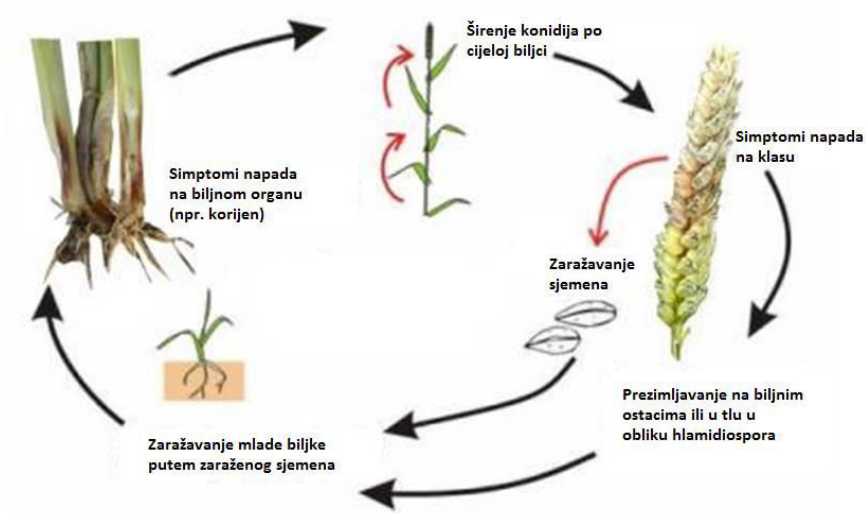


Slika 2. Fuzarioza klasa pšenice.

(Izvor: http://www.agropartner.rs/Komentari.aspx?id=23919)

Simptomi napada su različiti, a najviše ovise o vrsti domaćina, stadiju razvoja, vrsti *Fusariuma*, ali i o okolišnim uvjetima. Posljedice napada vrstama roda *Fusarium* kreću se od uvenulosti čitavih biljaka ili pojedinih biljnih dijelova, do truleži korijena, lukovica, gomolja, plodova, kloroza, pojave tumora, itd. (Nelson, 1981; Lević, 2008).

Ovi paraziti nastavljaju svoj život i nakon žetve bilo na strništu ili u tlu gdje provode saprofitski način života i prezimljavaju pri čemu ne gube sposobnost zaražavanja nove biljke u proljeće (Slika 3). Prenose se iz generacije u generaciju zaraženim sjemenom.



Slika 3. Ciklus zaražavanja biljaka vrstama roda *Fusarium*.

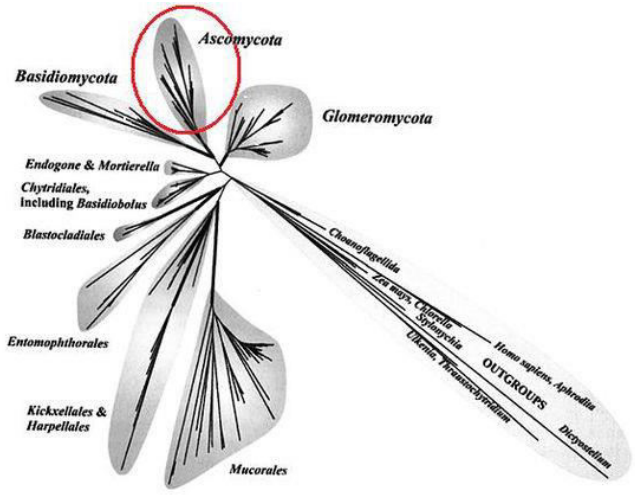
(Izvor: http://medcraveonline.com/APAR/APAR-02-00039.php)

1.1.1.1. Taksonomija vrste *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum je vrlo raširena patogena gljivica koja ima mnogo *formae speciales* (*f.sp.*). Točnije, to je skup vrsta, a može sadržavati patogene i nepatogene oblike (Gordon i Martyn, 1997; Kant i sur., 2011; McGovern, 2015).

Taksonomija vrste *F. oxysporum* je sljedeća (Slika 4):

Nadcarstvo: Eukarioti
Carstvo: Gljive (Fungi)
Koljeno: Ascomycota
Razred: Sordariomycetes
Red: Hypocreales
Porodica: Nectriaceae
Rod: *Fusarium*
Vrsta: *Fusarium oxysporum*



Slika 4. Taksonomski smještaj vrste *F. oxysporum* unutar carstva gljiva.

(Izvor: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum)

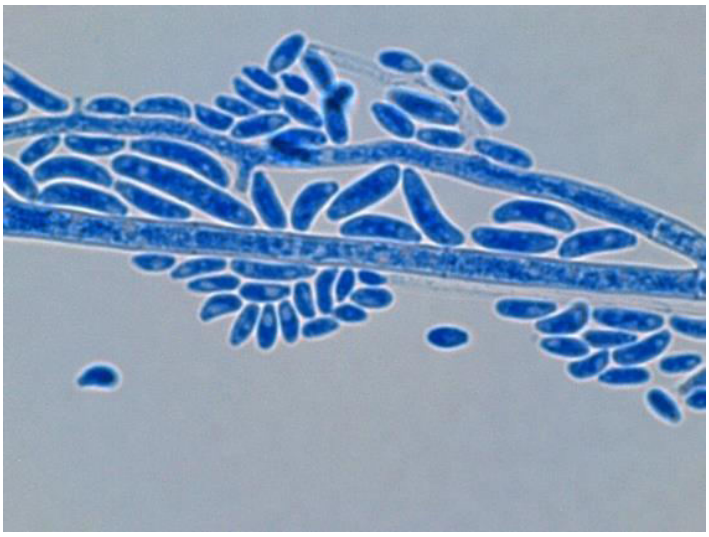
1.1.1.2. Biologija vrste *Fusarium oxysporum*

Micelij vrste *F. oxysporum* uglavnom je bijele boje iako kasnije može poprimiti i ružičastu ili ljubičastu nijansu (Slika 5). Konidije su kratke i pojedinačne. Mikrokonidije nastaju na kratkim konidioforama isključivo u lažnim glavicama, a one su najčešće jednostanične, ovalnog ili bubrežastog oblika. Makrokonidije su brojne, višestanične, blago srpasto povijene i tankih stijenki (Slika 6). Hlamidiospore su okruglog oblika, a mogu biti pojedinačne, u paru ili u nizovima (Kišpatić, 1992).



Slika 5. Micelij vrste *F. oxysporum* u kulturi.

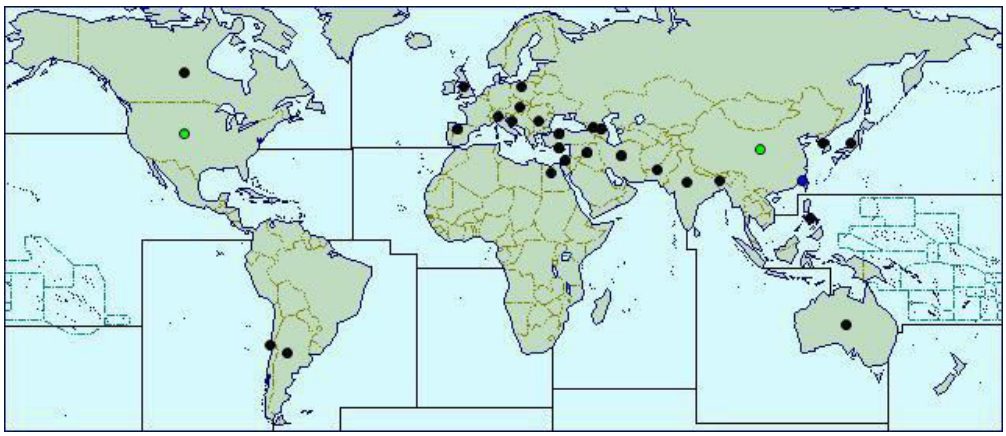
(Izvor: http://thunderhouse4-yuri.blogspot.hr/2012/06/fusarium-oxysporum.html)



Slika 6. Mikrokonidije i makrokonidije vrste *F. oxysporum* okupljene oko hife.

(Izvor: http://thunderhouse4-yuri.blogspot.hr/2012/06/fusarium-oxysporum.html)

To je kozmopolitska vrsta rasprostranjena diljem svijeta (Slika 7). Naseljavaju Sjevernu i Južnu Ameriku, Europu, Afriku, Aziju i područje Oceanije. Optimalna temperatura za rast ove gljivice u supstratu je 28°C. Neki sojevi ove vrste patogeni su i za ljude. Sposobni su proizvoditi mikotoksine koji kod ljudi mogu izazvati bolesti kao što je keratitis. Fitopatogeni oblici ove vrste mogu preživjeti i kao saprofiti u tlu pri čemu se hrane mrtvom organskom tvari do pojave biljaka koje mogu inficirati.



Slika 7. Rasprostranjenost vrste *F. oxysporum* u svijetu.

(Izvor: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum)

1.1.1.3. Značaj vrste *Fusarium oxysporum*

Različite *formae speciales* ove vrste napadaju različite vrste biljaka - krastavac, rajčicu, bundevu, pamuk, bananu, žitarice, kukuruz, rižu, itd. (Slika 8). Na napadnutim biljkama mogu uzrokovati različite promjene kao što su lisna pjegavost, fuzarijsko venuće, trulež korijena, korjenova vrata i stabljike u razini tla, cvjetnih i lisnih peteljki. Jedna je od ekonomski najvažnijih vrsta iz roda *Fusarium* budući da napada najvažnije poljoprivredne kulture: pšenicu, kukuruz i rižu, te može prouzročiti značajne ekonomske gubitke, ali i nepovoljno djelovati na zdravlje ljudi i životinja (Jurković, 2010).



Slika 8. Zaraza rajčice vrstom *F. oxysporum*.

(Izvor: http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5077046)

Borba protiv fuzarijskih bolesti je izuzetno složena jer gljivica može živjeti u tlu kao saprofit i više od 30 godina. Uglavnom se oslanja na dezinfekciju tla u uvjetima kada je to moguće, sadnju tolerantnijih kultivara, pravilan plodored, sadnju zdravog sjemena, te tretiranje tla i sadnog materijala fungicidima (De Leon i sur., 2013; Altinok i Dikilitas, 2014).

1.2. Gujavice – „inženjeri“ ekoloških sustava

Gujavice su jedna od najvažnijih životinjskih skupina tla koja snažno utječe na kemijska svojstva i strukturu tla. Mogu se pronaći diljem svijeta u šumskim, travnjačkim i antropogeniziranim staništima. Prisutnost i raznolikost zajednica gujavica na nekoj lokaciji ovisi o širokom rasponu faktora kao što su tip tla, pH vrijednost tla, kapacitet vlažnosti tla, padaline, ali ponajprije ovisi o upotrebi tla te stupnju njegove narušenosti. Prisutnost gujavica u nekom tlu znak je zdravlja tog tla.

Gujavice se prema načinu života te morfološkim i fiziološkim značajkama mogu razvrstati u tri ekološke kategorije (Slika 9) (Bouché, 1977):

- Epigejne gujavice – žive iznad mineralnog sloja tla, a ispod biljnih ostataka. Veličinom su male, tamno su pigmentirane i vrlo mobilne. Hrane se raspadnutim biljnim materijalom ili drugom organskom tvari.
- Endogejne gujavice – kopaju plitke vodoravne hodnike u tlu koji nisu trajni. Uglavnom nisu značajnije pigmentirane, sporo se kreću, a mogu biti različitih veličina.
- Anecične gujavice – žive u trajnim okomitim hodnicima u mineralnom sloju tla, do 3 m dubine. Vrste iz ove skupine su tamno pigmentirane na dorzalnoj strani tijela.



Slika 9. Ekološke kategorije gujavica i njihov razmještaj u tlu.

(Izvor: http://www.agresearch.co.nz/news/earthworms-in-new-zealand-pastures/)

Gujavice se smatraju „inženjerima“ ekoloških sustava zbog uloga koje imaju u održavanju strukture tla i procesu bioturbacije. One svojom aktivnošću utječu na fragmentaciju, razgradnju i inkorporaciju organske tvari, utječu na formiranje slojeva tla i raspoloživost hranjivih tvari biljkama (Edwards, 2004). Gujavice ovise o mikroorganizmima kao važnom izvoru hranjivih tvari te povećavaju mikrobnu aktivnost razlažući organsku tvar, a svojim kretanjem kroz tlo utječu na disperziju mikroorganizama kroz čitav profil tla. Imaju vrlo važan utjecaj na strukturu, plodnost i produktivnost tla. Prodiru u tlo čime povećavaju poroznost tla i miješaju različite slojeve tla. Osim toga, gujavice imaju važnu ulogu u gospodarenju okolišem te služe kao indikatori onečišćenja nekog područja.



Slika 10. Rahljenje tla gujavicama.

(Izvor: https://reforestation.me/earthworms-vermicompost/)

1.2.1. Celomska tekućina gujavica

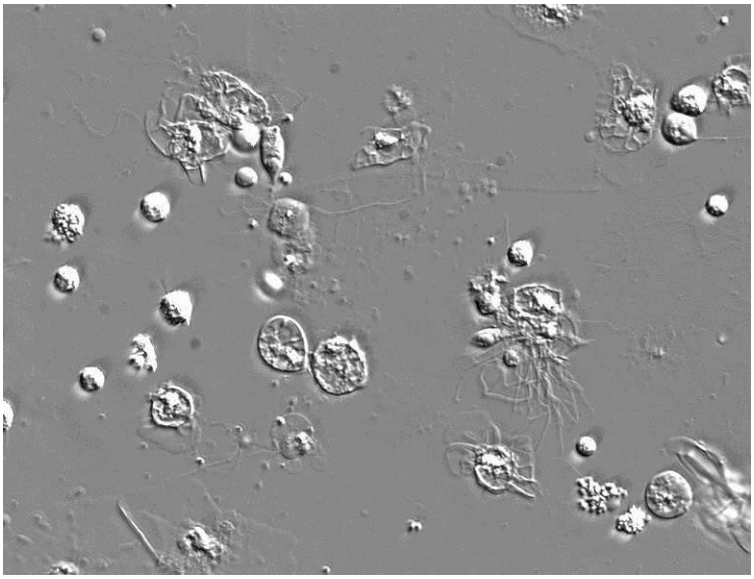
Celomska tekućina gujavica dio je hidrostatskog kostura ovih organizama. Ispunjava celom – sekundarnu tjelesnu šupljinu. Ima važnu ulogu u mnogim funkcijama organizma kao što su pokretanje i osmoregulacija, izmjena plinova i hranjivih tvari između organa, služi kao potpora unutrašnjim organima, ali i kao spremište spolnih stanica tijekom sazrijevanja. U stresnim uvjetima gujavice mogu izbaciti dio celomske tekućine kroz otvore na dorzalnoj strani tijela (Slika 11). Celomska tekućina ima ulogu u obrani organizma od predatora, ali i ulogu u zaštiti organizma od različitih patogena.



Slika 11. Izbacivanje celomske tekućine kod vrste *E. fetida* (originalna fotografija).

1.2.2. Sastav celomske tekućine gujavica

Celomska tekućina gujavica sadrži celomocite – imunološke stanice (Slika 12), ali i mnoge druge biološki aktivne molekule kao što su lizozimi i nekoliko vrsta proteina (lumbricin I, fetidini) s antimikrobnim svojstvima koji posjeduju snažnu proteolitičku i citolitičku aktivnost (Bilej i sur., 1991).



Slika 12. Različite vrste celomocita u celomskoj tekućini gujavica.

(Izvor: https://logansciencejournalism.wordpress.com/page/6/)

Celomociti imaju ulogu u eliminaciji stranih čestica koje dospiju u organizam (bakterija, virusa itd.), a osim toga sudjeluju i u sintezi i izlučivanju zaštitnih imunoloških molekula u samu celomsku tekućinu. S obzirom na morfologiju i funkciju, celomociti mogu biti iznimno različiti. Ipak, mogu se izdvojiti dvije glavne skupine – amebociti i eleociti.

Amebociti su stanice s velikim brojem različitih funkcija, uglavnom uključeni u reakcije obrane organizma kao što su fagocitoza stranih čestica i upalni procesi (Adamowicz, 2005). Dokazano je da amebociti jedan s drugim stvaraju nakupine te da kao takvi mogu zadržati vijabilnost čak i do nekoliko dana u *in vitro* uvjetima (Dales, 1993). S druge strane, eleociti ne formiraju nakupine i uglavnom su uključeni u procese sinteze i izlučivanja drugih obrambenih molekula.

1.3. Biološka raznolikost kao temelj zdravlja tla

Biološka raznolikost označava svu raznolikost života, te raznolikost krajobraza u kojima se ogleda međuodnos prirode, ali i ljudskih djelatnosti. Međutim, uplitanje ljudskih djelatnosti u ravnotežu prirode rezultiralo je njezinim narušavanjem te ugrožavanjem biološke raznolikosti, a posebno biološke raznolikosti tla. Kao jedan od razloga ugroženosti navodi se i konvencionalna poljoprivredna proizvodnja, odnosno prvenstveno neracionalno gospodarenje tlom, njegovo prekomjerno iskorištavanje ili pak zagađenje agrokemikalijama.

U davnijoj prošlosti, negativan utjecaj poljoprivrede na biološku raznolikost bio je doista minimalan. Ipak, posljednjih stotinjak godina stanje bioraznolikosti tla mijenja se na lošije što je prvenstveno posljedica osuvremenjivanja i intenziviranja poljoprivrede. U suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji prilikom zaštite bilja dominiraju još uvijek kemijske mjere zaštite, odnosno korištenje različitih kemijskih sredstava ili pesticida.

Posljednjih desetak godina jača globalna svijest čovječanstva o važnosti biološke raznolikosti. Sve se više pokušavaju pronaći alternativni načini zaštite biljaka kako bi se smanjila količina sintetičkih pesticida koji dospijevaju u okoliš, a za koje je dokazano da imaju negativan utjecaj na brojnost i raznovrsnost korisnih organizama tla. Kako je dokazano da velika biološka raznolikost tla, a posebice velika raznolikost i brojnost

gujavica u tlu, povoljno utječe na zdravlje tla i pojavu biljnih bolesti, poljoprivredne aktivnosti u budućnosti bi se trebale više obazirati na očuvanje biološke raznolikosti tla.

1.4. Cilj istraživanja

Pretpostavka koja je prethodila ovom istraživanju bila je ta da, osim dokazanog negativnog utjecaja probavila na rast fitopatogenih gljivica, i celomska tekućina pokazuje inhibicijski učinak na rast gljivica tla. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio proučiti utjecaj celomske tekućine gujavica na rast fitopatogenih gljivica.

U istraživanju su korištene dvije vrste gujavica, *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*, te gljivica *Fusarium oxysporum* koja je iznimno važna vrsta u pogledu poljoprivredne proizvodnje. Zaključci ovog istraživanja mogli bi imati značajan doprinos u razvoju alternativnih metoda zaštite tla i bilja.

2. PREGLED LITERATURE

Fusarium oxysporum je vrsta koja parazitira na velikom broju biljnih vrsta, a smatra se jednom od ekonomski najvažnijih gljivica (Altinok i Dikilitas, 2014; Ilić i sur., 2013; Ivić et al i sur., 2009; Nelson, 1981). Vrste roda *Fusarium*, njihov veliki fitopatogeni potencijal kao i rasprostranjenost već su dugi niz godina predmet istraživanja (Tomasović, 1987; Stoilova i Chavdavar, 2006; Sever i sur., 2012).

Među najviše proučavanim organizmima tla su i gujavice zbog njihove neupitne uloge kao „inženjera" ekosustava. One imaju važnu ulogu kao primarni i sekundarni razlagači, a osim toga utječu i na mijenjanje strukture tla i vodo-zračnih odnosa u tlu (Lee, 1985; Edwards i Bater, 1992; Zaller i sur., 2014).

Velik broj istraživanja u posljednje vrijeme je pokazalo da postoji pozitivna korelacija između povećanja bioraznolikosti i biološke aktivnosti tla te smanjenja pojave biljnih bolesti (Moody, 1996; Beylichet i sur., 2010; Médiene i sur., 2011). Kako navode Schrader i sur. (2013), kroz dobru poljoprivrednu praksu i očuvanje bioraznolikosti tla moguće je značajno smanjiti pojavu bolesti biljaka, a posebno onih izazvanih vrstama roda *Fusarium.* Naime, interakcije različitih zajednica organizama tla igraju značajnu ulogu u supresiji i razgradnji različitih gljivica u tlu. U tom pogledu možda najvažniju ulogu igraju gujavice koje na tlo i gljivice u tlu utječu na različite načine – od mijenjanja fizikalnih i kemijskih čimbenika njihovog okoliša do te mjere da im je onemogućeno preživljavanje, do direktne ingestije gljivica (Daube i sur., 1994; Stephens i sur., 1994; Jones i sur., 1997; Wolfarth, 1997; Tiunov i Scheu, 2000; Enami i sur., 2001; Koubova i sur., 2015).

Ranija istraživanja pokazala su da gujavice posjeduju sposobnost smanjenja pojave bolesti prouzročenih različitim gljivicama kao što su *Rizoctonia solani* i *Geaumannomyces gramminis* na način da smanjuju njihov fitopatogeni potencijal iako točan mehanizam još nije poznat (Whipps, 1997; Bonkowski i sur., 2000). Osim toga, nekoliko autora zabilježilo je da tekućina iz probavila gujavica pokazuje značajan negativan utjecaj na porast gljivica u tlu te da značajno smanjuje vijabilnost spora gljivica (Byzov i sur, 2007). Brown (1995) je dokazao da se sposobnost klijanja spora nekih gljivica iz roda *Fusarium* značajno smanjuje nakon prolaska kroz probavilo gujavice, iako su u normalnim uvjetima sposobne preživjeti u tlu i do nekoliko godina.

Također, važno je spomenuti da je velik broj dosadašnjih istraživanja dokazao da su gljivice, a posebno one iz roda *Fusarium*, među najpoželjnijim izvorima hrane za gujavice (Edwards i Fletcher, 1988; Moody i sur., 1995; Bonkowski i sur., 2000; Aira i sur., 2002, Oldenburg i sur., 2008).

Osim direktnog utjecaja probavila gujavica na razmnožavanje gljivica, u obzir se treba uzeti i mogućnost indirektnog utjecaja gujavica kontaktom odnosno putem celomske tekućine (Homa i sur., 2008; Santocki i sur., 2015). Celomska tekućina sadrži celomocite čija je sposobnost fagocitoze različitih stranih čestica također dokazana (Bilej i sur., 1991; Kasschau i sur., 2007). Mnogi istraživači su dokazali da, osim celomocita, celomska tekućina sadrži i različite biološki aktivne komponente koje pokazuju antimikrobno, proteolitičko i hemolitičko djelovanje (Dales i Kalac, 1992; Bilej i sur., 1995; Fiolka i sur., 2012).

Korištenje tolerantnijih kultivara i kemijska zaštita biljaka danas su među najefikasnijim načinima suzbijanja infekcija vrstama roda *Fusarium*. Iako se pokazalo iznimno učinkovitim, korištenje agrokemikalija u zaštiti bilja ipak ostavlja dugotrajne posljedice za ekosustav – dovodi to povećanja rezistentnosti u ciljanim organizmima, nepovoljno djeluje na neciljane organizme, te nepovratno uništava okoliš (Schrader i sur., 2013). Stoga se danas sve jači naglasak stavlja na pronalazak jednako učinkovitih alternativnih rješenja u zaštiti bilja. S obzirom na značajnu ulogu gujavica u tlu i njihovu interakciju s gljivicama, Friberg i sur. (2005) navode da bi gujavice mogle imati važnu ulogu u alternativnim načinima zaštite biljaka i tla od patogena.

Iako je proučavanje interakcija između gujavica i gljivica u tlu u posljednje vrijeme dobilo na značaju, još uvijek se nedovoljno zna o mehanizmima utjecaja. O utjecaju celomske tekućine i celomocita gotovo da nema nikakvih podataka. Koliko je poznato, ovo je prvo istraživanje koje se bavi utjecajem celomske tekućine gujavica na rast fitopatogenih gljivica.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzgoj eksperimentalnih gljivica

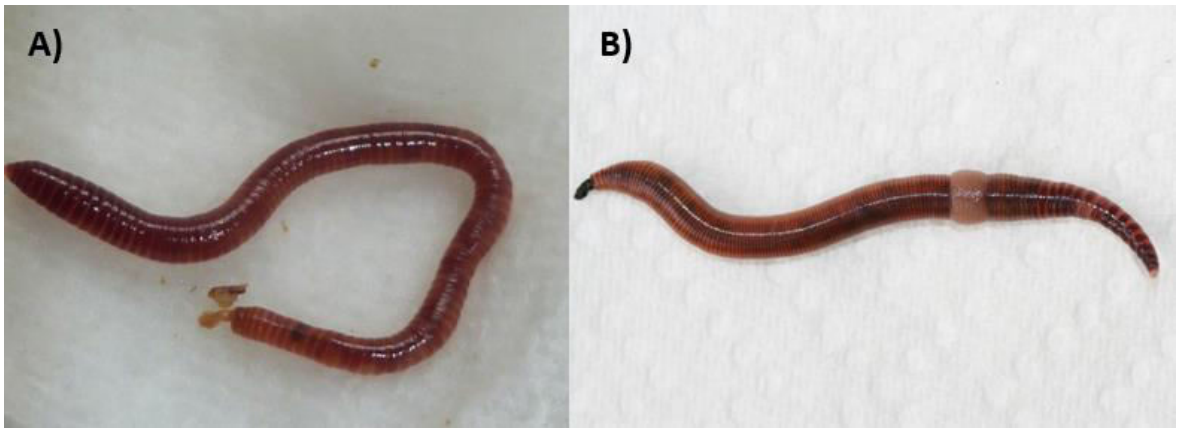
Za potrebe ovog istraživanja korištene su kulture gljivica vrste *Fusarium oxysporum* (Slika 13) koje su uzgojene u laboratoriju Zavoda za zaštitu bilja Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku. Točnije, korišten je izolat FT4 vrste *Fusarium oxysporum*. Gljivice su uzgajane u Petrijevim zdjelicama na hranjivoj podlozi (PDA) te držane u uzgojnim komorama pri 22 ± 1°C te na 12h noći:12h dana svjetlosnom režimu. Kulture su presađivane svakih nekoliko tjedana dok nisu korištene.



Slika 13. Kolonija vrste *F. oxysporum* (originalna fotografija).

3.2. Uzgoj eksperimentalnih gujavica

U ovom istraživanju korištene su dvije vrste gujavica – *Eisenia fetida* (Slika 14.A) i *Dendrobaena veneta* (Slika 14.B). Gujavice su pribavljene od mjesnog uzgajivača te su nakon toga držane u laboratoriju u mješavini stajskog gnojiva kao supstratu. Za istraživanje su korištene samo odrasle gujavice s dobro razvijenim i vidljivim klitelumom. Prije samog korištenja, gujavice su isprane u fiziološkoj otopini za gujavice, izvagane te ostavljene na komadu filter papira u Petrijevoj zdjelici do korištenja. Prosječna težina gujavica vrste *Eisenia fetida* iznosila je 0,22 ± 0,06 g, dok je za vrstu *Dendrobaena veneta* prosječna težina iznosila 1,04 ± 0,21 g.

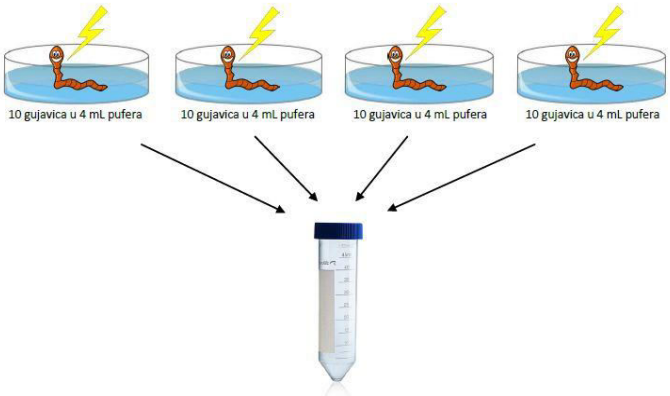


Slika 14. Gujavice: A) *Eisenia fetida*; B) *Dendrobaena veneta*.

(Izvor: http://www.caudata.org/forum/f1173-advanced-newt-salamander-topics/f11-food-live-frozen-freeze-dried-pell ets-etc/f17-earthworms-nightcrawlers-etc/57441-worm-bins.html)

3.3. Priprema ekstrakta celomske tekućine

Kako bi se prikupila celomska tekućina, gujavice su stavljene u fiziološku otopinu za gujavice te podvrgnute izvoru struje kako bi uslijed snažnog vanjskog podražaja izbacile celomsku tekućinu i celomocite. Gujavice su najprije isprane u fiziološkoj otopini i izvagane svaka zasebno. Deset odraslih gujavica vrste *Eisenia fetida* stavljeno je jedna po jedna u Petrijevu zdjelicu s 4 mL fiziološke otopine (Slika 15) te su potom tretirane strujom tijekom 30 sekundi koristeći modificirani punjač na način da su obje elektrode prislonjene na tijelo gujavice. Za vrstu *Dendrobaena veneta* korišteno je 5 gujavica u jednakom volumenu fiziološke otopine kroz jednako vrijeme kao i u slučaju vrste *E. fetida*. Nakon što su gujavice izbacile dio celomske tekućine, ona je prikupljena te držana na ledu do korištenja.



Slika 15. Shematski prikaz plana prikupljanja celomske tekućine vrste *E. fetida* (originalna fotografija).

Korištene gujavice su ostavljene u posebnoj posudi s hranjivim supstratom kako bi se oporavile. Nakon prikupljanja celomske tekućine, određena je približna koncentracija celomocita prebrojavanjem pod mikroskopom koristeći Bürker-Türkovu komoricu (Slika 16). Ekstrakti celomske tekućine obje vrste su zatim razrijeđene fiziološkom otopinom kako bi se dobile približne koncentracije od 1000, 1500, 2250, 4000 i 4500 celomocita/mL.



Slika 16. Bürker-Türkova komorica korištena za prebrojavanje celomocita (originalna fotografija).

3.4. Postavljanje eksperimenta

Utjecaj celomske tekućine na rast gljivice *Fusarium oxysporum* ispitan je tako da su pripremljeni svježi ekstrakti celomske tekućine (kao što je opisano u potpoglavlju 3.3.) za svaku vrstu gujavica zasebno. Budući da je najviša koncentracija koja je dobivena iznosila 4500 celomocita/mL, a preliminarni testovi su pokazali da se korištenjem ekstrakta koncentracije 1000 celomocita/mL ne dobiva željeni učinak, za konačni eksperiment korištene su koncentracije u tom rasponu, odnosno koncentracije od 1000, 1500, 2250, 4000 i 4500 celomocita/mL.

U konačnom eksperimentu korištene su sterilne plastične Petrijeve zdjelice promjera 5,8 cm. Svaka Petrijeva zdjelica ispunjena je s 5 mL hranjive podloge koja je, nakon hlađenja, inokulirana gljivicom na način da je iz kulture izrezan dio micelija promjera 4 mm te postavljen u sredinu nove hranjive podloge sterilnim priborom. Inokulati su zatim tretirani različitim koncentracijama celomske tekućine obje vrste gujavica zasebno u volumenu od 1 mL. Kontrola je tretirana jednakim volumenom fiziološke otopine kako bi se opovrgnuo mogući utjecaj same fiziološke otopine na rast gljivice.

Za različite koncentracije ekstrakta celomske tekućine svake vrste gujavica i kontrolu zasebno učinjeno je 5 neovisnih replika, a sam eksperiment ponovljen je 4 puta. Nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine ili fiziološkom otopinom, Petrijeve zdjelice su ostavljene u uzgojnoj komori pri temperaturi od 22 ± 1°C i svjetlosnom režimu od 12h noći:12h dana. Porast gljivice praćen je tako da je mjeren promjer zračnog micelija 24, 48 i 72 sata nakon inokulacije i tretmana.

3.5. Statistička obrada podataka

Inhibicija rasta gljivice praćena je mjereći promjer zračnog micelija 24, 48 i 72 sata nakon inokulacije i tretmana. Statistička obrada podataka provedena je koristeći R program za statističku obradu podataka, verzija 3.0.2 (R Development Core Team, 2011). Statistička značajnost dobivenih rezultata ispitana je koristeći ANOVA test te parametarski Tukey test višestrukog uspoređivanja. Korištena je 5%-tna razina značajnosti rezultata ($p<0.05$).

4. REZULTATI

4.1. Smanjenje porasta micelija gljivice

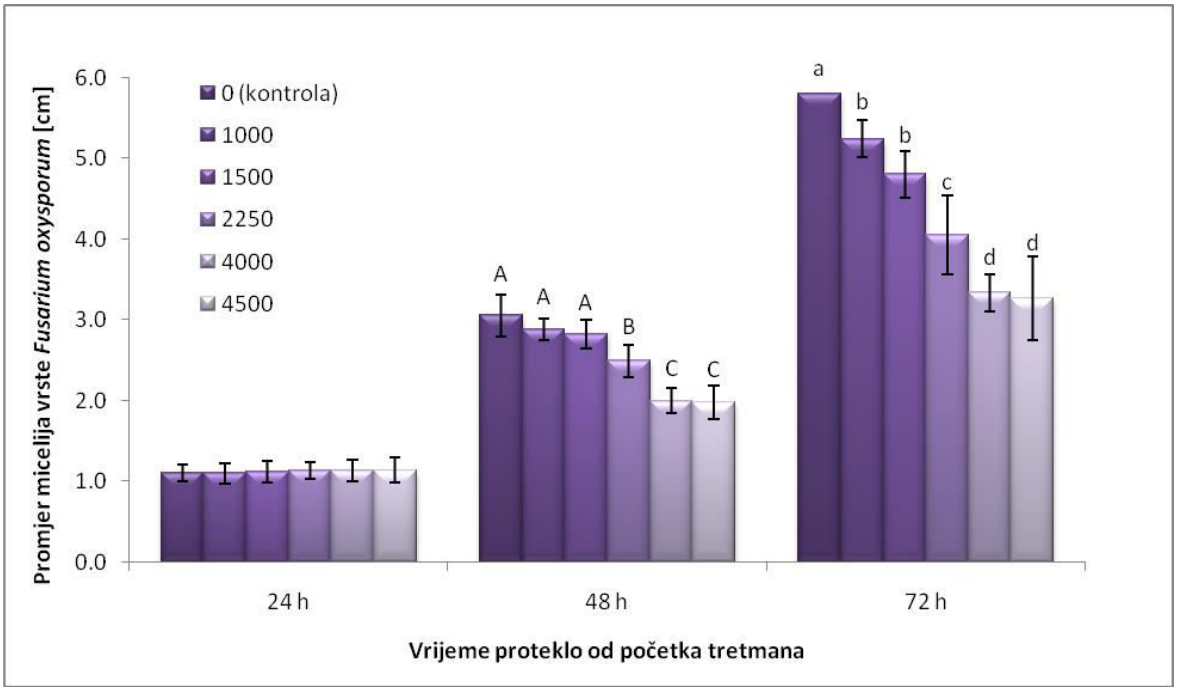
Utjecaj ekstrakta celomske tekućine dviju vrsta gujavica, *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*, na rast fitopatogene gljivice *Fusarium oxysporum* ispitan je mjereći promjer zračnog micelija gljivice 24, 48 i 72 sata nakon tretmana različitim koncentracijama celomske tekućine. Rezultati porasta zračnog micelija nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine vrste *E. fetida* prikazani su Tablici 1 te na Grafikonu 1, dok su rezultati utjecaja celomske tekućine vrste *D. veneta* prikazani u Tablici 2 te na Grafikonu 2. Nisu zabilježene statistički značajne razlike u utjecaju na rast gljivice između ekstrakata različitih vrsta gujavica.

Tablica 1. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Eisenia fetida*. Brojke predstavljaju srednju vrijednost promjera u centimetrima ± standardna devijacija.

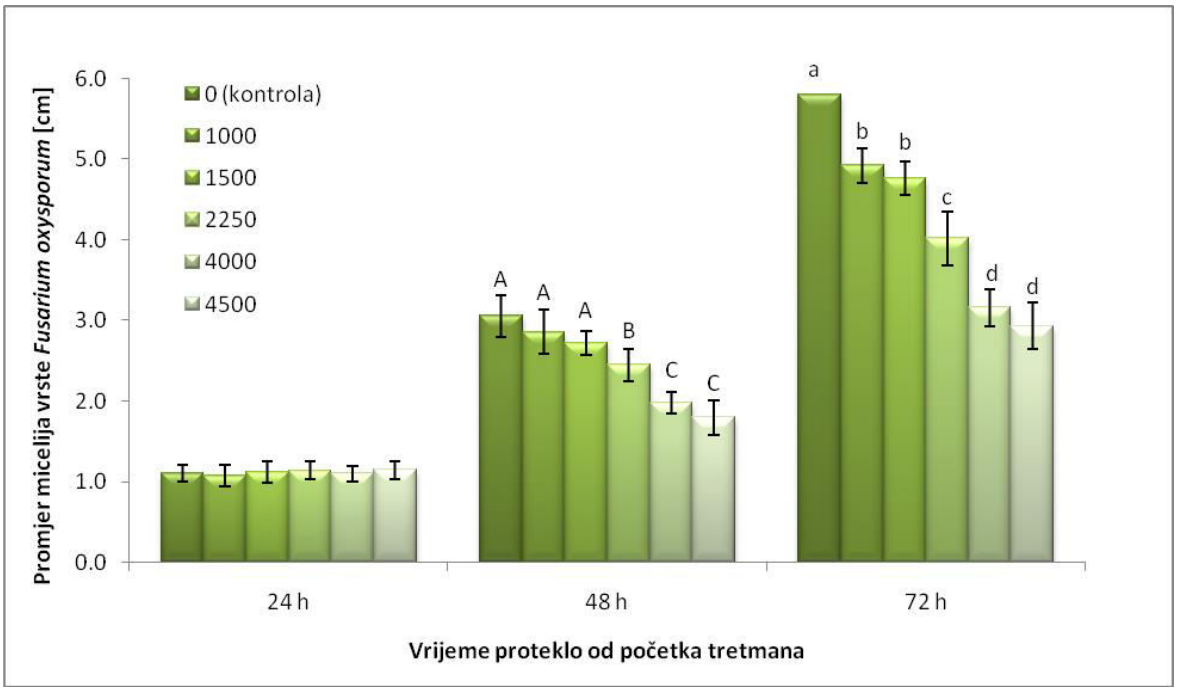
Proteklo vrijeme	Koncentracija celomocita [br. stanica / mL]					
	0 (kontrola)	1000	1500	2250	4000	4500
24 h	1,11 ± 0,10	1,10 ± 0,12	1,12 ± 0,13	1,13 ± 0,11	1,14 ± 0,13	1,14 ± 0,16
48 h	3,06 ± 0,26	2,88 ± 0,13	2,82 ± 0,18	2,49 ± 0,19	2,00 ± 0,16	1,98 ± 0,20
72 h	5,8	5,24 ± 0,23	4,80 ± 0,29	4,05 ± 0,48	3,34 ± 0,23	3,27 ± 0,52

Tablica 2. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Dendrobaena veneta*. Brojke predstavljaju srednju vrijednost promjera u centimetrima ± standardna devijacija.

Proteklo vrijeme	Koncentracija celomocita [br. stanica / mL]					
	0 (kontrola)	1000	1500	2250	4000	4500
24 h	1,11 ± 0,10	1,08 ± 0,13	1,12 ± 0,13	1,14 ± 0,11	1,10 ± 0,10	1,15 ± 0,11
48 h	3,06 ± 0,26	2,86 ± 0,27	2,72 ± 0,15	2,45 ± 0,20	1,98 ± 0,13	1,80 ± 0,21
72 h	5,80	4,92 ± 0,22	4,76 ± 0,21	4,02 ± 0,33	3,16 ± 0,23	2,93 ± 0,29



Grafikon 1. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Eisenia fetida*.



Grafikon 2. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Dendrobaena veneta*.

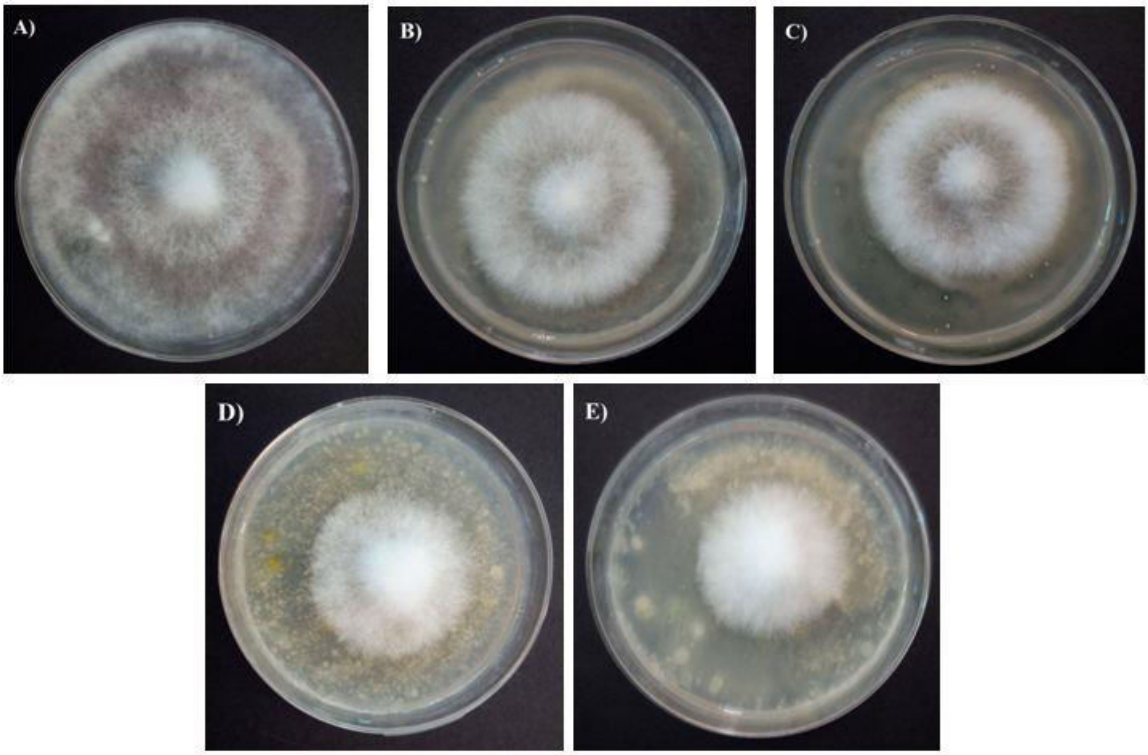
Prema podacima prikazanima u Tablici 1 i 2 te na Grafikonu 1 i 2, 24 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine nisu zabilježene statistički značajne razlike između kontrolne grupe i tretiranih grupa. Početni porast micelija bio je podjednak nakon tretmana fiziološkom otopinom i bilo kojom od koncentracija celomske tekućine.

Prvi znakovi zaostajanja u porastu pojavili su se tek 48 sati nakon tretmana, ali ne za sve koncentracije celomske tekućine. Nakon tretmana celomskom tekućinom u koncentracijama od 1000 i 1500 celomocita/mL zabilježeno je tek neznatno smanjenje porasta zračnog micelija gljivice dok je statistički značajno smanjenje porasta zabilježeno tek nakon tretmana celomskom tekućinom u koncentracijama od 2250, 4000 i 4500 celomocita/mL (Grafikon 1 i 2).

72 sata nakon tretmana smanjenje porasta micelija bilo je još jače izraženo (Grafikon 1 i 2). Gljivice u svim kontrolnim grupama prerasle su cijelu površinu Petrijeve zdjelice tijekom 72 sata (Slika 17.A) te zbog toga na Grafikonu 1 i 2 nisu naznačene standardne devijacije za podatke kontrolne grupe nakon 72 sata od tretmana.

Za razliku od rezultata dobivenih 48 sati nakon tretmana, u slučaju rezultata 72 sata nakon tretmana zabilježeno je statistički značajno smanjenje porasta micelija čak i nakon tretmana celomskom tekućinom u koncentracijama od 1000 i 1500 celomocita/mL u odnosu na kontrolu iako između te dvije koncentracije nisu zabilježene statistički značajne razlike.

Kao i u slučaju nakon 48 sati, i 72 sata nakon tretmana celomska tekućina u koncentracijama od 2250 (Slika 17.B i 17.D), 4000 i 4500 (Slika 17.C i 17.E) celomocita/mL uzrokovala je statistički značajno smanjenje porasta micelija iako između dviju najvećih koncentracija (4000 i 4500 celomocita/mL) nisu zabilježene statistički značajne razlike.



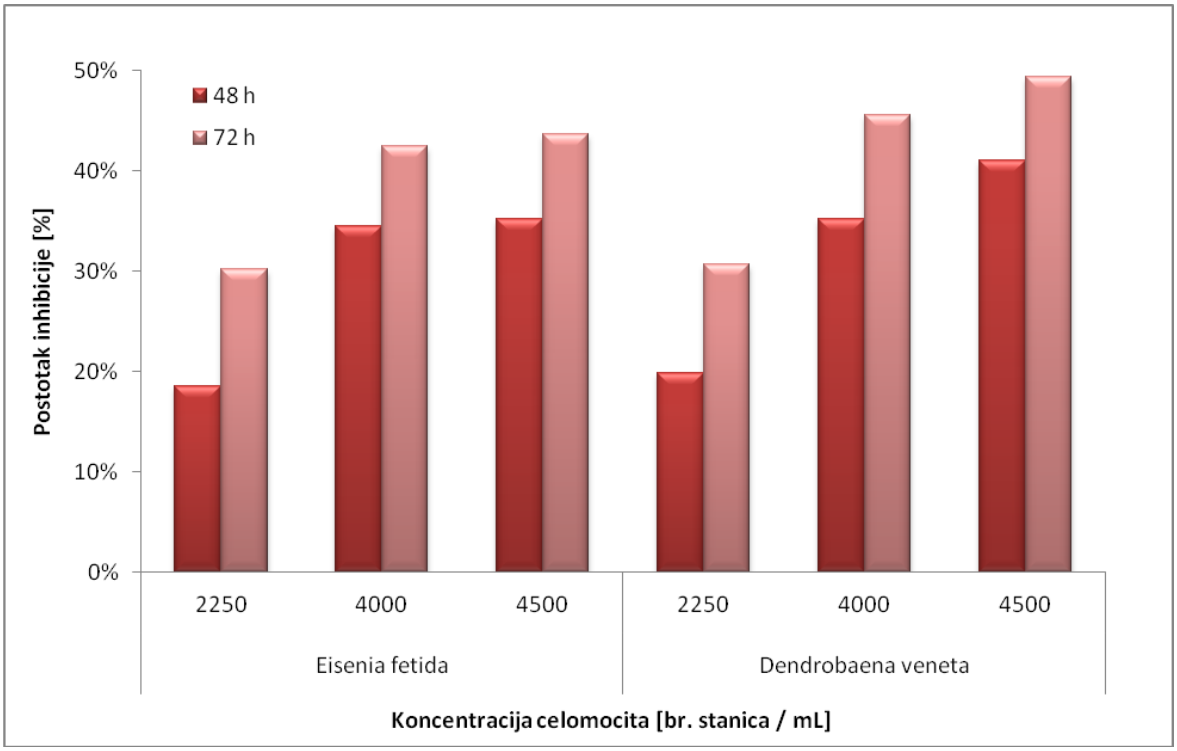
Slika 17. Izgled micelija gljivice *Fusarium oxysporum* nakon 72 sata od početka tretmana: A) fiziološkom otopinom; B) celomskom tekućinom gujavice *E. fetida* u koncentraciji 2250 celomocita/mL; C) celomskom tekućinom gujavice *D. veneta* u koncentraciji 2250 celomocita/mL; D) celomskom tekućinom gujavice *E. fetida* u koncentraciji 4500 celomocita/mL; E) celomskom tekućinom gujavice *D. veneta* u koncentraciji 4500 celomocita/mL (originalne fotografije).

4.2. Inhibicija rasta micelija gljivice

Kako bi se što vjerodostojnije prikazali rezultati utjecaja celomske tekućine gujavica na rast gljivice *F. oxysporum,* za tri najveće koncentracije izračunat je i postotak inhibicije rasta 48 i 72 sata nakon početka tretmana. Podaci za inhibiciju rasta prikazani su u Tablici 3 i na Grafikonu 3.

Tablica 3. Relativne vrijednosti smanjenja rasta – postotak inhibicije porasta zračnog micelija vrste *Fusarium oxysporum* 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktima celomskih tekućina gujavica.

	Koncentracija celomocita [br. stanica / mL]					
Proteklo vrijeme	***Eisenia fetida***			***Dendrobaena veneta***		
	2250	**4000**	**4500**	**2250**	**4000**	**4500**
48 h	18,5%	34,5%	35,2%	19,8%	35,2%	41,1%
72 h	30,2%	42,4%	43,7%	30,7%	45,5%	49,4%



Grafikon 3. Postotak inhibicije porasta zračnog micelija vrste *Fusarium oxysporum* 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktima celomskih tekućina gujavica.

Iako nisu zabilježene statistički značajne razlike u porastu nakon tretmana celomskom tekućinom različitih gujavica, razlike su ipak vidljive kad se rezultati prikažu u obliku postotka u kojem ekstrakti inhibiraju rast gljivice.

Zabilježene razlike između ekstrakata različitih gujavica sežu do 5,9%. Inhibicija rasta bila je gotovo jednaka za obje vrste gujavica nakon tretmana ekstraktom u koncentraciji od 2250 celomocita/mL 48 sati poslije (18,5% za *E. fetida* i 19,8% za *D. veneta*) te nakon tretmana istom koncentracijom 72 sata poslije (30,2% i 30,7%). I nakon tretmana celomskom tekućinom koncentracije 4000 celomocita/mL inhibicija rasta 48 sati poslije bila je podjednaka za obje vrste gujavica (34,5% i 35,2%) dok je 72 sata poslije zabilježena nešto veća razlika (42,4% i 45,5%). Najveća inhibicija rasta zabilježena je nakon tretmana celomskom tekućinom u koncentraciji od 4500 celomocita/mL te je za vrijeme od 48 sati iznosila 35,2% i 41,1% za vrste *E. fetida* i *D. veneta* redom, dok je za vrijeme od 72 sata inhibicija rasta bila još izraženija te je iznosila 43,7% i 49,4%.

Iz ovih je rezultata vidljivo da je najveća razlika u inhibiciji rasta između celomskih tekućina dviju vrsta gujavica zabilježena nakon tretmana celomskom tekućinom u najvećoj koncentraciji (4500 celomocita/mL) i to 48 sati poslije. Iako su razlike gotovo zanemarive, iz ovih je podataka vidljivo da celomska tekućina vrste *D. veneta* uzrokuje nešto jaču inhibiciju rasta gljivice u odnosu na celomsku tekućinu vrste *E. fetida*.

5. RASPRAVA

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj celomskih tekućina dvije vrste gujavica, *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*, na rast fitopatogene gljivice *Fusarium oxysporum*. Rezultati su pokazali da celomska tekućina obje vrste ima negativan utjecaj na rast gljivice tijekom 3 dana od početka tretmana. Navedeni rezultati značajni su jer ukazuju na mogućnost da gujavice u tlu mogu kontrolirati rasprostranjenost fitopatogenih gljivica te na taj način spriječiti razvoj i širenje biljnih bolesti koje prouzrokuju.

Ranija istraživanja dokazala su da gujavice utječu na gljivice u tlu na način da ih preferiraju kao izvor hrane (Bonkowski i sur., 2000) te one prolaskom kroz probavilo gujavice gube sposobnost razmnožavanja i fitopatogeni potencijal (Aira i sur., 2002; Byzov i sur., 2007; Fiolka i sur., 2010). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju da gujavice, osim što ingestijom utječu na rasprostranjenost gljivica tla, također mogu djelovati i kontaktno putem izlučivanja celomske tekućine u okolno tlo. Koliko je poznato, ovo je prvo istraživanje koje se bavi utjecajem celomske tekućine gujavica na rast fitopatogenih gljivica u *in vitro* uvjetima.

Kako je već ranije navedeno, gujavice u stresnim uvjetima izbacuju celomsku tekućinu u okolno tlo. Celomska tekućina dio je hidrostatskog skeleta gujavica i ima važnu ulogu u održavanju homeostaze organizma. Sadrži celomocite – imunološke stanice gujavica, te mnoge druge tvari za koje je dokazano da posjeduju antimikrobna svojstva (Bilej i sur., 1990; Kurek i sur., 2007; Macsik i sur., 2015).

Ranija istraživanja dokazala su da celomska tekućina sadrži tvari koje negativno utječu na rast bakterija i gljivica kao što su lumbricin I i fetidini (Cho i sur., 1998; Dales i Kalac, 1992; Kobayashi i sur., 2004; Fiolka i sur., 2012). Osim toga, postoje dokazi da celomska tekućina vrste *Eisenia fetida* može razoriti stanice raka sisavaca (Bilej i sur., 1995; Kauschke i sur., 2001).

Rezultati ovog istraživanja pružaju važne informacije o interakcijama gujavica i gljivica u tlu. Naime, dokazano je da celomska tekućina gujavica pokazuje značajan negativan utjecaj na rast fitopatogene gljivice *Fusarium oxysporum* u *in vitro* uvjetima što je važno s ekološkog aspekta. U današnje vrijeme raste i ljudska svijest o štetnosti agrokemikalija te se zbog toga javlja potreba za razvojem alternativnih metoda zaštite biljaka kako bi se smanjila količina pesticida koji dospijevaju u okoliš.

Opće je poznato, ali i dokazano brojnim ranijim istraživanjima, da gujavice kao „inženjeri“ ekoloških sustava igraju važnu ulogu u zdravlju samog tla. Povoljno utječu na razvoj korisnih mikroorganizama i samu strukturu tla dok negativno utječu na fitopatogene vrste mikroorganizama. Pretpostavka ovog istraživanja je da velika brojnost i raznovrsnost gujavica u tlu može iznimno povoljno utjecati na zdravlje i funkcionalnost tla te pomoći u suzbijanju biljnih patogena. Iako je negativan utjecaj celomske tekućine gujavica na rast fitopatogene gljivice *F. oxysporum* ovim istraživanjem dokazan, svakako je potrebno provesti i dodatna istraživanja koja bi uključivala različite vrste i rodove fitopatogenih gljivica te različite ekološke skupine gujavica budući da su u ovom istraživanju korištene isključivo epigejne gujavice. Budući da je ovakav učinak celomske tekućine ispitan samo u *in vitro* uvjetima, poželjno bi bilo da se učinak ispita i u *in vivo* uvjetima npr. tretiranjem inokuliranog tla ekstraktom celomske tekućine gujavica ili poticanjem gujavica u tlu da ispuštaju više celomske tekućine. Osim toga, nije poznato na koji način celomska tekućina ispoljava svoje djelovanje – putem celomocita, ostalih bioaktivnih molekula ili je pak riječ o zajedničkom djelovanju obje komponente, pa su i s tog aspekta potrebna dodatna istraživanja.

Uzimajući u obzir sve gore navedeno, očuvanje i poticanje rasta populacija gujavica u tlu može poslužiti kao dobra alternativa prekomjernom korištenju pesticida te pomoći u razvoju održive poljoprivredne prakse. Stoga je potrebno provesti mjere zaštite gujavica u tlu, a posebno na poljoprivrednim tlima, te koristiti agrotehničke mjere koje će u manjoj mjeri negativno utjecati na brojnost i bioraznolikost gujavica u odnosu na tradicionalno korištenu agrotehniku.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja su pokazali važnost gujavica za zdravlje ekosustava tla. Naime, dokazano je da celomska tekućina gujavica vrsta *Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta* značajno usporava i suprimira rast fitopatogene gljivice *Fusarium oxysporum*.

Tijekom 3 dana od inokulacije i tretmana došlo je do statistički značajnog smanjenja rasta u svim tretiranim grupama u odnosu na kontrolu. Tijekom prva 24 sata sve kulture pokazale su podjednak inicijalni rast, a nakon 48 sati počele su se primjećivati prve naznake zaostajanja u rastu zračnog micelija gljivice. Najveće razlike u odnosu na kontrolu zabilježene su 72 sata nakon tretmana.

Prijašnja istraživanja pokazala su da gujavice ingestijom i probavom mikroorganizama mogu značajno utjecati na brojnost i rasprostranjenost mikroorganizama tla, a ovo istraživanje potvrdilo je pretpostavku da gujavice mogu suprimirati fitopatogene čak i samim kontaktom s njima.

7. POPIS LITERATURE

Adamowicz, A. (2005.): Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. Tissue and Cell, 37:125–133.

Aira, M., Monroy, F., Domínguez, J., Mato, S. (2002): How earthworm density affects microbial biomas and activity in pig manure. European Journal of Soil Biology, 38:7–10.

Altinok, H. H., Dikilitas, M. (2014): Antioxydant response to biotic and abiotic inducers for the resistance against fusarium wilt disease in eggplant (*Solanum melongena* L.). Acta Botanica Croatica, 73 (1):79–92.

Beylich, A., Oberholzer, H. R., Schrader, S., Höper, H., Wilke, M. M. (2010): Evaluation of soil compaction effects on soil biota and soil biological processes in soils. Soil and Tillage Research, 109:133–143.

Bilej, M., Tuckova, L., Rejnek, J., Vetvicka, V. (1990): In vitro antigen-binding properties of coelomocytes of *Eisenia foetida* (Annelida). Immunology Letters, 26:183–188.

Bilej, M., Rossmann, P., Driessche, T. V., Scheerlinck, J. P., de Beatselier, P., Tučkova, L., Vetvička, V., Rejnek, J. (1991): Detection of antigen in the coelomocytes of the earthworm, *Eisenia foetida* (Annelida). Immunology Letters, 29:241–246.

Bilej, M., Brys, L., Beschin, A., Lucas, R., Vercauteren, E., Hanušová, R., de Beatselier, P. (1995): Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* earthworms. Immunology Letters, 45:123–128.

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

Bouche, M. B. (1977): Strategies lombriciennes. U: Soil organisms as components of ecosystems. Ecological Bulletin, Stockholm, 122–132.

Brown, G. G. (1995): How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? Plant and Soil, 170:209–231.

Byzov, B. A., Khomyakov, N. V., Kharin, S. A., Kurakov, A. V. (2007): Fate of soil bacteria and fungi in the gut of earthworms. European Journal of Soil Biology, 43:S149–S156.

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 and Biophysica Acta 1408:67–76.

Dales, R. P. (1993): Behavior of *Eisenia foetida* coelomocytes *in vitro*. Journal of Invertebrate Pathology, 61:331–332.

Dales, R. P., Kalac, Y. (1992): Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria. Comparative Biochemistry and Physiology, 101A (3):487–490.

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. (2004): Earthworm ecology. CRC Press, Boca Raton.

Edwards, C. A., Bater, J. E. (1992): The use of earthworms in environmental management. Soil Biology and Biochemistry, 24 (12):1683–1689.

Enami, Y., Okano, S., Yada, H., Nakamura, Y. (2001): Influence of earthworm activity and rice straw application on the soil microbial community structure analyzed by PLFA pattern. European Journal of Soil Biology, 37:269–272.

Fiołka, M. J., Zagaja, M. P., Piersiak, T. D., Wróbel, M., Pawelec, J. (2101): Gut bacterium of *Dendrobaena veneta* (Annelida: Oligochaeta) possesses antimycobacterial activity. Journal of Invertebrate Pathology, 105:63–73.

Fiołka, M. J., Zagaja, M. P., Hułas-Stasiak, M., Wielbo, J. (2012): Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). Journal of Invertebrate Pathology, 109:83–90.

Friberg, H., Lagerlöf, J., Rämert, B. (2005): Influence of soil fauna on fungal plant pathogens in agricultural and horticultural systems. Biocontrol Science and Technology, 15 (7):641–658.

Gordon, T. R., Martyn, R. D. (1997): The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Review of Phytopathology, 35:111–128.

Homa, J., Bzowska, M., Klimek, M., Plytycz, B. (2008): Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobaena veneta*. Developmental and Comparative Immunology, 32:9–14.

Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2012): Pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from weeds and plant debris in eastern Croatia to wheat and maize. Poljoprivreda, 18 (2):7–11.

Ilić, J., Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2013): Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* isolated from weeds in eastern Croatia. Poljoprivreda, 19 (1):20–24.

Ivić, D., Domijan, A. M., Peraica, M., Miličević, T., Cvjetković, B. (2009): *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia. Archives of Hygiene and Toxicology, 60:435–442.

Jones, C. G., Lawton, J. H., Shachak, M. (1997): Ecosystem engineering by organisms: Why semantics matters. Trends in Ecology and Evolution, 12:275–275.

Josifović, M. (1956): Poljoprivredna fitopatologija. Univerzitet u Beogradu, Naučna knjiga, Beograd.

Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2010): Bolesti cvijeća i ukrasnog bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.

Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., Islam, R., Pauls, K. P. (2011): Disease resistance/Pathology/Fusarium. U: Integration of Biotechnologies. Elsevier B., Amsterdam, 729–743.

Kasschau, M. R., Ngo, T. D., Sperber, L. M., Tran, K. L. (2007): Formation of filopodia in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes in response to osmotic stress. Zoology 110:66–76.

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.

Kišpatić, J. (1992): Opća fitopatologija. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.

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.

Koubová, A., Chronáková, A., Pižl, V., Sánchez-Monedero, M. A. (2015): The effects of earthworms *Eisenia* spp. on microbial community are habitat dependent. European Journal of Soil Biology, 68:42–55.

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.

Lee, K. E. (1985): Earthworms. Their ecology and relationship with soils and land use. Academic Press, Sydney.

Lević, J. (2008): Vrste roda Fusarium, Cicero, Beograd, Srbija.

De León, M. A., Sáenz, A., Jasso-Cantu, D., Rodríguez, R., Pandey, A., Aguilar, C. N. (2012): Fermented *Flourensia cernua* extracts and their in vitro assay against *Penicillium expansum* and *Fusarium oxysporum*. Food Technology and Biotechnology, 51 (2): 233–239.

Mácsik, L. L., Somogyi, I., Opper, 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.

McGovern, R. J. (2015): Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection, 73:1–15.

Médiene, S. M., Valantin-Morison, M., Sarthou, J. P., de Tordonnet, S., Gosme, M., Bertrand, M., Roger-Estrade, J., Aubertot, J. N., Rusch, A., Motisi, N., Pelosi, C., Doré, T. (2011): Agroecosystem management and biotic interactions: a review. Agronomy for Sustainable Development, 31:491–514.

Moody, S. A., Briones, M. J. I., Pierace, T. G., Dighton, J. (1995): Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. Soil Biology and Biochemistry, 27:1209–1213.

Moody, S. A., Piearce, T. G., Dighton, J. (1996): Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. Soil Biology and Biochemistry, 28 (4/5):533–537.

Nelson, P. E. (1981): Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. U: Fungal wilt diseases of plants. Academic Press, Inc., 51–80.

Oldenburg, E., Kramer, S., Schrader, S., Weinert, J. (2008): Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* on the degradation of *Fusarium*-infected deoxynivalenol-contaminated wheat straw. Soil Biology and Biochemistry, 40:3049–3053.

R Development Core Team (2011): R: A language and environment for statistical computing. The R foundation for statistical computing, Vienna, Austria.

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.

Schrader, S., Wolfarth, F., Oldenburg, E. (2013): Biological control of soil-borne phytopathogenic fungi and their mycotoxins by soil fauna. Agriculture 70 (2):291–298.

Sever, Z., Ivić, D., Kos, T., Miličević, T. (2012): Identification of *Fusarium* species isolated from stored apple fruit in Croatia. Archives of Hygiene and Toxicology, 63:463–470.

Stephens, P. M., Davoren, C. W., Doube, B, M., Ryder, M. H. (1994): Ability of the lumbricid earthworms *Aporrectodea rosea* and *Aporrectodea trapezoids* to reduce the severity of take-all under greenhouse and field conditions. Soil Biology and Biochemistry, 26:1291–1297.

Stoilova, T., Chavdarov, P. (2006): Evaluation of lentil germplasm for isease resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum f.sp. lentis*). Journal of Central European Agriculture, 7 (1):121–126.

Surai, P. F., Mezes, M., Melnichuk, S. D., Fotina, T. I. (2008): Mycotoxins and animal health: From oxidative stress to gene expression. Krmiva, 50 (1):35–43.

Tiunov, A. V., Scheu, S. (2000): Microfungal communities in soli, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): a laboratory experiment. Applied Soil Ecology, 14:17–26.

Tomasović, S. (1987): Fuzarioze pšenice s posebnim osvrtom na fuzarioze klasa (Fusarium graminearum Schw.). Agronomski glasnik, 4:47–55.

Whipps, J. M. (1997): Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. Advances in Botanical Research, 26:1–134.

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

Zaller, J. G., Heigl, F., Ruess, L., Grabmaier, A. (2014): Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. Scientific Reports, 4:1–8.

8. SAŽETAK

Uloga gujavica i mikroorganizama u funkcioniranju ekosustava tla je dobro poznata, kao i postojanje povezanosti i interakcija između gujavica i gljivica u tlu. Međutim, do sada nije istražen utjecaj celomske tekućine i celomocita, imunoloških stanica gujavica, na rast gljivica u tlu. Naime, prilikom negativnog podražaja gujavice u okoliš mogu ispustiti sluz i celomsku tekućinu s celomocitima koja potencijalno može značajno utjecati na rast gljivica. Stoga je glavni cilj ovog rada bio istražiti učinak celomske tekućine gujavica na rast fitopatogenih gljivica.

Ekstrakti celomske tekućine dviju različitih vrsta gujavica (*Eisenia fetida* i *Dendrobaena veneta*) korišteni su kako bi se utvrdilo njihovo djelovanje na rast fitopatogene gljivice *Fusarium oxysporum*, iznimno važne vrste u poljoprivrednoj proizvodnji. Rezultati su pokazali da celomska tekućina obje vrste gujavica ima negativan utjecaj na rast gljivice. Ovo istraživanje je potvrdilo da celomska tekućina gujavica pokazuje značajnu antifungalnu aktivnost u *in vitro* uvjetima.

Ključne riječi: *Fusarium oxysporum*, gujavice, celomska tekućina, celomociti, zaštita bilja.

9. SUMMARY

The role of earthworms and microorganisms in the soil ecosystem functioning is well known, as well as existence of interactions between earthworms and fungi in the soil. However, the impact of coelomic fluid and coelomocytes, immune cells of earthworms, on the growth of the fungi has not been investigated so far. Namely, in case of negative stimuli earthworms can discard mucus and coelomic fluid containing coelomocytes which can potentially have a significant impact on the growth of fungi. Therefore, the main aim of this thesis was to investigate the effects of earthworm coelomocytes on the growth of phytopathogenic fungi.

Coelomic fluid extracts of two different earthworm species (*Dendrobaena veneta* and *Eisenia fetida*) were used to determine the effects on the growth of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, important in agricultural production. The results showed that extracts of coelomic fluid of both tested earthworm species have negative effects on growth of fungi. This study proved that earthworm coelomic fluid extract shows some antifungal activity in *in vitro* testing.

Key words: *Fusarium oxysporum*, earthworms, coelomic fluid, coelomocytes, plant protection.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Eisenia fetida*.....19. str.

Tablica 2. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Dendrobaena veneta*.....19. str.

Tablica 3. Relativne vrijednosti smanjenja rasta – postotak inhibicije porasta zračnog micelija vrste *Fusarium oxysporum* 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktima celomskih tekućina gujavica. .....22. str.

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Fuzarioza klipa kukuruza. (Izvor: http://www.fermaime.com/?id=20&l=1044; Datum pristupa: 28.06.2016.)……...…..2. str.

Slika 2. Fuzarioza klasa pšenice. (Izvor: http://www.agropartner.rs/Komentari.aspx?id=23919; Datum pristupa: 26.06.2016.)….....3. str.

Slika 3. Ciklus zaražavanja biljaka vrstama roda *Fusarium*. (Izvor: http://medcraveonline.com/APAR/APAR-02-00039.php; Datum pristupa: 29.06.2016.)……..4. str.

Slika 4. Taksonomski smještaj vrste *F. oxysporum* unutar carstva gljiva. (Izvor: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum; Datum pristupa: 28.06.2016.)……...…..5. str.

Slika 5. Micelij vrste *F. oxysporum* u kulturi. (Izvor: http://thunderhouse4-uri.blogspot.hr/2012/06/fusarium-oxysporum.html; Datum pristupa: 27.06.2016.)……..5. str.

Slika 6. Mikrokonidije i makrokonidije vrste *F. oxysporum* okupljene oko hife. (Izvor: http://thunderhouse4-yuri.blogspot.hr/2012/06/fusarium-oxysporum.html; Datum pristupa: 27.06.2016.)…….6. str.

Slika 7. Rasprostranjenost vrste *F. oxysporum* u svijetu. (Izvor: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Fusarium_oxysporum; Datum pristupa: 29.06.2016.)……...….6. str.

Slika 8. Zaraza rajčice vrstom *F. oxysporum*. (Izvor: http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5077046; Datum pristupa: 27.06.2016.)…….……..….7. str.

Slika 9. Ekološke kategorije gujavica i njihov razmještaj u tlu. (Izvor: http://www.Agresearch.co.nz/news/earthworms-in-new-zealand-pastures/; Datum pristupa: 28.06.2016.)…….8. str.

Slika 10. Rahljenje tla gujavicama. (Izvor: https://reforestation.me/earthworms-vermicompost/; Datum pristupa: 28.06.2016.)……9. str.

Slika 11. Izbacivanje celomske tekućine kod vrste *E. fetida* (originalna fotografija)..10. str.

Slika 12. Različite vrste celomocita u celomskoj tekućini gujavica. (Izvor: https://logansciencejournalism.wordpress.com/page/6/; Datum pristupa: 29.06.2016.)……...…10. str.

Slika 13. Kolonija vrste *F. oxysporum* (originalna fotografija)……..……..15. str.

Slika 14. Gujavice: A) *Eisenia fetida*; B) *Dendrobaena veneta*. (Izvor: http://www.caudata.org/forum/f1173-advanced-newt-salamander-topics/f11-food-live-frozen-freeze-dried-pellets-etc/f17-earthworms-nightcrawlers-etc/57441-worm-bins.html; Datum pristupa: 27.06.2016.)……..……..16. str.

Slika 15. Shematski prikaz plana prikupljanja celomske tekućine vrste *E. fetida* (originalna fotografija)…….16. str.

Slika 16. Bürker-Türkova komorica korištena za prebrojavanje celomocita (originalna fotografija)…….17. str.

Slika 17. Izgled micelija gljivice *Fusarium oxysporum* nakon 72 sata od početka tretmana: A) fiziološkom otopinom; B) celomskom tekućinom gujavice *E. fetida* u koncentraciji 2250 celomocita/mL; C) celomskom tekućinom gujavice *E. fetida* u koncentraciji 4500 celomocita/mL; D) celomskom tekućinom gujavice *D. veneta* u koncentraciji 2250 celomocita/mL; E) celomskom tekućinom gujavice *D. veneta* u koncentraciji 4500 celomocita/mL (originalne fotografije).....22. str.

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Eisenia fetida*.....20. str.

Grafikon 2. Promjer zračnog micelija gljivice *Fusarium oxysporum* 24, 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktom celomske tekućine gujavice *Dendrobaena veneta*.....20. str.

Grafikon 3. Postotak inhibicije porasta zračnog micelija vrste *Fusarium oxysporum* 48 i 72 sata nakon tretmana ekstraktima celomskih tekućina gujavica. .....23. str.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij Ekološka poljoprivreda

UTJECAJ CELOMSKE TEKUĆINE GUJAVICA NA RAST FITOPATOGENE GLJIVICE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Ivana Plavšin

Sažetak: Uloga gujavica i mikroorganizama u funkcioniranju ekosustava tla je dobro poznata, kao i postojanje povezanosti i interakcija između gujavica i gljivica u tlu. Međutim, do sada nije istražen utjecaj celomske tekućine i celomocita, imunoloških stanica gujavica, na rast gljivica u tlu. Naime, prilikom negativnog podražaja gujavice u okoliš mogu ispustiti sluz i celomsku tekućinu s celomocitima koja potencijalno može značajno utjecati na rast gljivica. Stoga je glavni cilj ovog rada bio istražiti učinak celomske tekućine gujavica na rast fitopatogenih gljivica. Ekstrakti celomske tekućine dviju različitih vrsta gujavica korišteni su kako bi se utvrdilo njihovo djelovanje na rast fitopatogene gljivice *Fusarium oxysporum*, iznimno važne vrste u poljoprivrednoj proizvodnji.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Broj stranica: 41
Broj grafikona i slika: 20
Broj tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 58
Broj priloga: 0
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Fusarium oxysporum*, gujavice, celomska tekućina, celomociti, zaštita bilja

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, izvanredni profesor Poljoprivrednog fakultetu u Osijeku, predsjednik.
2. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, izvanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, mentor.
3. Doc. dr. sc. Sandra Ečimović, docent Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član.

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

EFFECT OF EARTHWORM COELOMIC FLUID ON GROWTH OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI *FUSARIUM OXYSPORUM*

Ivana Plavšin

Abstract: The role of earthworms and microorganisms in the soil ecosystem functioning is well known, as well as existence of interactions between earthworms and fungi in the soil. However, the impact of coelomic fluid and coelomocytes, immune cells of earthworms, on the growth of the fungi has not been investigated so far. Namely, in case of negative stimuli earthworms can discard mucus and coelomic fluid containing coelomocytes which can potentially have a significant impact on the growth of fungi. Therefore, the main aim of this thesis was to investigate the effects of earthworm coelomic fluid on the growth of phytopathogenic fungi. Coelomic fluid extracts of two different earthworm species was used to determine the effects on the growth of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, important in agricultural production.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek
Mentor: Karolina Vrandečić, PhD, Associate Professor

Number of pages: 41
Number of figures: 20
Number of tables: 3
Number of references: 58
Number of appendices: 0
Original in: Croatian

Key words: *Fusarium oxysporum*, earthworms, coelomic fluid, coelomocytes, plant protection

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. Jasenka Ćosić, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture in Osijek.
2. Karolina Vrandečić, PhD, Associate Professor, Faculty of Agriculture in Osijek.
3. Sandra Ečimović, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek.

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d