

Primjenjivost mikroapsula izolata gljive *Trichoderma viride* obogaćenih kalcijem u uzgoju maćuhice

Pavina, Manuela

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:753312>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

**PRIMJENJIVOST MIKROKAPSULA
IZOLATA GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE*
OBOGAĆENIH KALCIJEM U UZGOJU
MAĆUHICE**

DIPLOMSKI RAD

Manuela Pavina

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Fitomedicina

**PRIMJENJIVOST MIKROKAPSULA
IZOLATA GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE*
OBOGAĆENIH KALCIJEM U UZGOJU
MAĆUHICE**

DIPLOMSKI RAD

Manuela Pavina

Mentor: izv. prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić

Zagreb, rujan, 2017.

University of Zagreb
Faculty of Agriculture
Phytomedicine

Manuela Pavina

**APPLICABILITY OF *TRICHODERMA*
VIRIDE BASED MICROCAPSULES
ENRICHED WITH CALCIUM IN PANSY
CULTIVATION**

Mentor: izv. prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić

Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Manuela Pavina**, JMBAG0178087999, rođena 08.04.1992 u Karlovcu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**PRIMJENJIVOST MIKROKAPSULA IZOLATA GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE* OBOGAĆENIH
KALCIJEM U UZGOJU MAĆUHICE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Manuela Pavina**, JMBAG0178087999, naslova

PRIMJENJIVOST MIKROKAPSULA IZOLATA GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE* OBOGAĆENIH KALCIJEM U UZGOJU MAĆUHICE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić mentor _____
2. izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković član _____
3. izv. prof. dr. sc. Tatjana Prebeg član _____

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Manuela Pavina**, naslova

PRIMJENJIVOST MIKROKAPSULA IZOLATA GLJIVE *TRICHODERMA VIRIDE* OBOGAĆENIH

KALCIJEM U UZGOJU MAĆUHICE

Trichoderma vrste se u svijetu koriste već duži niz godina u poboljšanju rasta i razvoja biljaka. Pokazale su se i vrlo uspješne u zaštiti biljaka protiv bolesti. Polazeći od činjenice da su *Trichoderma* vrste polučile izvrsne učinke na rast rajčice, arnike i salate. Dana 14. listopada 2015. postavljen je pokus u dvije varijante: Mikrokapsule *Trichoderma viride* STP s dodatkom kalcija te netretirana kontrola. Vrsta *Trichoderma viride* je inkapsulirana u obliku Mikrokapsula s dodatkom kalcija te je u količini 2 grama po biljci aplicirana u zonu korijena. Mjereni parametri kod maćuhica su bili: veličina lista, dužina najvećeg lista, širina najvećeg lista, broj listova, broj cvjetova, visina biljke, širina, dužina te visina rozete. Nakon provedenih očitavanja te obradom podataka Mikrokapsule STP+Ca su za razliku od Kontrole polučile lošije rezultate. Mikrokapsule STP+Ca su učinile kalcij dostupnijim biljci, ali zbog povišenog fosfora unutar supstrata vegetativni i generativni rast je izostao. Naime, došlo je do nastanka fosfatnih soli (kalcijev fosfat, kalcijev hidrogenfosfat, kalcijev dihidrogenfosfat) te je time biljka ostala daleko od optimalnih uvjeta za rast i razvoj.

Ključne riječi: bio- stimulator, mikoza, mikrokaspule STP, *Viola* spp.

Summary

Of the master's thesis – student **Manuela Pavina**, entitled

APPLICABILITY OF *TRICHODERMA VIRIDE* BASED MICROCAPSULES ENRICHED WITH CALCIUM IN PANSY CULTIVATION

Trichoderma species are used in the modern world for many years to improve plant growth and development. They have proved to be very successful in protecting plants against diseases. Based on the fact that *Trichoderma* species yielded great effects on tomato, lettuce and arnica. This experiment took place on October 14th 2015 in two variants: microcapsules *Trichoderma viride* STP with calcium and nontreated control. *T. viride* was applied in the form of microcapsules in an amount of two grams per plant in the root zone. Measured parameters were: leaf size, number of leaves, number of flowers, plant height and plant diameter. After measuring and processing information microcapsules STP produced negative results. Microcapsules STP+Ca yielded a negative impact on vegetative and generative pansy growth. This is related to the chemical process that occurred within the substrate and prevented advanced pansy growth. It occurred an emergence of phosphate salts (calcium phosphate, calcium hydroxyphosphate, calcium dihydroxyphosphate) thereby the plant remained far from optimal conditions for growth and development.

Key words: bio stimulator, microcapsules STP, mycorrhiza, *Viola* spp.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. <i>Trichoderma viride</i> Pers.	3
2.1.1. Identifikacija.....	4
2.1.2. Primjena.....	5
2.1.3. Ekologija.....	6
2.1.4. Optimalni parametri za rast	7
2.1.5. Morfologija	7
2.2. Kalcij.....	8
2.2.2. Kalcizacija.....	9
2.2.3. Simptomi nedostatka kalcija	9
2.3. Maćuhica.....	12
2.3.1. Morfologija	12
2.3.2. <i>Viola x wittrockiana</i> Gams.	13
2.3.3. Uzgoj.....	14
3. MATERIJALI I METODE	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	18
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Od davnina znanstvenici proučavaju sinergiju između pojedinih biljaka. Tako je i danas, dodajući činjenicu da su kemijska sredstva pokazala svoju neučinkovitost, sve više pažnje se pridaje biološkim načinima zaštite biljaka. Suvremena poljoprivredna proizvodnja se do danas drastično izmijenila te samim time i način zaštite bilja od bolesti, biološki načini zaštite postaju sve privlačniji te neophodni. Korištenje bio gnojiva te bio pripravaka je postala alternativa za održavanje visoke proizvodnje bez rizika za okoliš. Različiti organizmi simbiozom s biljnim korijenom mogu imati blagotvorne učinke na biljku. Carstvo Gljiva obiluje vrstama koje se mogu upotrijebiti u biološkoj borbi protiv korova, insekata i fitopatogenih gljiva (Topolovec-Pintarić i sur. 2004.). Povećavajući otpornost biljke naspram bolesti *Trichoderma* vrste štite biljku od infekcija od strane fitopatogenih gljiva te je korijen koji je u mikorizi s vrstom *T. viride* bujniji što direktno dovodi do povećanja prinosa (Hermosa i sur 2012.). Zbog svoje fungistatske aktivnosti *T. viride* je korisna u biološkoj borbi protiv najznačajnijih fitopatogenih gljiva kao što su *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Armillaria*, *Fusarium* i mnoge druge ekonomski značajne vrste patogena. Primjenom u vrijeme sjetve, postiže se kolonizacija površine sjemena ovim antagonistom koji supresira naseljavanje patogena na kutikulu sjemena i tako otežava gljivičnu kontaminaciju (Samuels i sur. 2006.). Najviše spominjana i primjenjivana vrsta u posljednjih nekoliko godina je upravo *Trichoderma viride*. Koristi se u biološkoj borbi protiv fitopatogenih gljiva. Karakteristična je po brzom rastu kolonije u pogodnim toplim i vlažnim uvjetima. Optimalne temperature za rast micelija se kreću od 20 °C do 28 °C. Najbolja vrijednost pH medija za ovu vrstu je u rasponu od 4,5 do 5,5. Optimalna temperatura za proces klijanja konidija iznosi od 10 °C do 35 °C. Najpogodnija relativna vlažnost zraka iznosi 95% (Cavalcante i sur. 2006.). Primjenom biofungicida na osnovi *Trichoderma* vrsta jači je i porast tretiranih biljaka u odnosu na one gdje biofungicid nije primijenjen (Topolovec-Pintarić i sur. 2003.). U opticaju je sve više biopripravaka kao promotora biljnog rasta. Vrste *Trichoderma* su prisutne su u svim tipovima tla i važna su komponenta ekosistema biljnog korijenja. Kolonizacija korijena vrstom *Trichoderma viride* stimulira rast korijena, povećava usvajanje i upotrebu hranjiva što dovodi do bujnijeg rasta. Danas se smatra kako je utjecaj *T. viride* od velike važnosti za poljoprivrednu proizvodnju kao i shvaćanje uloge *Trichoderma* vrsta u ekosustavu (Topolovec-Pintarić i sur. 2013.). Vrste roda *Trichoderma* se također uključuju i u različite biokemijske procese u biljci te pospješuju zdravstveno stanje biljke te pridonose njenoj većoj produktivnosti. Kao rezultat toga biljke su bujnije te zelenije i plodonošenje je bolje (Harman 2000.). Vrste koloniziraju korijen ne samo površinski, već prodirući u epidermu ili sloj stanica ispod nje, neki biotipovi uspostavljaju snažnu i dugotrajnu kolonizaciju na površini korijena (Uphoff i sur. 2006; Yedidia i sur. 2000.). Zbog pozitivnog učinka na rast biljke, bolje ukorjenjivanje te zaštitu od nekih bolesti primjerice: plijesan, pepelnica i sl. Zavod za fitopatologiju Agronomskog fakulteta već duži niz godina proučava antagonističko djelovanje izolata vrsta roda *Trichoderma*. Na fakultetu je stvorena zbirka izolata koja je pokazala vrlo dobro djelovanje protiv patogenih vrsta. Izolat *Trichoderma viride* se pokazao kao izvrstan promotor biljnog rasta salate, rajčice i arnike. Kako bi pobliže istražili njezin

utjecaj na maćuhicu u plastenicima Zavoda za fitopatologiju dana 14. listopada 2015. postavljen je pokus s 25 biljaka u 4 ponavljanja. Održano je sedam očitavanja te su na tjednoj bazi u tom periodu praćeni parametri: broj listova, širina najvećeg lista, dužina najvećeg lista, broj cvjetova, visina biljke, širina biljke te dužina biljke. Pokus se sastojao od netretirane Kontrole te Mikrokapsula STP obogaćenih kalcijem. Postavljen je u formi slučajnog blokno­g rasporeda u suradnji Zavoda za fitopatologiju te Zavoda za kemiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu koji je za potrebe ovog pokusa prema tajnoj formuli napravio Mikrokapsule *Trichoderma viride* obogaćene kalcijem. Alginatne pelete su se pokazale kao odličan nosač inokuluma gljive te donose jednostavnost u primjeni i manipulaciji. No, nedostatak koji donose je i izuzetno loša topivost. Uzimajući u obzir i parametre kojima treba posvetiti pažnju u uzgoju maćuhice poput pH vrijednosti tla koja je od značajne uloge za pravilan rast i razvoj biljke. Važnu ulogu ima i količina elemenata kojima je maćuhica opskrbljena, posebice količina kalcija, magnezija, fosfora i bora. Kalcij je značajan faktor sinteze octene kiseline koja se lako veže s kalijem, natrijem, dušikom, fosforom i borom te ima značajnu ulogu u opskrbljenosti biljke navedenim elementima (Škvorc i sur 2014.).

Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj Mikrokapsula na bazi *Trichoderma viride*+Ca na rast i razvoj maćuhice. Dosadašnja istraživanja provedena na Agronomskom fakultetu o rodu *Trichoderma* pokazuju izvrsne učinke na rast rajčice (Sorić 2010.), arnike (Moscarda 2013.) i salate (Maršić 2016.), no nema podataka o učinku Mikrokapsula *Trichoderma viride* STP+Ca na maćuhice, koje su zbog različitih varijeteta boja te oblika i veličine izrazito popularne i primamljive kupcima. Prema gore navedenim podacima koji su prikupljeni ofilamentoznoj gljivi *T. viride* očekuje se bolji napredak maćuhica obogaćenih *T. viride* s dodatkom kalcija u sedam praćenih obilježja nego kod Kontrole. U istraživanje se ulazi s pretpostavkom kako će Mikrokapsule *Trichoderma vidride*+Ca polučiti pozitivan utjecaj na vegetativni i generativni rast.

2.PREGLED LITERATURE

2.1. *Trichoderma viride*Pers.

Rod *Trichoderma* je 1794. godine definirao Christian Hendrick Persoon kao zelenu plijesan koja raste na potrganim granama. Do 1969. godine svi sojevi vrste *Trichoderma* su u literaturi identificirani kao *T.viride* zbog Bisby-evog koncepta da se *Trichoderma* sastoji od jedne vrste. Braća Tulasne su 1875. ilustrirala vrstu *Hypocrea rufa* i povezala apotecije kao spolni stadij *T. viride*. Njihov tadašnji zaključak potvrđen je današnjim molekularnim metodama što ga čini velikim dostignućem s obzirom na jednostavnost fitopatoloških instrumenata i slabu razlučivost mikroskopa (Martinko 2015.).Početkom 20. stoljeća u rod se počinju ubrajati i bijelo obojene kolonije (do tada jedino zeleno obojene). Problematiku uređenja roda nastoje riješiti Gilman i Abott koji predlažu podjelu s obzirom na konidije. S obzirom na kuglaste ili ovalne konidije determiniraju tri vrste: *T. viride*, *T. lingorum* i *T. konongii*. Godine 1939. rod *Trichoderma* je predstavljala samo jednu vrstu *T.viride*. Prema Bisby-u 1969. godine svi sojevi *Trichoderma* vrsta su u literaturi identificirani kao *T.viride* zbog koncepta da se *Trichoderma* sastoji od jedne vrste. Iste godine došlo je do promjene taksonomije te je s obzirom na sistem grananja konidiofora, karakteristike fijaspora, raspored fijasida i morfologiju konidija opisano devet vrsta (Rifai 1969.).Sredinom devedesetih pojavom molekularnih alata potaknuto je istraživanje za ponovnu procjenu taksonomije u rodu *Trichoderma*. Laboratoriji u SAD-u, Austriji te Njemačkoj započeli su reviziju Bissettove sekcije Longibrachiatum. Kombinirali su upotrebu molekularnih makera, izoenzimsku analiza te po prvi puta uključili su i analizu potencijalnih teleomorfa *Trichoderma sp.* Kao rezultat tog istraživanja sekcija Longibrachiatum sadrži čak deset vrsta. Koncept Longibrachiatum je potvrdio Bissetove (1984.) defincije te pokazao stupanj korelacije između morfoloških i molekularnih pristupa taksonomiji. Odjeljak Longibrachiatum predstavlja filogenetski najudaljeniji dio od ostalih odjeljaka. Godine 1998. Kindermann i sur. su pokušali napraviti prvu filogenetsku analizu cijelog roda. Upotrebom jednog fragmenta gena, koji nije dovoljan prema današnjim standardima, ipak pomogao je u daljnjim istraživanjima. Taylor i sur. (1999.) predložili su koncepte filogenetskih vrsta na temelju konkordancije između pet ili više gena.

Vrsta *Trichoderma viride* prema Samuelsu je spomenuta i obrađivana u više od 200 članaka u dvije godine. Najviše članaka se odnosilo na *T.viride* kao filamentoznu gljivu u borbi protiv fitopatogenih gljiva (Samuels i sur. 2006).Rifai (1969.) predlaže sistematiku temeljenu na morfološkim karakteristikama, a za temelj opisa cijelog roda uzima upravo *T. viride*. Rifai je svaku vrstu s konidijama okruglog ili ovalnog oblikas bradavičastom membranom odredio kao *T. viride*. Kasnije razvojem mikroskopije bivaju uočene sitne razlike. Parsoons prvi spominje vrstu *T. viride* te ju ubraja u rod *Trichoderma* zajedno sa *T.aurum*, *T.nigrescens* i *T.roseum*. Tek kasnije temeljnim opisom morfoloških karakteristika utvrđeno je da *T.aurum*, *T.nigrescens* i *T.roseum* ne pripadaju *Trichoderma* vrstama (Samuels i sur. 2006.). Braća Tulasne su prvi uočili povezanost između vrsta *T. viride* i *H. Rufa*(Tablica 2.1.). Tada je prepoznata vrsta *T.viride* kao anamorf vrste *H.rufa*.

Daljnja istraživanja su dovela do razdvajanja na gore navedene dvije vrste (dva tipa). Tip 1 odgovara *T. viride* sa teleomorfom *Hypocrea rufa* te tip 2 koji označava novu vrstu *T. asperellum*. U 20-om stoljeću primjenom DNK sekvenciranja potvrđena je pripadnost spolnog stadija *Hypocrea rufa* (Martinko 2015.). Prvi opis *H. rufa* je iz 1796. godine zabilježen od strane Persoona koji ga naziva *Sphaeria rufa*. Tek 1849. godine Fries ovu vrstu smješta u novi rod *Hypocrea*. Karakteristika teleomorfa je razvitak smeđih, ili čak žutih i narančastih stroma. Mogu se naći na kori od drveća ili mogu parazitirati na plijesnima koje se razvijaju u vlažnim stambenim prostorima. Askospore su dvostanične, sadrže 16 askospora bezbojne ili zelene boje (Popović 2010.). Spolno plodno tijelo se naziva peritecij kruškolikog, jajolkog ili elipsoidnog oblika (Jaklitsch i sur. 2006.).

Tablica 2.1. Prikaz carstva Fungi

Carstvo	FUNGI	
Razdjel	EUMYCOTA	
Pododjel	Deuteromycotina	Ascomycotina
Razred	Hyphomycetes	Pyrenomycetes
Red	Hypomycetales	Hypocreales
Porodica	Moniliaceae	Hypocreaceae
Rod	Trichoderma	Hypocrea
Vrsta	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Hypocrea rufa</i>
Stadij	Anamorf	Telomorf

2.1.1. Identifikacija

Već od samih početaka znanstvenici imaju problem u razlikovanju te karakterizaciji *Trichoderma* vrsta. Samuels je u svojim detaljnim opažanjima spomenuo kako morfološki znakovi za definiranje ostalih vrsta često nisu korisni u razlikovanju *Trichoderma* vrsti. Problem se ogleda u uskom rasponu varijacija te nedovoljno preciznim terminima za opisivanje i definiranje razlika. Za identifikaciju se često koristi i izgled kolonije, no nemoguće je s dovoljno preciznosti dati opis koji bi kasnije služio za identifikaciju. Za razlikovanje sličnih vrsta mogu biti korisne stope rasta u kulturi, difuzivni pigmenti, karakteristični kristali (*Trichoderma aureoviride*), karakteristični aromatski mirisi i sl. Raspon varijacija unutar konidija varira od oblika globusa, elipsoida do onih s osnovnim krajem suženim ili skraćenim. Kod nekih vrsta pod mikroskopom zreli konidiji su tamno zelene boje, u drugih blijede boje (Bisetti sur 2015.).

Sojevi *Trichoderma* često se mogu identificirati prema osobitoj morfologiji koja uključuje brzi rast, svijetlo zeleni ili bijeli konidialni pigmenti. Bisetti je (1991.) predložio uključivanje svih anamorfni oblika *Hypocrea* u rod *Trichoderma*. U većini slučajeva,

anomorfnih forenzičari rod *Trichoderma* i *Hypocrea* mogu razlikovati po tome što imaju manje regularni uzorak razgrananja na neodređeni broj razina. Odjeljak *Hypocreanum* je polifiletski i može se dokazati kao neodrživa grupacija. Odnos vrsta koje se mogu smjestiti u odjeljku *Hypocreanum* vjerojatno se može odrediti samo rješavanjem njihovih teleomorfnih veza i genetskim odnosima kroz makromolekularne istrage. Ove vrste rijetko se susreću osim kao izolacije askospora iz teleomorfa. Teleomorf ili spolni stadij pripada porodici *Hypocreaceae*. Prvi opis *H. rufa* je iz 1796. godine zabilježen od strane Persoona koji ga naziva *Sphaeria rufa*. Tek 1849. Fries ovu vrstu smješta u novi rod *Hypocrea*. Karakteristika teleomorfa je razvitak smeđih, ili čak žutih i narančastih stroma. Mogu se naći na kori od drveća ili mogu parazitirati na plijesnima koje se razvijaju u vlažnim stambenim prostorima. Askospore su dvostanične, sadrže 16 askospora bezbojne ili zelene boje (Popović 2010). Spolno plodno tijelo se naziva peritecij kruškolikog, jajoljkog ili elipsoidnog oblika (Jaklitsch i sur 2006.).

2.1.2. Primjena

Rod *Trichoderma* široko primjenjuje u mnogim granama industrije. Primjerice metabolički produkti roda *Trichoderma* primjenjuju se u izbjeljivanju traperica koje se naziva još i „stone wash“ stil. Također primjenjuje se u kemijskoj te farmaceutskoj industriji (Harmann 2006.). Najvažnija je ipak primjena u poljoprivredi gdje se koristi dvostrano: kao biofungicid te kao biljno gnojivo koje promovira rast biljke. Članovi roda *Trichoderma* pospješuju raspadanje ostataka biljaka u tlu. Neke vrste, poput *T. reesei*, odlični su proizvođači enzima za razgradnju celuloze i zbog toga se koriste kod razgradnje celuloze u biotehnološkoj industriji (Kubicek i Panttila 1998.). Druge vrste iz roda *Trichoderma*, npr. *T. harzianum*, *T. virens*, *T. atroviride*, i *T. asperellum*, poznate su kao potencijalna sredstva za zaštitu od biljnih patogenih gljiva (Papavizas 1985.).

Na tržištu Hrvatske prvi mikrobiološki pripravak se pojavio 1990. godine. Koristio se za suzbijanje sive plijesni (*Botrytis cynerea*) pod nazivom Trichodex. Primjenjuje se na grožđu i jagodama te sadrži *T. harzianum*. Posljednjih godina uspješno se koristi i vrsta *Trichoderma asperellum* u pripravku Trifender na način da se preventivno prska (1%) površina tla prije sjetve ili sadnje ratarskih i povrtlarskih kultura. U 2010. godini ovim pripravkom je ostvaren 31,4 % veći prinos gomolja krumpira. Pokus je bio postavljen u središnjem dijelu Međimurja te su obuhvaćene tri gospodarski raširene sorte krumpira: Adora, Laura te Vineta (Međimurje 2010¹). Među novijim proizvodima je i Vital Tricho, mikrobiološki preparat koji sadrži antagonističke gljive *Trichoderma asperellum* i *Trichoderma viride*. Koristi se kao sredstvo za biološku kontrolu patogenih mikroorganizama, za poboljšanje strukture tla i stvaranje povoljnih uvjeta za rast i razvoj biljke. Suzbija i djeluje nepovoljno na patogene mikroorganizme koji izazivaju pojavu bolesti

¹<https://medjimurje.hr/aktualno/kolumne/korisni-mikroorganizmi-protiv-biljnih-patogena-3331/> pristupljeno 15.8.2016.

Phytophthora spp., *Phytium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticilium* spp. te *Sclerotinia* spp. (emteh 2016.²).

2.1.3. Ekologija

Trichoderma vrste nastanjuju različite tipove tla od šumskih do poljoprivrednih. S obzirom na to da su pravi mikroorganizmi idealno mjesto na kojem se nastanjuju je korijenov sistem. Korijenov sistem vrstama roda *Trichoderma* predstavlja idealno mjesto za pronalaženje drugih vrsta filamentoznih gljiva, koje su najčešće uzročnici biljnih bolesti biljke domaćina. Uništavajući uzročnike biljnih bolesti *Trichoderma* vrste štite biljku od infekcija od strane fitopatogenih gljiva te je korijen, koji je u mikorizi, bujniji nego onaj koji nije u mikorizi (Slika 2.2.).



Slika 2.2. Prikaz razlike između normalnog korijena i korijena u mikorizi vrstom *T. viride*³.

Ove vrste se također uključuju i u različite biokemijske procese u biljci. Navedeni utjecaji pridonose boljem zdravstvenom stanju biljke te njenoj većoj produktivnosti. Samim time biljke su bujnije te zelenije i plodonošenje je bolje (Harman 2000.). Vrste koloniziraju korijen ne samo površinski, već prodirući u epidermu ili sloj stanica ispod nje, neki biotipovi uspostavljaju snažnu i dugotrajnu kolonizaciju na površini korijena (Slika 2.2.) (Uphoff i sur. 2006; Yedidia i sur. 2000.).

Kada izlučevine *Trichoderma* vrste probiju biljno tkivo, biljka aktivira obrambeni mehanizam. No, kako *Trichoderma* ne parazitira biljno tkivo već se uspostavlja mikorizni odnos od kojeg će sama biljka imati dosta koristi. Gljiva omogućava povećanje rasta biljke, bolje usvajanje hraniva te induciranu sistemsku ili lokalnu otpornost biljke na patogene (Uphoff i sur. 2006.).

²<http://emteh.hr/novosti/-novi-preparat-u-ponudi-vital-tricho/> pristupljeno 20.10.2016.

³<http://www.abm1st.com/international/src/trichoderma-benefits>, pristupljeno 20.10.2016.

U početku je vrsta *Trichoderma viride* smatrana kao patogen, danas je važna za proizvodnju biofungicida. Ova vrsta u proizvodnji luka i kultiviranih gljiva izaziva zelenu plijesan. Prepoznatljiva je i po svom brzom rastu u uvjetima optimalne temperature od 20°C do 28°C. Optimalna pH vrijednost je u rasponu od 4,5 do 5,5. Gljiva se nalazi u tlu te poboljšava klijavost sjemena cvjetnica, povećava unos fosfora i proizvodi enzime koji degradiraju celulozni poljoprivredni otpad na alkohol (Samuels i sur. 2006). Vrsta *Trichoderma* ima sposobnost da djeluje na druge gljive, djeluje kao parazit fitopatogenih gljiva te proizvodi antibiotike (Martinko 2015.). Primjenom u vrijeme sjetve postiže se kolonizacija površine sjemena koji supresira naseljavanje patogena na kutikulu sjemena te otežava kontaminaciju (Samuels i sur. 2006.). Uspostavljanjem mikoriznog odnosa potiče se brži rast korijena te bolje usvajanje vode i hranjivih tvari. Dokazano je i kako može razgrađivati toksične spojeve u zoni korijena i tako smanjiti stres za biljku (Harmann i sur. 2004.).

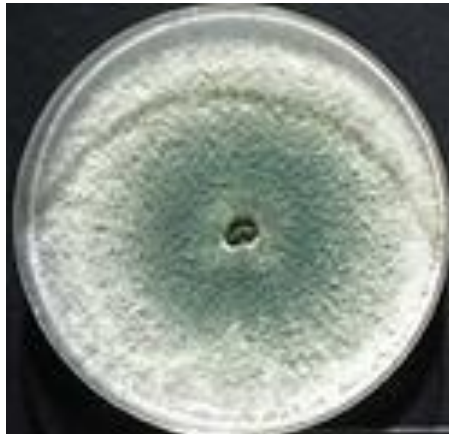
2.1.4. Optimalni parametri za rast

U istraživanju provedenom 2014. godine u Indiji Sing i suradnici (2014.) su testirali pH vrijednosti u rasponu od 4.0-8.0. Dokazano je kako veći broj izolata najveći micelarni rast pokazuje na pH vrijednostima 6.5, 7.5 te 5.5. Minimalni rast zabilježen je na vrijednostima 4,0 te 4,5. Nakon 16 dana povećanje mase kod *T. harzianum*, *T. viride* i *T. asperellum* je bilo veće nego kod ostalih vrsta u svim pH rasponima. Umjeren rast zabilježen je kod vrsta *T. koningii*, te *T. virens*. Kod vrsta *T. viride*, *T. harzianum* i *T. asparellum* na početku je veća količina biomase proizvedena na pH vrijednosti 7,0 no kasnije povećanjem perioda inkubacije ta vrijednost pada na 5,5. Studija je pokazala da *Trichoderma* vrste bolje uspijevaju u kiselom pH okruženju. Vrste *Trichoderma* su pokazale dobar rast na različitim temperaturama. Većina *Trichoderma* vrsti je fotoosjetljiva te proizvode konidije u razdoblju svjetlosti (Singh i sur. 2014.). Optimalna temperatura za rast kolonije je 25-31 °C. Temperature iznad 30°C potpuno obustavljaju rast (Kumar i Pundir 2009.). Maksimalna količina biomase je zabilježena u sličaju *T. harzianum* na temperaturi 25°C, manje vrijednosti na 20 i 35°C.

2.1.5. Morfologija

Kolonije *T. viride* imaju karakterističnu smaragdno zelenu boju. Zbog činjenice da spada u diurnalne vrste pri izmjeni dana i noći formira karakteristične koncentrične krugove zelene do tamnožute boje. Konidije su maslinasto zelene boje veličine od 2,5-4 µm. Vrsta *T. viride* rjetko stvara hlamidospore, ako nastanu najčešće su jajolike te prozirne do blijedožute boje (Samuels i sur 2006.). Tipično za rod *Trichoderma* su grananja nalik na drvo ili piramidu (konidiofori). Konidiofori nose kratke filijale koje rastu pojedinačno ili u grupi. Mogu biti

skupljene u hrpu koju čini 10-20 konidija pri čemu su jednostanične, veličine od 2.5 do 4 μm grubo zrnate membrane (Kumar i Pundhir 2009.).



Slika 2.4. Izgled kolonije *T. viride*(foto: M.Pavina).

2.2 Kalcij

Kalcij je zemnoalkalijski metal. On je intercelularni glasnik u citosolu te kao dvovalentni kation ima strukturne uloge u staničnoj stijenci i membrani (Marschner1995.). Kalcij ne sudjeluje u građi žive tvari, osim u nekoliko manjih spojeva. Također, utječe na fizikalno-kemijska svojstva protoplazme, aktivira dvadesetak enzima. Nakuplja se u staničnim stijenkama, vakuolama, jezgri, kromosomima, kloroplastima i mitohondrijima (Vukadinović i Vukadinović 2011.).

Kalcij se u tlu nalazi u obliku karbonata, sulfata ili fosfata, a u biljci čini 0,2 do 3,5 % masesuhe tvari. U stanici može kao dvovalentni kation tvoriti soli s kiselim sastojcima stanične stjenke, npr. pektinima. Nužan je za funkcioniranje membrana. Uključen je kao sekundarni glasnik u brojnim odgovorima na okolišne i hormonske signale, a može biti vezan na kalmodulin - regulatorni protein u citosolu. Kompleks kalmodulin/ Ca^{2+} uključen je u regulaciju brojnih metaboličkih procesa. Kalcij služi i kao relativno nespecifičan kofaktor za niz enzima te sudjeluje u balansiranju djelovanja drugih kationa. Višak kalcija u stanici se fiksira u obliku oksalata i karbonata, a rjeđe u obliku sulfata i fosfata (Škvorc i sur 2014.).

Važan je za biljke jer kao dvovalentni kation ima strukturne uloge u staničnoj stijenci i membrani, on je intercelularni glasnik u citosolu (Marschner1995.).Razgradnjom primarnih minerala silicija i sekundarnih minerala kalcija oslobađa se kalcij koji je u tlu pretežito sorbiran ili gradi sekundarne minerale. Anorganske rezerve kalcija u tlu su prosječno 0,2-2% dok su u karbonatnim tlima 10%. Važna je i uloga kalcija u održavanju pH vrijednosti jer on indirektno utječe na raspoloživost bora, željeza, mangana, cinka i bakra. Kalcij je vrlo važan i u održavanju strukture tla te utječe na vodnozračni režim i oksido-redukcijske procese. U ekstremno kiselim tlima kod pH vrijednosti $<4,0$ dolazi do izravne toksičnosti H^+ iona, kod pH <5 česta je toksičnost iona Al^{3+} i Mn^{2+} , kod pH $>4,2$ toksičnost H^+ iona je neizravna i to

putem aktivacije teških metala. Biljke usvajaju kalcij u ionskomobliku Ca^{2+} njegovo usvajanje je znatno sporije od ostalih elemenata. Najviše ovog elementa ima u lišću, starije lišće je bogatije nego mlađe. Jednosupnice u prosjeku sadrže manje kalcija od dvosupnica. Kalcij se u biljkama premješta transpiracijskom strujom u ksilemu dok je kretanje floemom vrlo slabo ili se uopće ne događa. Kalcij sudjeluje u građi pektina i fitina te sudjeluje u neutralizaciji suvišne kiselosti staničnog sadržaja, posebice vakuole. Ima značajnu ulogu u opskrbljenosti biljaka kalijem, natrijem, dušikom, fosforom i borom jer je faktor sinteze oksalooctene kiseline. Značajna je uloga kalcija u smanjenju hidratiziranosti protoplazme, povećanju njene viskoznosti, stabilizaciji središnje pektinske lamele stanične stijenke, stabilnostikromosoma te stabilnosti jezgre. Visok ili nizak sadržaj kalcija negativno utječe na pH i samim time loše se odražava na raspoloživost ostalih elemenata. Nedostatak kalcija se opaža u listovima. Taj nedostatak se naziva kloroza te je popraćen sporijim rastom biljke, grmolikim izgledom te sporijim razvojem korijena. Lišće se počinje uvijati, pojavljuju se tamnosmeđe zone s odrvenjelim i začepljenim provodnim elementima. Kod deficita kalcija biljke proizvode polen slabije klijavosti što uzrokuje problem kod oplodnje (Škvorec i sur 2014.).

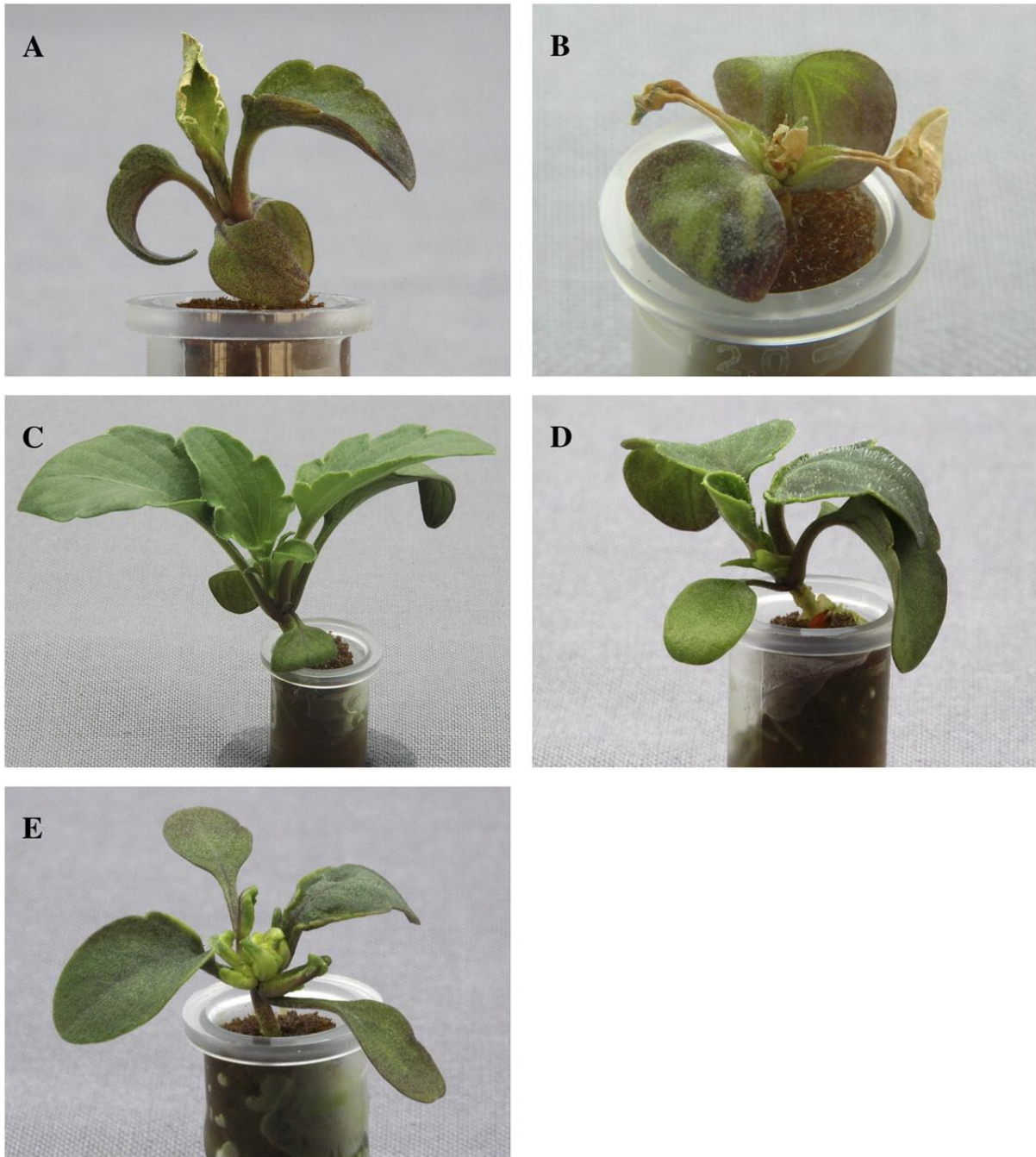
2.2.2 Kalcizacija

Kalcizacija je agrotehnička mjera koja podrazumijeva unošenje kalcija radi neutralizacije kiselosti tla. Ovo je vrlo stara agrotehnička metoda koju su poznavali i drevni narodi te izaziva pozitivne učinke u raspoloživosti hraniva (fosfora i teških metala). Kod primjene ovog postupka preporučuje se postepena promjena pH kako se fizikalna i kemijska svojstva tla nebi poremetila. Kalcizacijom se pomiče ravnoteža tvorbe i razlaganja humusa te nakon početne plodnosti može dovesti tlo u fazu iscrpljivanja i smanjene produktivnosti. Moguć je i izrazit pad raspoloživosti fosfora i mikroelemenata što predstavlja još jedan razlog za oprezno provođenje kalcizacije. Dodatne agrotehničke mjere koje je potrebno razmotriti uz ovu mjeru su: meliorativna gnojidba, humizacija i primjena mikroelemenata. Za ovu metodu najčešće se koriste mljeveni kalcijev karbonat, lapor, dolomit ili drugi otpadni materijali koji sadrži kalcij (Jug 2016.).

2.2.3. Simptomi nedostatka kalcija

Kako bi utvrdili simptome nedostatka kalcija i njegovu zavisnost s drugim elementima King i suradnici (2009.) su proveli istraživanje. U navedenom istraživanju maćuhica je uzgojena hidroponski kako bi se mogli pratiti simptomi nedostatka kalcija. Primarni simptomi nedostatka postali su vidljivi na najmlađem tkivu gdje je bila vidljiva diskoloracija, uvijanje listate na kraju nekroza. Nakon toga mjeren je utjecaj nedostatka kalcija u razdoblju od sedam dana u različitim fazama razvoja biljke. Ovime su dokazali kako bez obzira na vremenski period kad je kalcij uskraćen biljci ona svejedno na kraju ima iste simptome nedostatka. Također, navode često slične simptome nedostatka bora kod biljaka

koji se pogrešno tumači nedostatkom kalcija(Slika 2.5.).Razlika u ova dva elementa je što u nedostatku bora biljke ne razvijaju nekrozu. Koncentracija u tkivu kojem je bio uskraćen kalcij (0,56%) bila je značajno niža od kontrole (0,80%). Utvrđena je povezanost deficita kalcija s nižim koncentracijama kalija, sumpora, magnezija i cinka. Daljnjim istraživanjem koncentracija kalcija je u četvrtom tjednu iznosila 0,83 %, dok je vrijednost kontrole iznosila 1,18%. Ovim pokusom prikazana je povezanost elemenata s nedostatkom kalcija kao i činjenica da nedostatak kalcija u jednom stadiju proizvodnje ne nestaje već je prisutan tijekom cijelog perioda (King i sur 2009.).



Slika 2.5. Prikaz nedostatka kalcija početna i napredna kloroza (a i b), kontrola (c) te nedostatak bora početna i napredna kloroza (d i e)⁴

⁴<http://hortsci.ashspublications.org/content/44/6/1566.full> pristupljeno 9.9.2017

2.3.Maćuhica

Odabrana cvjetna vrsta u ovom pokusu je bila maćuhica. Maćuhica pripada porodici *Violaceae*, rodu *Viola* (Tablica 2.6) koji obuhvaća oko 400 vrsta.

Tablica 2.6Sistematika maćuhice

CARSTVO	Plantae
ODJELJAK	Magnoliophyta
RAZRED	Magnoliopsida
RED	Violales
PORODICA	Violaceae
ROD	Viola

Prema boji maćuhice možemo podijeliti na jednoboje i dvoboje te višeboje.Prema veličini cvijeta na velike (8,8 do 11,4 cm u promjeru), srednje (6,3 do 8,8 cm u promjeru) te multiflora (3,8 do 6,3 cm u promjeru) (Parađiković 2006.).Predstavnici roda *Violasu*: *Viola tricolor*, *Viola odorata*,*Viola x wittrockiana* te *Viola cornuta*.

2.3.1.Morfologija

Maćuhica je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice ljubica (*Violaceae*). U dvogodišnje zeljaste biljke ubrajaju se one vrste čiji vegetacijski period počinje u ljeto ili jesen jedne godine te završava u proljeće ili ljeto sljedeće godine (Tošić 1967.). Rod *Viola* prve godine razvija se lisna rozeta dok u drugoj godini maćuhica cvate te stvara sjeme. Stabljika joj je uspravna ili povijena, mekana, šuplja i razgranata. Listovi su nasuprotni, duguljasti, uski, smješteni na dugačkoj peteljci. Neke vrste razvijaju razgranate stabljike, a neke samo prizemen rozete bez vidljive stabljike. Listovi mogu biti različitih dimenzija, okrugli ili nazubljenog rubate nepravilno raspoređeni na stabljici. Cvjetovi su pojedinačni, dugi 1-3 cm, rastu na peteljci iz pazuška listova. Promjer cvijeta maćuhice je u rasponu od 6-11 cm (kod krupnocvjetne maćuhice). Cvjetne stapke kod maćuhica su uglate i krhke. Latice su obrnuto jajaste, mogu biti različitih boja. Latice se međusobno preklapaju te imaju baršunastu strukturu. Miris je ugodan, jače izražen kod nekih vrsta primjerice *Viola odorata* (Erhatic i sur. 2010.). Plod je tobolac unutar kojegse nalazi sjeme sive ili žućkaste boje.Svježa biljka se sastoji od 4,40% saponinate ima ukupnu količinu karotenoida od 8,45 mg na 100 g.

2.3.2. *Viola x wittrockiana* Gams.

Vrsta *Viola x wittrockiana* Gams je nastala križanjem divljih vrsta iz porodice Violaceae (*Viola tricolor*, *Viola luteae*, *Viola cornuta* i *Viola altaica*). Od kad je nastala pa do danas stvoren je velik broj sorata, među najpoznatijim su: Azure Blue, Sunny boy te Celestial Queen (Bačvanski, 2011.). Maćuhicu odlikuju cvjetovi s pet latica koje se međusobno preklapaju, promjera i do 8 cm (Slika 2.7.). Dolaze u raznim kombinacijama boja: bijela, žuta, plava te ljubičasta s karakterističnim tamnijim dijelom. Za razliku od višebojnih na tržištu su prisutne i jednobojne sorte (Kukoč 2005.). Najbolje uspjeva na svijetlom mjestu na rastresitom tlu bez previše vlage. Visina same biljke varira, a obično se kreće između 15 do 20 centimetara, dok je širina 10 do 20 centimetara.



Slika 2.7. *Viola x wittrockiana* Gams. u cvatu (foto: M.Pavina).

2.3.3.Uzgoj

Sadnja se može provoditi na gotovo svakom tipu tla no prije sadnje je dobro pognojiti i poravnati tlo. Razmak sadnje je od 20-30cm te treba izbjegavati položaje gdje je biljka izložena vjertu ili golomrazici. Nakon sadnje potrebno je odstranjivati korov koji zbog jačih kompeticijskih sposobnosti oduzima maćuhici hranjiva. Proizvodnja presadnica maćuhica može se odvijati u dvije različite metode. Prva metoda je sjetva na sjetvene gredice, u kljališta ili zemljane lonce. Druga metoda je sjetva na otvoreno pri čemu se vodi računa o terminima prodaje presadnica u jesen i proljeće. Zastupljenija je prva metoda prema kojoj su rokovi sjetve od 20. lipnja do 15. srpnja za prodaju u jesen te 10. srpnja do 1. kolovoza za proljetni turnus. Za proizvodnju 1000 biljaka potrebno je 3-5 g sjemena (u povoljnim uvjetima za određene sorte 2-3 g). Sjetva se obavlja u kljališta s razmakom između redova 5-8 cm. Nakon sjetve sjeme se pospe tankim slojem propusne zemlje. Prije sjetve potrebno je dezinficirati tlo protiv bolesti i korova. U kontejnerskoj proizvodnji rast biljaka se kontrolira regulatorima rasta kako bi se postigao optimalni izgled biljaka. Ako su biljke niže jednostavnije su za transport i manipulaciju (Parađiković 2006.). Neki od regulatora rasta koji se pojavljuju na našem tržištu su: klor-kolin-klorid (CCC), ancymidol i paclobutrazol. Koncentracije ovise o preporukama proizvođača. Regulatori se primjenjuju rano ujutro ili kasno predvečer. Ograničavajući faktor je temperatura koja nesmije prelaziti 15°C te prilikom pojave cvjetnih pupova regulatori se više ne primjenjuju. Ako se presadnice proizvode u multipot-pločama proces se odvija u četiri faze. Prva faza traje četiri do sedam dana, temperatura je 20°C a postotak vlage 90-95 %. U ovoj fazi korijenje je dužine 0,6-1,3 cm. Druga faza traje sedam dana, a započinje izbijanjem klice na površinu tla. U ovoj fazi važno je održavati kotiledone zdravim i kvalitetnim. Potrebno je svjetlo kako nebi došlo do izduživanja stabljike (etiolacija). Prilikom svakog zalijevanja dodaje se prihrana sastavljena od 0,1% mineralnog gnojiva. Optimalna temperatura je od 20 do 21 °C. Važno je održavati supstrat vlažnim tijekom ove faze. Treća faza traje 15 dana pri temperaturi 18°C do 19 °C. Treća faza zahtjeva više svjetlosti te prihranu dušikom. Cilj je u ovoj fazi postići zdravo korijenje. Četvrta, ujedno i završna faza traje 10 do 12 dana. U ovoj fazi izdanci su 3-4 cm visine nose tri do četiri para listova. Kako bi se postigao ujednačen izgled koriste se regulatori rasta. Supstrat je homogena smjesa sastavljena od organskih, anorganskih i sintetskih komponenti. Supstrat treba omogućiti optimalne uvjete za rast i razvoj biljke. Neke od osobina koje mora imati dobar supstrat su: stabilnost organske tvari, odnos ugljika i dušika, specifična težina supstrata koja se odnosi na to da biljci pruži uporište, sadržaj hranjiva kao i kemijska reakcija (pH), zadržavanje vlage i prozračnosti te sposobnost supstrata za izmjenu kationa. Ako je supstrat loše kvalitete može doći do pojave bolesti, smanjenog broja listova, cvjetova ili cvjetnih pupova. Važno je prilikom odabira supstrata paziti na optimalan pH za određenu cvjetnu vrstu te na njegov vodni i zračni kapacitet. Sjemenke maćuhica su osjetljive na visoku razinu amonijaka u supstratu te se mora pridati veća pozornost sastavu (Parađiković 2006; Vinceljak-Toplak 2010.).

3. MATERIJALI I METODE

U istraživanju je korišten autohtoni izolat gljive *Trichoderma viride* STP koji je izolirala izv.prof.dr.sc.S.Topolovec-Pintarić (Topolovec-Pintarić 2010.) te se čuva u zbirci izolata Zavoda za fitopatologiju Agronomskog fakulteta (dalje Zavod). Izolat STP je porijeklom s korijena pšenice. Pripadnost vrsti je određenapo morfološkom ključu, a determinacija je potvrđena PCR metodom. U svrhu izrade mikrokapsula izolat STP je umnažan u laboratoriju Zavoda uzgojem u čistoj kulturi na PDA supstratu u petrijevkama promjera 10 cm, uz inkubaciju u klima komori tijekom sedam dana pri 24 °C i u tami.

Inkapsulacija gljive u mikrokapsule s dodatkom kalcija odnosno postupak izrade mikrokapsula čuva se u tajnosti te neće biti ovdje prikazan jer se razvija u projektu HRZZ: *Nove biopolimerne mikrokapsule za kontrolirano otpuštanje tvari za zaštitu/ishranu bilja (voditelj M. Vinceković)*. Mikrokapsule su prikazane na slici 3.1.

Pokus je postavljen dana 14. listopada 2015. u plasteniku Zavoda po slučajnom bloknom rasporedu s 4 ponavljanja i samo dvije varijante: 1) Mikrokapsule STP+Ca-aplikacija mikrokapsula na osnovu izolata STP s dodatkom kalcija u rizosferu test biljaka; 2) Kontrola (K) – izostavljena aplikacija mikrokapsula STP+Ca, netretirane biljke. Po varijanti je testirano 100 biljaka tj. 25 biljaka u ponavljanju, a ukupan broj biljaka u pokusu bio je 200. Korištene su maćuhice nabavljene od lokalnog proizvođača maćuhica. Biljke su uzgajane u supstratu Klasmann-Delmann Supstrat 2 GmbH (Geeste, Njemačka), koji je također nabavljen od istog lokalnog proizvođača maćuhica. Omjer NPK u ovom supstratu iznosi 14:10:18, a pH vrijednost supstrata je 5,5- 6,5. Prije presađivanja biljaka supstrat je steriliziran autoklaviranjem. Presađivanje je obavljeno u stadiju klijanaca sdva para pravih listova, tako da je jedna biljka posađena u lončić promjera 9 cm (Slika 3.2). Lončići su također nabavljeni od istog lokalnog proizvođača maćuhica prethodno dezinficirani tehnološkim alkoholom.

Mikrokapsule su aplicirane prilikom presađivanja presadnica. Ukupna količina mikrokapsula po biljci je iznosila 2 grama, a izmjerena je vaganjem za svaku biljku pojedinačno. Na supstrat u lončiću najprije su ručno položene mikrokapsule STP+Ca, a potom je dodana presadnica maćuhice kako bi se mikrokapsule STP+Ca pozicionirale u područje korijena nježne presadnice (Slika 3.3.).

Prikupljanje rezultata radi praćenja i vrednovanja učinka aplikacije mikrokapsula obavljeno je kroz sedam očitavanja u razmacima od tjedan dana: 1) 21.10.2015.; 2) 4.11.2015.; 3) 17.11.2015.; 4) 24.11.2015.; 5) 1.12.2015.; 6) 8.12.2015.; 7) 21.12.2015.

Podaci su prikupljeni mjerenjem sljedećih parametara: Dužina, širina i visina biljke, broj listova po biljci, dimenzije najvećeg lista (širina i dužina) te broj cvjetova. Tijekom pokusa primijećena je siva plijesan (*Botrytis cinerea*) te pepelnica (*Erysiphe sp.*) te je 9.12.2015. provedena aplikacija fungicida Quadris (Syngenta, Švicarska) i Teldor (Bayer, Njemačka).

Utjecaj mikrokapsula na osnovu izolata STP obogaćenih kalcijem na vegetativni rast i cvatnju maćuhice vrednovanje za svaku praćenu karakteristiku. Modificiranom interpretacijom Townsend-Heubergerova(1943.) Indeksa učinkovitosti (*I*), a prema Topolovec-Pintarić i sur.(2013.).

$$\text{INDEKS(\%)} = (a - b / a) \times 100$$

a = srednja vrijednost utretmanu

b = srednja vrijednost u kontroli

Aplikabilnosti formulacije u uzgoju maćuhica vrednovana je temeljem uočenih prednosti i nedostataka prilikom rukovanja formulacijom.



Slika 3.1. Izgled mikrokapsula STP + Ca prije aplikacije na biljku (foto: M. Pavina).



Slika 3.2. Presadnice mačuhice spremne za presađivanje u supstrat (foto: M.Pavina).



Slika 3.3. Izvršena aplikacija mikrokapsula STP+ Ca nakon odvage (foto: M.Pavina).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedeno istraživanje omogućilo je prikupljanje podataka utjecaja izolata *T. viride* STP na oslobađanje kalcija iz mikrokapsula te učinkovitosti i aplikabilnosti formulacije mikrokapsula na osnovu izolata STP obogaćenih kalcijem. Učinkovitost mikrokapsula STP+Ca na biljni rast vrednovana je prema mjerenjima parametara za sedam obilježja: visina, širina i dužina biljke, broj listova, širina najvećeg lista, dužina najvećeg lista i broj cvjetova. Procjena efekta aplikacije mikrokapsula STP+Ca vrednovana je za svako obilježje modificiranom interpretacijom Indeksa učinkovitosti (*I*) za vrednovanje učinkovitosti *T. viride* na biljni rast kupusa i cikle (Topolovec-Pintarić i sur. 2013.). U praksu originalnim izračunom Townsend-Heubergerova Indeksa *I* vrednuje učinkovitost primjenjenog fungicida na suzbijanje bolesti te se očekuje najviši intenzitet bolesti na kontrolnim netretiranim biljkama (Townsend-Heuberger, 1943.). U istraživanju učinkovitosti bio-gnojiva, dakle ovakvom tipu istraživanja, ulazi se s pretpostavkom da će vrijednosti na kontroli biti niže jer se od formulacije bio-gnojiva očekuje pozitivan utjecaj na biljni rast.

U provedenom istraživanju svih sedam obilježja razvoja biomase i cvjetanja maćuhice mikrokapsule STP+Ca imale su slabije djelovanje što je vidljivo već iz srednjih vrijednosti očitanih rezultata. Naravno da se to odrazilo na izračun Indeksa *I* koji su imali negativan predznak te kod interpretacije ustvari treba voditi računa da kao takvi pokazuju koliko postotaka je tretman Mikrokapsule STP+Ca bio lošiji od Kontrole. Rezultati su prikazani u tablicama 4.1-4.8.

Prvo očitavanje provedeno na maćuhicama tretiranim Mikrokapsulama STP+Ca pokazalo je kako Kontrolne biljke bolje napreduju. U početnom očitavanju još nije bila formirana rozeta te je utvrđen samo broj listova. Veći broj listova utvrđen je na Kontroli (5) nego na varijanti Mikrokapsule STP+Ca (4,4). Drugo očitavanje je također pokazalo kako Kontrolne biljke bolje napreduju (7,10) u odnosu na Mikrokapsule STP+Ca (6,62). U trećem očitavanju vrijednost na Kontroli iznosi 11,34 listova dok je očitana vrijednost za varijantu Mikrokapsule STP+Ca bila 9,84. Najveća razlika je zabilježena tokom četvrtog očitavanja, vrijednost očitavanja na Kontroli je iznosila 16,46 dok je vrijednost na varijanti Mikrokapsula STP+Ca bila manja te je iznosila 13. Srednja vrijednost petog očitavanja varijante Mikrokapsule STP+Ca iznosila je 8,47 dok je kod Kontrole ta vrijednost veća i iznosi 9,98. Najveći broj listova prilikom prvog očitavanja varijante Mikrokapsule STP+Ca iznosio je 7 dok je najmanji bio 2 lista. U Kontroli najveća biljka je imala također 7 listova, a najmanja 3 lista. Broj listova nije praćen u sljedećim mjerenjima 1. prosinca, 8. prosinca i 21. prosinca zbog bujnog rasta rozete.

Prilikom prvog očitavanja za parametar širina lista Kontrola je pokazala bolje rezultate. Tokom sljedećeg očitavanja razlika između dvije varijante se smanjila te je srednja vrijednost Kontrole iznosila 24,26 dok je kod varijante Mikrokapsule STP+Ca vrijednost bila manja te je

iznosila 23,56. U sljedećim očitavanjima razlika se povećala te je tako 24. studenog iznosila za Kontrolu 46,22 a za varijantu Mikrokapsule STP+Ca 40,87.

Parametar duljina lista praćen je tokom četiri očitavanja. Prilikom prvog očitavanja srednja vrijednost varijante Mikrokapsula STP+Ca je manja (18,77) od srednje vrijednosti Kontrole (19,76). Maksimalna vrijednost u ovom očitavanju zabilježena je kod Mikrokapsula STP+Ca te je iznosila 30. Prilikom sljedećeg očitavanja srednja vrijednost Kontrole je ponovno veća (24,9) u odnosu na Mikrokapsule STP+Ca (23,5). No, maksimalna zabilježena vrijednost je opet kod varijante Mikrokapsule STP+Ca i iznosi 37. Prilikom očitavanja 17. i 24. studenog maksimalna veličina i srednja vrijednost su veće kod varijante Kontrola.

Parametar širina biljke u prvom očitavanju pokazuje manju prosječnu vrijednost Mikrokapsula STP+Ca (32,14) od Kontrole (34,69). Maksimalna vrijednost ovog parametra zabilježena je kod varijante Mikrokapsula STP+Ca (70), dok je kod Kontrole manja (60). Prvo očitavanje u listopadu pokazuje veću vrijednost Kontrole te jednaku maksimalnu vrijednost za obje varijante. Treće očitavanje pokazuje znatno povećanje srednjih vrijednosti u odnosu na predhodno. Maksimalne vrijednosti su povećane za 30%. Prosječna vrijednost trećeg očitavanja za varijantu Mikrokapsule STP+Ca je iznosila 83,11 dok je za Kontrolu veća i iznosi 93,80. Posljednje očitavanje u listopadu pokazuje veću maksimalnu širinu biljke kod Kontrole (160) te nižu vrijednost u varijanti Mikrokapsula STP+Ca (158). Srednja vrijednost varijable za ovaj parametar je nešto viša kod Kontrole (72,96) u odnosu na vrijednost varijante Mikrokapsule STP+Ca (69,94).

Parametar visina biljke tokom početnog mjerenja ne pokazuje značajne razlike. Prosječna vrijednost za varijantu Mikrokapsule STP+Ca iznosi 32,23 dok za varijantu Kontrola iznosi 33,8. Najveća maksimalna vrijednost zabilježena tokom prvog očitavanja je 60 kod varijante Mikrokapsule STP+Ca. Očitavanje 4. listopada donosi veću prosječnu vrijednost tretmana Mikrokapsule STP+Ca (40,1) dok je kod Kontrole vrijednost 38,17. Maksimalne vrijednosti tokom ovog očitavanja su ujednačene. Treće očitavanje također pokazuje veću vrijednost kod varijante Mikrokapsule STP+Ca (62,19) u odnosu na Kontrolu (55,66). U ovom očitavanju maksimalne vrijednosti su podjednake te iznose 90. U sljedećem očitavanju zabilježen je nagli rast u Kontroli (72,52), dok je rast kod Mikrokapsula STP+Ca neznatan (63,48). Prvo očitavanje u prosincu pokazuje izjednačavanje dobivenih srednjih vrijednosti na 103.

Parametar dužina biljke je očitavan u četiri navrata. Prilikom prvog očitavanja tretman Mikrokapsule STP+Ca pokazuje lošiji rezultat nego Kontrola. Prosječna vrijednost Kontrole iznosi 60,43 dok je vrijednost Mikrokapsula STP+Ca 56,6. U drugom očitavanju razlika se povećava te prosječna vrijednost Kontrole iznosi 82,96 u odnosu na vrijednost varijante Mikrokapsula STP+Ca (73,33). Minimalna i maksimalna duljina rozete u ovom periodu su podjednake za obje varijante. U trećem očitavanju maksimalna vrijednost dužine biljke je zabilježena kod Mikrokapsula STP+Ca. Posljednje očitavanje donosi veću srednju vrijednost u varijanti Mikrokapsule STP+Ca (127,8) dok Kontrola ima manju vrijednost (125,17).

Prilikom očitavanja rezultata za varijantu broj cvjetova zabilježen je veći broj cvjetova u Kontroli nego kod Mikrokapsula STP+Ca. U prva dva mjerenja 21. listopada te 4. studenog maćuhice nisu dostigle fazu cvatnje te ti datumi nisu bili vrednovani. Varijanta Mikrokapsule STP+Ca tijekom mjerenja 17. listopada imala je 1 cvijet, dok je na Kontroli zabilježeno 18 cvjetova. U petom očitavanju 1. prosinca zabilježeno je 15 cvjetova na varijanti Mikrokapsule STP+Ca te 51 cvijet na Kontroli. Razlika između dvije varijante iznosi približno 30%. Broj

cvjetova u šestom očitavanju za varijantu Mikrokapsule STP+Ca iznosi 27, a za Kontrolu 59. Završno očitavanje za varijantu Mikrokapsule STP+Ca iznosi 35, za varijantu Kontrola 57. Konačni rezultat srednjih vrijednosti za broj cvjetova kod varijante Mikrokapsule STP+Ca iznosi 18,4, dok je Kontrola 45,6.

Tablica 4.1. Prikaz vrijednosti očitavanja za broj listova

Tretman	Datum očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	4,4 (2-7)	6,62 (4-12)	9,84 (6-18)	13 (6-28)	-	-	-	8,47
Kontrola	5,02 (3-7)	7,10 (5-12)	11,34 (5-20)	16,46 (8-28)	-	-	-	9,98

Tablica 4.2. Prikaz vrijednosti očitavanja za dužinu lista

Tretman	Datum očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	18,77 (12-30)	23,52 (15-37)	35,66 (20-51)	45,87 (20-50)	-	-	-	30,96
Kontrola	19,76 (10-27)	24,93 (13-36)	28,07 (23-52)	47,18 (18-55)	-	-	-	32,48

Tablica 4.3. Prikaz vrijednosti očitavanja za širinu lista

Tretman	Datum očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	16,84 (9-25)	23,56 (15-32)	34,4 (18-52)	40,87 (21-86)	-	-	-	28,92
Kontrola	18,53 (10-27)	24,26 (15-36)	36,67 (19-50)	46,22 (22-63)	-	-	-	31,42

Tablica 4.4. Prikaz vrijednosti za parametar dužina biljke

Tretman	Datum očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	56,6 (31-86)	73,33 (40-105)	105,41 (62-155)	127,48 (63-171)	-	-	-	90,73
Kontrola	60,43 (34-95)	82,96 (41-106)	110,14 (60-153)	125,17 (81-174)	-	-	-	94,67

Tablica 4.5 Prikaz vrijednosti za parametar širina biljke

Tretman	Datumi očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	32,14 (12-70)	57,18 (26-92)	83,11 (50-130)	107,3 (52-158)	-	-	-	69,94
Kontrola	34,69 (16-60)	60,29 (31-92)	93,80 (50-135)	103,04 (62-160)	-	-	-	72,96

Tablica 4.6. Prikaz vrijednosti za parametar visina biljke

Tretman	Datumi očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	32,23 (20-60)	40,1 (18-58)	62,19 (30-90)	63,48 (31-115)	103,4 (42-148)	107,98 (72-154)	127,93 (60-168)	76,76
Kontrola	33,08 (5-55)	38,17 (15-58)	55,66 (20-90)	72,52 (38-106)	103,66 (45-141)	120,23 (74-156)	125,9 (61-166)	78,46

Tablica 4.7. Prikaz vrijednosti za broj cvjetova

Tretman	Datumi očitavanja							Srednja vrijednost
	21.10.	4.11.	17.11.	24.11.	1.12.	8.12.	21.12.	
Mikrokapsule STP+Ca	0	0	1	14	15	27	35	18,4
	Maksimalan broj cvjetova po biljci: 2							
Kontrola	0	0	18	43	51	59	57	45,6
	Maksimalan broj cvjetova po biljci: 3							

Kako bi se mogao vrednovati utjecaj Mikrokapsula STP+Ca na vegetativni i generativni rast maćuhice originalna Townsend-Heuberger (1943.) formula za izračun indeksa učinkovitosti je modificirana. Naimeu praksi se Indeksom vrednuje učinkovitost primijenjenog fungicida na suzbijanje bolesti te se očekuje najviši intenzitet bolesti na kontrolnim netretiranim biljkama. U ovakvom tipu istraživanja učinkovitosti bio-gnojiva, ulazi se s pretpostavkom da će vrijednosti na kontroli biti niže jer se od formulacije bio-gnojiva očekuje pozitivan utjecaj na biljni rast. Stoga u originalnoj formuli a postaje srednja vrijednost tretmana, a b srednja vrijednost kontrole, kao što je to modificirala Topolovec-Pintarić za vrednovanje učinkovitosti *T. viride* na biljni rast kupusa i cikle (Topolovec-Pintarić i sur. 2013.). Prema Indeksima učinkovitosti mikrokapsule STP+Ca nisu pozitivno utjecale na vegetativni rast dok su nepovoljno utjecale na generativni rast. Biljne rozete tretiranih biljaka bile su slabije razvijene (dužina $I = -4,34\%$; širina $I = -4,32\%$), a listovi sitniji (dužina $I = -6,28\%$; širina $I = -8,64\%$). Tretirane biljke su tjedan dana kasnije ulazile u cvatnju koja je bila daleko slabija naspram cvatnje kontrolnih biljaka (broj cvjetova $I = -147,83\%$).

Tablica 4.8. Indeks učinkovitosti mikrokapsula STP+ Ca na rast i cvatnju maćuhice

RED.BR.	OBILJEŽJE	MIKROKAPSULE STP+Ca	KONTROLA	I (%)
1.	Dužina biljke	90,73	94,67	-4,34
2.	Širina biljke	69,94	72,96	-4,32
3.	Visina biljke	76,76	78,46	-2,21
4.	Broj listova	8,47	9,98	-17,83
5.	Širina lista	28,92	31,42	-8,64
6.	Dužina lista	30,56	32,48	-6,28
7.	Broj cvjetova	18,4	45,6	-147,83

Prema rezultatima iz Tablice 4.8. jasno je uočljivo da je za razliku od drugih mjerenih parametara broj cvjetova kod varijante Mikrokapsule STP+Ca drastično manji nego kod Kontrole. Razlika između Kontrole (45,6) i Mikrokapsula STP+Ca (18,4) može se objasniti činjenicom da je nastanak fosfatnih soli (kalcijev fosfat, kalcijev hidroksifosfat, kalcijev dihidrogenfosfat) supresivno djelovao na broj cvjetova jer maćuhica ne odgovara povišeni fosfat u tlu, kao ni soli. Kao što je nedostatak fosfora povezan s nedostatkom kalcija tako i dostupnost kalcija poboljšava dostupnost fosfora u biljci. Izolat STP učinio je kalcij dostupnijim biljci, kao i fosfor u supstratu. Međutim, u supstratu se dogodilo vezanje kalcija s fosforom, koji je bio u suvišku, što je dovelo do nastanka fosfatnih soli. Utjecaj kalcija na cvatnju maćuhice zbog toga nije bilo moguće vrednovati. Obzirom da su Mikrokapsule STP+Ca negativno utjecale na generativni rast može se zaključiti kako je inkapsulirana *Trichoderma viride* uspješno aktivirala kalcij i omogućila njegovo ispuštanje iz kapsula u supstrat.

Korišteni supstrat Klasmann-Delmann Supstrat 2 GmbH (Geeste, Njemačka), kako je već navedeno, ima odnos NPK 14:10:18. No, maćuhica preferira NPK 15:2:20 što bi značilo da u korištenom supstratu ima fosfora u suvišku te kalija i dušika manje nego što maćuhici pogoduje (Kljak i sur. 2016). Maćuhica preferira kisele uvjete te ih većina proizvođača i koristi, no količina fosfora treba biti ograničena kako bi biljke ostale kompaktne te ne smije biti previsoka. Zbog toga bi bilo korisno ponoviti pokus koristeći prikladniji supstrat koji više odgovara maćuhici jer korišteni supstrat prema uputstvima koji se nalaze na poleđini nije preporučljiv za maćuhice, zbog povećanog udjela fosfora. U istraživanju od strane Whipker i sur. (2002.) provedenom na North Carolina sveučilištu autori su došli do zaključka da na

američkom tržištu ne postoji ni jedno gnojivo koje bi u potpunosti zadovoljilo potrebe maćuhice. Sve mješavine gnojiva su osnovne i za zdrave maćuhice treba kombinirati različita gnojiva koja su u ponudi (15-2-10, 15-3-30, 13-2-13). Ovim postupkom osiguravaju se adekvatne količine kalcija, magnezija i mikroelemenata, ali uz to imaju i nisku količinu fosfora. Važan faktor kojeg treba pratiti je svakako i pH koji treba ostati unutar prihvatljivog raspona 5,4-5,8(Whipker i sur. 2002.).

U korištenom supstratu, dobivenom zajedno s presadnicama maćuhice od lokalnog proizvođača Klasmann-Delmann Supstrat 2 GmbH pH vrijednost je iznosila 5,5- 6,5. No, maćuhicama pogoduje kiseliji pH u rasponu od 5,4 – 5,8 prema Whipker i sur (2002.). Kao što je poznato vrijednost pH je od izuzetnog značaja za biljku, za njezin pravilan razvoj, ali i kako bi dostupna hraniva bila na raspolaganju biljci (Kljak i sur. 2016.).

Maćuhice su zbog svoje veličine pogodne za rukovanje, ali ujedno su i izrazito osjetljive. Provedbom istraživanja uočeni su nedostaci aplikacije navedene formulacije. Aplikacija se vršila manualno te je za svaku test biljku bilo potrebno posebno odvagnuti 2 grama. Budući da se presađivanje maćuhica u praksi obavlja ručno aplikacija Mikrokapsula STP+Ca nije iziskivala povećani napor. No, prije aplikacije za svaku od ukupno 100 biljaka bilo je potrebno napraviti odvagu. Ovaj dio je bio izrazito dugotrajan te je iziskivao veliku preciznost te vrijeme.

Za razliku od Mikrokapsula STP+Ca aplikacije druge formulacije *Trichoderma viride* pokazala je drugačije rezultate (Štorga 2016.). U ovom radu se istraživao utjecaj izolata STP na rast i cvatnju maćuhice, kao i aplikabilnost tekuće formulacije suspenzije spora. Suspenzija sporaje uspješno promovirala rast biljaka maćuhice i učinila pristupačnost hranjiva u supstratu boljom što se može zaključiti iz većeg broja listova naspram netretiranih biljaka Kontrole. Dok je kod Mikrokapsula STP+Ca u Kontroli bio veći broj listova. Kod stimulacije generativnog rasta suspenzija spora STP se kao i Mikrokapsule STP+Ca pokazala lošijom od netretirane kontrole. Prednosti Suspenzije spora STP su jednostavna dozacija te baratanje samom suspenzijom (za razliku od prethodno navedenih potrebnih odvaga za varijantu Mikrokapsule STP+Ca). Polazeći od dobivenih rezultata vidljivo je da je suspenzija spora polučila bolje rezultate u promoviranju vegetativnog rasta od Mikrokapsula STP+Ca.

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog pokusa i analize podataka zaključujem:

1. Mikrokapsule STP+Ca nisu pozitivno utjecale na vegetativni rast. Biljne rozete tretiranih biljaka bile su slabije razvijene, a listovi sitniji.
2. Posebno negativan utjecaj mikrokapsule STP+Ca imale su na generativni rast. Tretirane biljke su kasnije otpočele s cvatnjom naspram kontrolnih biljaka, a stvarale su i manji broj cvjetova.
3. Aplikacija formulacija mikrokapsule STP+Ca provodila se ručno prilikom presađivanja što je prihvatljivo jer se presađivanje u praksi obavlja ručno. Osnovna zamjerka je priprema odvaga koja je prethodila aplikaciji.
4. Istraživanje je pokazalo kako je za uzgoj maćuhica važno odabrati odgovarajući hranidbeni supstrat, koji nema visoku koncentraciju fosfora, te sukladno sastavu supstrata odabirati odgovarajuću prihranu, kako kemijsku tako i bio-gnojiva.

6. LITERATURA

1. Bačvanski Lj. (2011.) Sadnja maćuhica, Agroklub
, Osijek <https://www.agroklub.com/hortikultura/sadnja-macuhica/5616/> pristupljeno 25.9.2017.
2. Baškarić L. (2014). Asortiman vrsta *Viola wittrockiana* gams i *Viola cornuta* L.,
Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
3. Bisby G. R. (1939). *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. Trans.
Br. Mycol. Soc. 23: 149-168.
4. Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., Samuels J. G. (2015). Trichoderma morphology.
International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea
<<http://www.isth.info/morphology.php>>
5. Druzhinina I., Kubicek C. P. (2005). Species concepts and biodiversity
in *Trichoderma* and *Hypocrea* : from aggregate species to species clusters?" Journal of
Zhejiang University SCIENCE. 6B (2):100-112
><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389624/>< posjećeno 6.7.2017
6. Druzhinina I., Kopchinskiy AG. (2006). *TrichOKEY* v.2-a DNA oligonucleotide Bar
Code program for the identification of multiple sequences of *Hypocrea* and *Trichoderma*.
Proceedings of the 8th International Mycological Congress, Cairns, Australia. pp. 53-59,
Bologna, Italy
7. Erhatic R., Vukobratović M., Peremin Volf T., Židovec V. (2010). Morphological
and chemical properties of selected sweet violet populations // Journal Central European
Agriculture, 11, 1; 55-64
8. Harman G. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived
from research in *Trichoderma harzianum* T22, Plant Disease. Vol. 84, 377-393
9. Harman G. (2006). Overview of mechanisms and uses
of *Trichoderma* spp. Phytopathology.;96:190-
194><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886115/><pristupljeno 29.8.2017.
10. Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of
Trichoderma and of its genes. Microbiology department, Velika Britanija 158: 17-25

11. Jug I. (2016). Elementi biljne ishrane , ppt, Poljoprivredni fakultet, Osijek <http://ishranabilja.com.hr/literatura/tloznanstvo/Elementi.pdf> pristupljeno 29.8.2017
12. Krug B. A., Whipker B.E., Frantz J., McCall I. (2009). Characterization of Calcium and Boron Deficiency and the Effects of Temporal Disruption of Calcium and Boron Supply on Pansy, Petunia and GerberaPlugs. HortiScience.,no6 1566-1572
><http://hortsci.ashspublications.org/content/44/6/1566.full> < posjećeno 9.9.2017
13. Kubicek CP., Penttilä ME. (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. Taylor and Francis Ltd., London, 1998, pp. 49-71.
14. Kukoč M. (2005). Maćuhica-ukras proljetne gredice, Slobodna Dalmacija<http://arhiv.slobodnadalmacija.hr/20050330/vrt01.asp> pristupljeno 25.9.2017.
15. Martinko K. (2015). Interakcija *Trichoderma viride* i *Fusarium solani* u prisutnosti Raxil TM GEL 206, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
16. Moscarda S. (2013). Primjena gnojiva i bio-stimulatora rasta u uzgoju presadnica arnike (*Arnica montana*), Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
17. Parađiković N. (2006). Osnove cvjećarstva (predavanja), Poljoprivredni fakultet, Osijek
18. Persoon CH. (1974). Disposita methodica fungorum. Römer's Neues Mag Bot. 1794;1:81–128.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2886115/>
19. Rifai M. A. (1969) . A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Pap. 116: 1-56.
20. Popović A. (2010). Izrada formulacije alginatnih peleta na osnovu gljive *Trichoderma viride*; Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb

21. Samuels G. J., Jaklistich W. M., Dood S. L. (2006). *Hypocrea rufa* /*Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia dodati www link
22. Samuels. G. J., (2007). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state and ecology, *Phytopathology*, Vol. 96; 195-206.
23. Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A. et al. (2014). Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virol Mycol* 3:127. doi:10.4172/2161-0517.1000127
24. Sorić B. (2010). Utjecaj mikrokapsula na osnovi *Trichoderma viride* obogaćenih kalcijem na rast rajčice; Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
25. Syngenta><https://www.syngenta.hr/product/crop-protection/fungicid/quadris>
<pristupljeno 6.7.2017.
26. Škvorc Ž., Ćosić K., Sever K. (2014). Ishrana bilja; interna skripta, Šumarski fakultet, Zagreb
27. Štorga G. (2016). Stimulacija rasta i cvatnje maćuhica izolatom STP mikorizne gljive *Trichoderma viride*, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb
28. Topolovec-Pintarić S., Cvjetković B., Miličević T. (2004). Biofungicidi Temeljeni na *Trichoderma* vrstama, *Glasilo biljne zaštite* 4; 239-241
29. Topolovec-Pintarić, S., Žutić I., Đermić E. (2013): Enhanced growth of cabbage and red beet by *Trichoderma viride*, *Acta Agriculturae Slovenica*, 100
30. Tošić M. (1976). Poljoprivredna enciklopedija, Jugoslavenski leksikografski zavod. Zagreb

31. Townsend, G.R., Heuberger, J.W. (1943): Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* 2, 340-343
32. Whipker B.E., Cavins T.J., Gibson J.L. (2002). Managing fall pansy fertilization; NC State university, SAD
33. Vojin Gligić, (1953.) Etimološki botanički rečnik, Sarajevo: "Veselin Masleša" Sergej Forenbacher, (2001.), Velebit i njegov biljni svijet, Zagreb: Školska knjiga, ISBN: 953-0-60545-5
34. Vinceljak-Toplak M. (2010.) Cvjećarstvo: Jednogodišnje i dvogodišnje cvjetne vrste, opći i specijalni dio; interna skripta, Agronomski fakultet, Zagreb

Internet

ABM company <<http://www.abm1st.com/international/src/trichoderma-benefits>> pristupljeno 6.7.2017.

Botanical- Heartsease <<http://botanical.com/botanical/mgmh/h/hearts10.html>> pristupljeno 28.10.2016.

EM-TEH <<http://emteh.hr/novosti/-novi-preparat-u-ponudi-vital-tricho>> pristupljeno 6.7.2017.

Maćuhica <http://www.plantea.com.hr/macuhica/> pristupljeno 28.10.2016

Međimurje.hr <<https://medjimurje.hr/aktualno/kolumne/korisni-mikroorganizmi-protiv-biljnih-patogena-3331/>> pristupljeno 6.7.2017

Pansies <<http://www.almanac.com/plant/pansies>> pristupljeno 3.11.2016

Životopis

Manuela Pavina rođena je 8.4.1992. godine u Karlovcu. Završava osnovnu školu „Alojzija Stepinca“ u Krašiću te upisuje srednju školu u Jastrebarskom, smjer-opća gimnazija. Nakon srednje škole upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu usmjerenja hortikultura. Završava preddiplomski smjer obranom završnog rada pod mentorstvom izv. prof. dr sc. Ksenije Karlović na temu Dendroflora parka Zrinjevac. Govori: engleski, španjolski, njemački te talijanski jezik. Tokom studija stječe mnoga znanja i vještine radom preko student servisa gdje ima prilike i okušati se u poslovima vezanim za svoj studij (rad unutar podružnice Zrinjevac te rad u poznatoj njemačkoj kompaniji s proizvodima za zaštitu bilja). Povodom završetka predavanja na diplomskom smjeru dobiva poziv za odlazak u Europski parlament (Bruxelles) kako bi bila поближе upoznala s njegovim radom te djelovanjem AGRI odbora. Također, sudjeluje u Erasmus+ programima u inozemstvu (Turska- program „Think first then consume“) i Hrvatskoj (SOS-Save our seas- aktualni problemi koji pogađaju biljni svijet Jadranskog mora).