

Značaj primjene askomicetne gljive *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

Petrinić, Patricija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:204:830520>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-15**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Značaj primjene askomicetne gljive *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

DIPLOMSKI RAD

Patricija Petrinić

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Fitomedicina

Značaj primjene askomicetne gljive *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

DIPLOMSKI RAD

Patricija Petrinić

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

Mentor:

Zagreb, rujan, 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Patricija Petrinić**, JMBAG 017806612, rođen/a 01.06.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Značaj primjene askomicetne gljive *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

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 studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Patricije Petrinić**, 0178106612, naslova

Značaj primjene askomicetne gljive *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv.prof.dr.sc. Snježana Topolovec-Pintarić mentor

2. doc.dr.sc. Joško Kaliterna član

3. prof.dr.sc. Božena Barić član

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	3
2. Primjena roda <i>Trichoderma</i> u biološkom suzbijanju	4
3. <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.....	9
4. Morfološki opis vrste <i>Trichoderma harzianum</i>	11
4.1. Anamorfni stadij	12
4.2. Teleomorfni stadij.....	14
5. Primjena <i>Trichoderma harzianum</i> u poljoprivredi	16
6. Zaključak.....	22
7. Popis literature	23
Životopis	28

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Patricija Petrinić**, naslova

Značaj primjene askomicetne gljive *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

Kroz godine neprestanog korištenja kemijskih sredstava u zaštiti bilja, došlo je do ozbiljnog zagađenja tla i nepovoljnih utjecaja na okoliša te se kemijska sredstva sve više zamjenjuju različitim načinima biološkog suzbijanja, a između ostalog i primjenom bioloških pripravaka. Bio-fungicidi na osnovu *Trichoderma* vrsti dominantni su na svjetskom tržištu s udjelom od 60 % i danas broje oko 250 bio-pripravaka. Prvi bio-pripravak na osnovu *Trichoderma* vrste bio je Trichodex na osnovu vrste *T. harzianum* T39, a koristio se kao kontaktni antibiotski fungicid enzimske aktivnosti namjenjen suzbijanju uzročnika sive plijesni vinove loze i jagoda (*Botrytis cinerea*). Vrsta *T. harzianum* Rifai je stanovnik tla i ubikvist te je s agronomskog aspekta poznati bio-čimbenik protiv, ne samo fitopatogenih gljiva, već i nematoda i bakterija. Danas, samo bio-pripravci na osnovu vrste *T. harzianum* čine 83 % svjetske proizvodnje. Najčešće su to formulacije za aplikaciju u tlo, a koriste se u proizvodnji 87 poljoprivrednih kultura i to protiv 70 fitopatogenih vrsta gljiva koje naseljavaju rizosferu ali i 18 vrsta koje obitavaju u filosferi. U novije vrijeme sve je više bio-fungicida koji nisu isključivo na osnovu *T. harzianum* već njenom kombinacija s s jednom ili više drugih *Trichoderma* vrsta. Ovaj rad uz mikološku deskripciju *T. harzianum* prezentira podatke o zastupljenosti bio-pripravaka na osnovu ove vrste na svjetskom tržištu bio-fungicida i obrazlaže mehanizme djelovanja temeljene na metaboličkoj aktivnosti.

Ključne riječi: antagonizam, biološko suzbijanje, *Trichoderma harzianum*, bio-pripravci, bio-čimbenici

Summary

Of the master's thesis – student **Patricija Petrinić**, entitled

The significance of ascomycete *Trichoderma harzianum* fungus application in agriculture

Through the years of continuous use of chemical agents in plant protection, came to serious soil contamination and adverse environmental impacts and chemical agents are increasingly being replaced by various biological control methods and inter all, by application bio preparations. Bio-fungicides based on *Trichoderma* species are dominant in the world market with the share of 60% and today number 250 bio-preparations. First bio-preparation based on *Trichoderma* species was Trichodex which is based on species *Trichoderma harzianum* T-39 and was used as contact antibiotic fungicide enzymatic activities intended to control the causative agents grey mold of vines and strawberries (*Botrytis cinerea*). *Trichoderma harzianum* Rifai species is a resident of the soil and a ubiquitous and from an agronomic point of view is a well known bio-factor against, not only phytopathogenic fungi, but also nematodes and bacteria. Nowadays, only bio-preparations based on *T.harzianum* make up 83% of world production. These are the most common formulations for application into the soil, and are used against 70 phytopathogenic species of fungi that inhabit the rhizosphere, but also against 18 species of fungi, that inhabit phyllosphere. More recently, there are more and more bio-fungicides that are not exclusively based on *T.harzianum*, but it is also combination with one or more *Trichoderma* species. This work with mycological description of *T.harzianum* presents data on the presence of bio-preparations based on this species in the world market of bio-fungicides and explains the mechanisms of action based on metabolic activity.

Keywords: antagonism, biological combat, *Trichoderma harzianum*, bio-preparations, bio-agents

1. Uvod

U današnjem, sve naprednijem svijetu i sa sve većom proizvodnjom i osvrtom na poljoprivredu, veliki broj proizvođača želi postići što bolju kvalitetu i količinu poljoprivrednih proizvoda te pritom smanjiti rizik od svih nedaća koje prate poljoprivrednu proizvodnju. Sve više proizvođača odlučuje se na uvođenje alternativnih mjera u zaštiti bilja, gdje zaslužno mjesto nalaze kako biološki preparati tako i ostale nepesticidne mjere zaštite (Grahovac, 2009).

Uporabom korisnih mikroorganizama sve se bazira na njihovim produktima metabolizma kao što su spore, toksini, kristali i antibiotici. Mikroorganizmi imaju antagonističko djelovanje na pojedine uzročnike bolesti kao što su korovi, štetni kukci i nematode. Korisni produkti mikroorganizama poput enzima i vitamina imaju pozitivan učinak na povećanje otpornosti tretiranih biljaka. Bezopasni su za ljude i korisne organizme te su ekološki privatljiviji. Podjela biopesticida izvršena je prema vrsti organizama koje suzbijaju, i to na: bioinsekticide, biofungicide i bioherbicide. U Hrvatskoj je ta podjela također prihvaćena (Igrc-Barčić i Maceljski, 2001).

U zaštiti bilja dominiraju kemijske mjere suzbijanja, odnosno korištenje kemijskih sredstava iz nekoliko skupina pesticida. Kao sintetski spojevi, pesticidi su različitog kemijskog sastava, toksikoloških osobina, perzistentnosti i potencijalni su zagađivači životne sredine. Međuprodukti degradacije često su perzistentniji od polaznog soja, ostaju duže vrijeme u tlu ili vodi (podzemne vode), što može imati posljedice i za sljedeće biljke u plodoredu (Grahovac, 2009).

Carstvo Gjiva (Mycota, Fungi) bogato je vrstama koje je moguće koristiti u biološkoj borbi protiv njihovih srodnika, gljiva koje su uzročnici bolesti, insekata, nematoda i korova. Među poznatije vrste koje se koriste u svrhu suzbijanja fitopatogenih gljiva svakako treba ubrojiti filamentozne askomicetne gljive roda *Trichoderma*. Vrste roda *Trichoderma* stanovnici su različitih vrsta tala, šumskih i poljoprivrednih, u kojima su važna komponenta ekosistema biljnih korijena (Topolovec-Pintarić i sur., 2004).

Od ranih 1930-ih godina, kada je Weindling izvjestio da *Trichoderma lingnorum* proizvodi i izlučuje „smrtonosni princip“ (lethal principle) u okruženju, znanstvenici se uključuju u istraživanja antimikotičnih sposobnosti *Trichoderma* vrsta, te se ispostavlja da je *T. harzianum* najistaknutija vrsta ovog roda. Danas njihova poljoprivredna važnost ima dobre antagonističke sposobnosti u tlu gdje se nalaze patogene gljivice zahvaljujući različitim mehanizmima kao što su proizvodnja antimikotičnih metabolita (antibiotika), kompeticija za prostor i hranjive tvari, inducirana tolerantnost biljaka i mikoparazitizam. Zajedno s objavom različitih antimikotičnih mehanizama *Trichoderma* vrsta, uočena je sposobnost promicanja rasta biljaka, povećanje lisne mase te mase suhe tvari (Topolovec-Pintarić, 2019).

Za iskorištavanje potencijala *Trichoderma* vrsta, porebno je izolirati ju iz tla, i inkapsulirati u formulaciji koja se može primjeniti u tlo. No, ponovno uvođenje u tlo, čak i najsnažnije rizosferne komponente kao što je *Trichoderma*, može biti poprilično teško. Kako bi *Trichoderma* ponovo ušla u tlo, mora se natjecati a širokim spektrom mikroorganizama koji se nalaze u tlu, sve dok ne kolonizira dostupna mjesta duž biljnih korjena (Topolovec-Pintarić, 2019)

Mikorizne gljive roda *Trichoderma* poznate su kao biofungicidi u biološkom suzbijanju, a kao sporedni efekt primjene biofungicida na osnovi *Trichoderma* vrsta zamijećen je jači porast tretiranih biljaka naspram onih koje nisu tretirane (Topolovec-Pintarić i sur., 2013).

Vrste *Trichoderma* filamentozne su gljive čiji teleomorfni stadij pripada rodu *Hypocrea*. Najčešće su uzgajane gljivične vrste za primjenu u različitim biotehnološkim procesima upravo zbog svojih specifičnih karakteristika. Imaju mogućnost kompeticije za hraniva i prostor te su poznate po izraženom antagonističkom mehanizmu na fitopatogene organizme. Dokazana je njihova sposobnost izazivanja stimulatnog efekta na klijanje sjemena i promociju rasta biljke te indukcije obrambenih mehanizama u biljaka (Kubicek i Penttila, 1998., Papavizas 1985., Sivasithamparam i Ghisalberti, 1998). U današnje vrijeme *Trichoderma* vrste smatraju se oportunističkim biljnim simbiotima jer koloniziraju površinu korijena i čak prodiru u epidermu korijenskog tkiva i nekoliko staničnih slojeva ispod ove razine uspostavljajući pseudomikorizni odnos s domaćinom biljke.

Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od bolesti cilj je današnje fitomedicine. Nastoji se postići reduciranjem klasične kemijske zaštite bilja primjenom preventivnih mjera. U ekološkoj proizvodnji kada je cilj deklarirati proizvod kao proizveden bez pesticida, prednost pred kemijskim sredstvima ima primjena bio-pripravaka. Danas se smatra kako su izravni učinci ovih vrsta na rast i razvoj biljaka od presudnog značaja za poljoprivrednu uporabu i za razumijevanje uloge *Trichoderma* vrsta u prirodnim i upravljanim ekosustavima (Topolovec-Pintarić, 2019).

1.1. Cilj rada

Značaj pripravaka na osnovu vrste *Trichoderma harzianum* u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji gleda se u iscrpnoj i bogatoj znanstvenoj literaturi u svijetu. Od prvog pripravka na osnovu ove vrste prošlo je 34 godina, a danas su pripravci na osnovu *T. Harzianum* dominantni na svjetskom tržištu sa zastupljenošću od 83%. Stoga je za cilj ovog rada odabrano potvrditi pretpostavku o značaju ove vrste za poljoprivredu izradom cjelovitog pregleda u tipu monografije vrste *T. Harzianum* temeljem podataka raznovrsnih literaturnih i internetskih izvora, uključujući i rezultate istraživanja provedenih na Zavodu za fitopatologiju. Rad donosi pregled osnova biološkog suzbijanja vrstama roda *Trichoderma* s posebnim naglaskom na *T. harzianum*, mikološku deskripciju ove vrste te podatke o povijesnom razvoju pripravaka na osnovu *T. harzianum*, kao i pregled zastupljenosti bio-pripravaka na svjetskom tržištu bio-fungicida.

2. Primjena roda *Trichoderma* u biološkom suzbijanju

Rod *Trichoderma* prvi put je spomenut 1794. godine kao zelena plijesan koja raste na potrganim granama i drugim supstratima (Persoon, 1794). Tada se smatralo da rod predstavlja samo jedna vrsta, *T. viride*. Do 1969. godine rod je proširen s još dvije vrste, *T. viride* i *T. Koningii*, a razlikovanje je napravljeno prema obliku konidija, kuglaste ili ovalne. Godine 1969. revidirana je taksonomija roda *Trichoderma* te je opisano čak 9 vrsta s obzirom na sistem grananja konidiofora, karakteristike fijaspora, raspored fijaspora i morfologiju konidija (Rifai, 1969).

Vrste roda *Trichoderma* ubrajaju se među poznatije u svrhu suzbijanja fitopatogenih gljiva. Vrste ovog roda najčešće su uzgajane mikromicete za primjenu u različitim biotehnološkim procesima zahvaljujući svojim specifičnim karakteristikama. Glavne uloge vrsta roda *Trichoderma* očituju se u njihovoj sposobnosti te mogu služiti kao indikatori obrambenih mehanizama, neutralizatori enzima koje izlučuju određeni patogeni, kolonizatori, antagonisti i promotori biljnog rasta (Kumar i Pundhir, 2009).

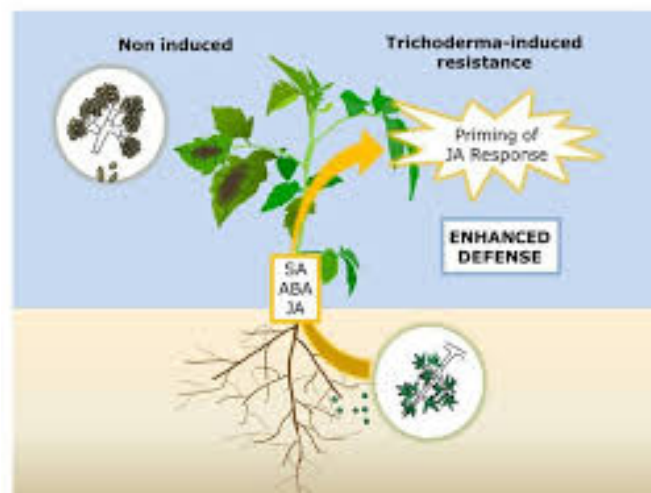
Pozitivan učinak vrsta ovog roda na biljke predmet je brojnih znanstvenih istraživanja u kojima je istražena učinkovitost ovih gljiva u suzbijanju bolesti brojnih poljoprivrednih i povrtlarskih kultura, ukrasnog bilja te pri uzgoju voća (Harman, 2000.; Howell, 2003). Biološko suzbijanje temelji se na interspecijskim odnosima antagonističkih mikroorganizama s biljnim patogenima, koje obuhvaćaju interakcije tipa antibioze, kompeticije, parazitizma i inducirane rezistentnosti (Kaliterna i Miličević, 2014). Učinkovitost vrsta roda *Trichoderma* potvrđen je i u suzbijanju brojnih gljivičnih patogena. Također, mogu se koristiti i u suzbijanju raznih bakterija i virusa usjeva te je učinkovitost čak potvrđena i u kontroli korova.

Antibiotsko i antifungalno svojstvo *Trichoderma* vrsta poznato je još od 1930-ih godina. Prema Dennis i Webster (1971.) postojanje hlapljivih organskih spojeva koje proizvode *Trichoderma* vrste mogu inhibirati rast gljivica odgovornih za propadanje drva. Od tada, vrste ovog roda postaju jedan od najčešće proučavanih mikroba biokontrole te se prodaju kao aktivni sastojci biopesticida, bio-gnojiva, pojačivača rasta biljaka i stimulansa prirodne otpornosti (Toplovec-Pintarić, 2019.). Neki od najvažnijih pripravaka na osnovi *Trichoderma* vrsta su Trichodex, Supresvit, Root Pro, Promote, Trichopel, Trichobject, RootShield koji suzbijaju razne vrste fitopatogenih gljivica u tlu kao što su *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*. Mikrobiološki inokulanti kao biološki čimbenici su antagonisti patogenih organizama, a obzirom da se radi o organizmima koji su slobodnoživi u prirodi te njihovu primjenu ne prate nedostaci karakteristični za kemijske preparate. Nažalost, nisu brza rješenja i nemaju eradikativno niti kurativno djelovanje no, atraktivni su kao alternativa naročito u organskoj i ekološkoj proizvodnji (Toplovec-Pintarić, interna skripta). Mehanizmi djelovanja antagonista na fitopatogene gljive uključuju: mikoparazitizam, antibiozu, kompeticiju za prostor i hranjiva i indukciju otpornosti biljaka domaćina (Howell 2003; Toplovec-Pintarić, 2019). U većini

slučajeva nije u pitanju samo jedan mehanizam djelovaja već sinergičko djelovanje (Dianez, 2005.). Čest je slučaj da određeni antagonist različitim mehanizmima djeluje na suzbijanje različitih uzročnika biljnih bolesti (Whipps, 2011).

Od navedenih tipova mehanizama, mikoparazitizam i kompeticija za prostor i hranjiva svrstavaju se u direktan antagonizam, koji je rezultat direktnog kontakta patogena, dok ostali predstavljaju indirektno mehanizme biološke borbe (Junaid i sur., 2013). Komercijaliziran je veliki broj bioloških pripravaka ili biopesticida, od kojih jedan dio spada u sredstva za suzbijanje biljnih patogena, te se jednim imenom nazivaju biofungicidi. U svijetu je danas za komercijalnu primjenu registrirano čak više od 100 bioloških pripravaka za suzbijanje biljnih patogena na bazi 14 vrsta antagonističkih bakterija (bakteriofungicidi i bakterioabaktericidi) i 12 antagonističkih vrsta gljiva (mikofungicidi) (Kaliterna i Miličević, 2014). Pripravci koji su temeljeni na *Trichoderma* enzimima ili genima predstavljaju novost u svijetu. Uvrštavaju se u novu skupinu tzv. „samo-štitećih“ biljaka (engl. Plant-incorporated pesticides). Predstavljaju transgene biljke koje su stečene ugradnjom gena koji kodira enzim endohitinazu, a klonirani su iz vrsta roda *Trichoderma*. Najbolji rezultati postignuti su sa transgenim biljkama rajčice, duhanai krumpirakoji su lako postali otporni na napada ekonomski značajnih patogena kao što su *Alternaria solani*, *A. alternata* te *Botrytis cinerea* (Topolovec-Pintarić, 2004).

U suvremenoj poljoprivredi, *Trichoderma* vrste se primjenjuju kao antagonisti zemljišnih uzročnika biljnih bolesti (biofungicidi). Biološko suzbijanje na osnovi *Trichoderma* vrsta koristi stoljetna znanja stečena u poljoprivredi i šumarstvu o dobrobiti očuvanja i uspostave uravnoteženih mikrobioloških zajednica (Topolovec-Pintarić, 2004).



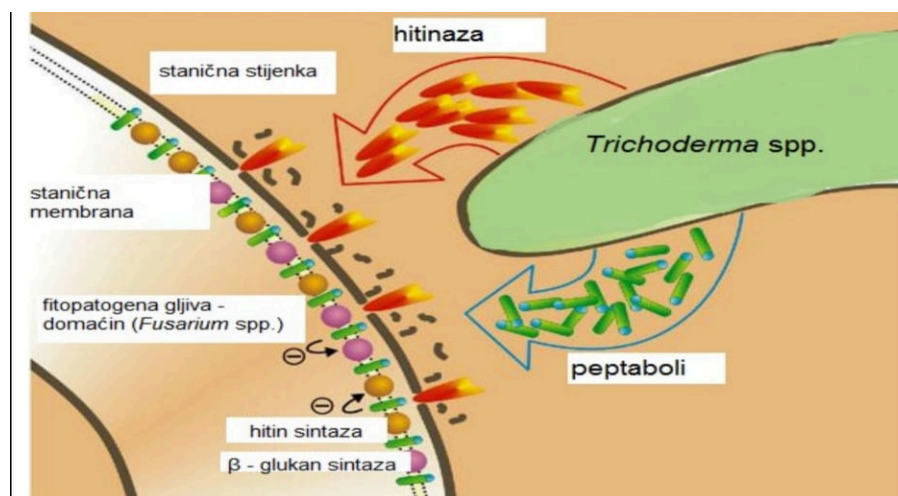
Slika 1. Upotreba roda *Trichoderma* u biološkom suzbijanju

Izvor: (https://www.researchgate.net/figure/Model-for-Trichoderma-induced-resistance-TISR-against-Botrytis-cinerea-in-tomato-Root_fig5_242334471- posjećeno 28.6.2020.)

Predatorstvo ili parazitizam podrazumjeva da organizam koji se koristi za biološko suzbijanje patogenih organizama i njime se u konačnici hrani. Prilikom ovakvog mehanizma djelovanja, biološki čimbenik mora biti prisutan prije napada patogena (Grahovac, 2009).

Stanične stijenke hifa gljivičnih patogena glavni su cilj mikoparazitizma *Trichoderma* vrsta. Istraživanja su pokazala da prilikom parazitizma *Trichoderma* vrste otpuštaju hidrolitičke enzime hitinaze i beta – 1,3 glukanaze kao primarne produkte metabolizma koji inhibiraju sintezu hitina beta glukana, tvar koja je bitna za izgradnju stanične stijenke hifa fitopatogenih gljiva (Harman i sur., 2004). Na koncentraciju hidrolitičkih enzima znatno utječe dostupan izvor ugljika u podlozi na kojoj se *Trichoderma* vrsta razvijaju. Kiseli supstrat, pH 5,5-6 s mnogo ugljika pospješuje ne samo rast micelija gljive, već pozitivno utječe na proizvodnju, a i aktivaciju hidrolitičkih enzima. Cilj napada *Trichoderma* vrsta na fitopatogene vrste leži u tome što su same fitopatogene gljive izvor ugljikohidrata (Harman i sur., 2004.; Martinko 2015). Također, dokazano je da vrste roda *Trichoderma* mogu prepoznati svog domaćina tj. drugu gljivičnu vrstu koja se nalazi na određenoj udaljenosti (Chet i sur., 1981). Direktni rast antagonista prema kemijskom stimulansu naziva se pozitivni kemotropizam. U istraživanju iz 1990. dokazano je da micelarni rast *Trichoderma* vrsta induciraju kemijski stimulansi kao što su aminokiseline i šećeri (Kumar i Pundhir, 2009). Prepoznavanje nekih biljnih patogena od strane *Trichoderma* vrsta objašnjeno je posredovanjem specifičnih lektina, što rezultira parazitacijom patogena od strana antagonističkog roda *Trichoderma* (Kumar i Pundhir, 2009.).

Mehanizam mikoparazitizma ima značajnu ulogu u antagonističkom djelovanju roda *Trichoderma* protiv širokog raspona fitopatogenih vrsta gljiva, a upravo zbog toga se te antagonističke vrste smatraju učinkovitim u zaštiti brojnih poljoprivrednih kultura koje uzrokuju brojni patogeni kao što su *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., *Fusarium* spp., i sl. (Sharma, 2012).



Slika 2. Prikaz mikoparazitizma *Trichoderma* sp.

Izvor: (http://healthyhay.vt.tuwien.ac.at/division/project.php?project_id=6 posjećeno 22.6.2020.)

Antibioza je supresivni mehanizam za preživljavanje mikroorganizama kroz eliminaciju konkurencije za izvor hrane koja je često limitirana u zemljištu pomoću toksina (Ellis i sur., 2000). Toksini antagonista su sekundarni metaboliti antimikrobnog učinka na druge organizme (Topolovec-Pintarić, 2018). Predstavnici roda *Trichoderma* produciraju viridin, triholin, glizoprenine, heptelidinsku kiselinu, terpene, pirone i peptaibole koji mogu inhibirati rast fitopatogenih gljiva (Sharma, 2012). Sve navedene komponente imaju sinergistički efekt i u kombinaciji s kompleksom hidrolitičkih enzima mogu stvoriti snažnu inhibitornu aktivnost prema velikom broju fitopatogenih gljiva iz rodova *Alternaria*, *Botrytis*, *Monilia*, *Fusarium*, *Colletotrichum* i *Diaporthae* (Bell i sur., 1982; Freeman i sur., 2004; Imtiaj and Lee, 2008; Živković i sur., 2016).

Proizvodnja sekundarnih metabolita svojstvena je vrstama odjela Ascomycota kojem sistematski pripadaju i vrste roda *Trichoderma*. Mnogi od tih metabolita su volatilne supstance, koje su bioaktivne te uključuju antibiotike kao što su penicilin, cephalosporium, imunospresant, ciklosporin i kontaminante hrane kao što su mikotoksini (Mukherjee i sur., 2012).

Nastanak sekundarnih metabolita ukazuje na to da te supstance poboljšavaju rast i razvoj organizma koji ih proizvodi. Sekundarni metaboliti često se koriste kao kemijski signali između vrsta te kao oružje kojim inhibiraju rast i razvoj drugih organizama s kojima u kompeticiji (Mukherjee i sur., 2012). Sekundarni metaboliti mogu biti „hlapive“ (volatile) i „nehlapive“ (non-volatile) supstance. Danas poznato više od 800 „hlapivih“ supstanci koje proizvode bakterije i gljive (Mukherjee i sur., 2012). Osim „hlapivih“ supstanci, vrste roda *Trichoderma*, produciraju mnogo „nehlapivih“ supstanci, uključujući neribosomne peptide (peptaboli i siderofori), poliketide, terpene i prione (Kubicek i sur., 2011; Mukherjee i sur., 2012).

Najznačajniji sekundarni metaboliti vrsta roda *Trichoderma*, kojima ove vrste ostvaruju antibiotski efekt su peptaboli. To su metaboliti iz grupe trihorziana, sadrže alfa-aminoisobutričnu kiselinu i alkohol. Peptaboli su amfifili što znači da imaju lipofilni i hipofilni karakter, što im omogućava da proizvedu tzv. transmembranske kanale koji se aktiviraju promjenama u električnom potencijalu. Ionski kanali uzrokuju perforacije te dolazi do propusnosti stijenke i istjecanje citoplazme kroz nastale otvore. Rezultat je nepovratno oštećenje stanične stijenke hifa te njihovo uginuće zbog istjecanja staničnog sadržaja (Chugh i Wallace, 2001.; Martinko, 201). Toksične supstance niske molekularne težine ometaju kolonizaciju i inhibiraju rast i razvoj štetnih organizama (Ahmed i Pichtel, 2011). Sekundarni metaboliti imaju više limitirajuću proizvodnju i distribuciju u prirodi, iako su primarni metaboliti sveprisutne esencijalne komponente u prirodi. Proizvodnja sekundarnih metabolita ovisi o uvjetima okoliša i često je ograničena. Sve navedene supstance zajedno dovode do uspješnog antagonizma patogenih vrsta gljiva i *Trichoderma* vrsta u biološkoj zaštiti od bolesti (Mukherjee i sur., 2012).

Kompeticija za prostor i hraniva podrazumjeva nadmetanje između patogenih gljiva i antagonističkih mikroorganizama, prije svega za izvor hrane, ali u konačnici i za ostale čimbenike koji su im potrebni za preživljavanje. U interakciji kompeticije antagonistički mikroorganizmi nadjačavaju bijne patogene pa se na taj način uspješno koriste kao biološki agensi ili antagonisti (Kaliterna i Miličević, 2014).

Kompeticija je jedan od važnih mehanizama kojim djeluju najpoznatiji biološki čimbenici, vrste roda *Trichoderma*, koja je moguća zahvaljujući brzom rastu, mogućnosti preživljavanja u nepovoljnim uvjetima i sposobnosti iskorištavanja hranjiva (Benitez i sur., 2004). Ovaj mehanizam za njih je specifičan jer imaju sposobnost naseliti neku biljnu površinu brže od fitopatogenih konkurenata čiji je rast i razvoj tada spriječen zbog nedostatka hranjiva i prostora. Populacija fitopatogena se ne može iskorijeniti nego postane malobrojna te prestaje biti problemom.

Kompeticija za nutrijente, primarno dušik, ugljik i željezo rezultira biološkom „borbom“ s mikroorganizmima u tlu. U većini slučajeva dolazi do natjecanja među vrstama za ograničene resurse, gdje količina navedenih nutrijenata postaje ograničavajuća usred intenzivne mikrobiološke aktivnosti (Sivan i Chet, 1989). Apsorpcija željeza kod većine filamentoznih gljiva je esencijalna za viabilnost tih organizama. Većina gljiva, kada je željezo nedostupno, izlučuje siderofore kako bi mobilizirale željezo. Siderofori, odnosno željezni nosači, su organske molekule s visokim afinitetom za željezo koje stvaraju mikroorganizmi sa svrhom prijenosa željeza iz okoline u stanicu (Mukherjee i sur., 2012). U navedenoj interakciji antagonistički mikroorganizmi su superiorniji pa se stoga koriste kao biološki čimbenici u suzbijanju patogena (Kaliterna i Miličević, 2014).

Ukoliko nema opravdanog dokaza za druge mehanizme biološkog suzbijanja u interakciji *Trichoderma*-biljni patogen, smatra se da je posrijedi kompeticija za prostori hranjiva. U svom istraživanju autor je izložio kolonije vrste *Trichoderma virens* ultraljubičastim zrakama te je na taj način proizveo mutirajuću koloniju sa smanjenom sposobnosti za mikoparazitizam i antibiozu (Howell, 2003). No, mutant je svejedno zadržao antagonistički efekt jednak roditeljskom u brobi protiv patogenih vrsta, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. Ovo istraživanje pokazalo je da za uspješnu antagonističku borbu nisu bili odgovorni ni parazitizam ni antibioza već kompeticija za prostor i hraniva kojem je mutantni izolat vrste *T.virens* uspješno inhibirao patogene u pokusu (Mukherjee i sur., 2012).

3. *Trichoderma harzianum* Rifai

Vrsta *Trichoderma harzianum* Rifai najpoznatija je pripadnica roda *Trichoderma* Pers.:Fr (1969.). Rod obuhvaća filamentozne gljive koje se prema teleomorfu klasificiraju u odjel Ascomycota, razred Sordariomycetes, red Hypocreales i porodicu Hypocreaceae (<https://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=27600>- posjećeno 31.08.2020.) (Tablica 1.).

Vrsta *Trichoderma harzianum* je slobodnoživuća i u većini slučajeva dominantna komponenta mikrobiološkog svijeta rizosfernog sloja tla. Ubikvist je koji nastanjuje različite tipove tla, a u tlu naseljava biljni korijenov sustav. Korijenje je idealno mjesto gdje *T. harzianum* koja je pravi mikoparazit nalazi svoj plijen druge gljive (Tomljanović, 2015).

Također, *T. harzianum* je oportunistički, avirulentni simbiot biljaka koji stimulira biljni rast i inducira tolerantnost i obrambeni mehanizam biljaka. Za većinu fitopatogenih gljiva mikoparazit i antagonist, što je poznato još od 30-ih godina prošlog stoljeća (Harman, 2003). Navedena svojstva osiguravaju vrsti poziciju najpoznatijeg čimenika biološkog suzbijanja u sferi suvremene zaštite poljoprivrednih kultura.

U početku se smatralo kako *T. harzianum* naseljava samo površinu korijena bez kontakta sa ostalim biljnim stanicama, ali je potvrđeno da se radi o obliku infekcije. Apresorijima vrsta omotava korijenovu dlačicu i direktno penetrira u subkutikularne slojeve (Yedidia i sur., 2000). Daljnji prodor i širenje hifa biljnim tkivom te moguću parazitaciju, *T. harzianum* sama sprječava izlučivanjem fenola koji potiču otvrdnjavanje biljnih staničnih stjenki. Istovremeno biljka je primila signal o infekciji te aktivira svoj obrambeni mehanizam. Razne biokemijske reakcije koje će uslijediti u biljci jačat će njezin obrambeni mehanizam, a time biljka postaje sistemski rezistentna na druge fitopatogene gljive (Elad i sur., 1980). Također, *T. harzianum* potiče biljnu obranu protiv same sebe, a time i protiv ostalih fitopatogenih gljiva u rizosferi. Na ovaj način uspostavljen je početak interakcije *T. harzianum* i biljke koji će postepeno izrasti u simbiotski odnos kao što je pseudomikoriza. Pseudomikoriza će, uz opisani pozitivni utjecaj na aktivaciju obrambenog biljnog sustava na biljku, povećati i rezistentnost na abiotički stres te promovirati rast biljke i njezinu produktivnost (Chang i sur., 1986). Korijen koloniziran od strane *T.harzianum* bujnije raste jer gljiva povećava usvajanje i korištenje hraniva od strane biljke što rezultira većom produktivnosti biljke (Harman, 2009). Uz sve navedeno, *T. harzianum* proizvodi enzime kojima olakšava raspadanje odumrle organske tvari, pomaže otapanju fosfata i drugih teško topivih hraniva, kao i mikroelemenata u tlu čime ih čini dostupnijima biljci. Biljke zbog dovoljne količine hranjiva postaju sve bujnije i veće te omogućuju sve jaču fotosintezu i u konačnici plodonošenje (Harman, 2000.).

Smatralo se kak je promocija biljnog rasta popratni efekt koji se javlja zbog supresiranja fitopatogena i njihovih metaboličkih produkata što pridonosi boljem zdravstvenom stanju biljke.

Sojeve *T. harzianum* uzgojene u laboratoriju moguće je introducirati u rizosferu (Topolovec-Pintarić i Sušinjak, 2005). Kad jednom dođu u kontakt s korijenom, nastanjuju njegovu površinu. Prespektivni izolati nastanit će površinu korijena čak i kad je on metar ili više pod zemljom, a inokulum se može održati i do osamanaest mjeseci nakon unošenja u tlo.

Tablica 1. Klasifikacija *Trichoderma harzianum* i *Hypocrea lixii*
(<https://www.mycobank.org/BioID/MICSDetails.aspx?Rec=27600>- posjećeno 31.08.2020.)

CARSTVO Fungi	ANAMORF	TELEOMORF
RAZDJELOVNA Eumycota	Trichoderma	Hypocrea
PODRAZDJELOVNA	Pezizomycotina	Pezizomycotina
RAZRED	Sordariomycetes	Sordariomycetes
RED	Hypocreales	Hypocreales
PORODICA	Hypocreaceae	Hypocreaceae
ROD	Trichoderma	Hypocrea
VRSTA	<i>T. harzianum</i>	<i>H. lixii</i>

4. Morfološki opis vrste *Trichoderma harzianum*

Vrsta *Trichoderma harzianum* pod ovim je nazivom opisao Rifai 1969. No, prije je prijavljena pod drugim nazivima, koji danas dolaze kao sinonimi: *Trichoderma nunbergiite* u Japanu pod sinonimom *Sporotrichum narcissi* (Rifai, 1969.; Tochinai i Shimada, 1930; Szilvinyi, 1932.) Vrsta *Trichoderma harzianum* kao i većina vrsta roda *Trichoderma* može se vizualno lako prepoznati po svojem brzom rastu micelarne kolonije na hranjivom mediju. Za rast kolonije optimalna temperatura je 25-30° C, međutim pri temperaturi od 35° C rast se usporava (Singh i sur., 2014). Fotoosjetljiva je vrsta te je spremna sporulirati na mnogim prirodnim i umjetnim podlogama u koncentričnom uzorku kao odgovor na dnevnu izmjenu svjetla i tame s konidijama koje se proizvode u razdoblju svjetlosti (Kumar i Pundhir, 2009).

Makroskopski, micelarne kolonije su u početku glatke i bezbojne, a već u prvom tjednu poprimaju smaragdno zelenu boju s izraženim koncentričnim zonama poput prstena. Pojava zelene boje kolonije odaje da je nastupila sporulacija tj. nastanak nespolnih spora konidija, koje se javljaju u velikoj praškastoj masi, a sadrže pigment (Kumar i Pundhir, 2009).

Mikroskopski, uočavaju se okrugle konidije na vrhu fialide u obliku boce. Konidiofori produciraju nesolne spore, konidije. Grananje konidiofora je dendrik tip nalik na drvo ili piramidu te su pri osnovi ogranci duži, a visinom se skraćuju, granajući se na neodređen broj nivoa (Bisset, 1990). Primarne grane mogu biti u paru, ali i nemoraju te završavati sa jednom ili više okomito položenih stanica, fialida. One su kruškolikog oblika s vršnim suženjem u subcilindrični vrat, a često dolaze u pršljenovima (Bisset, 1990). One holoblastično produciraju nespolne spore koje su po tipu nastanka fialospore (Bisset, 1990). Konidije se javljaju suhe, a rijetko se mogu nalaziti u kapljici zelene ili žute tekućine.

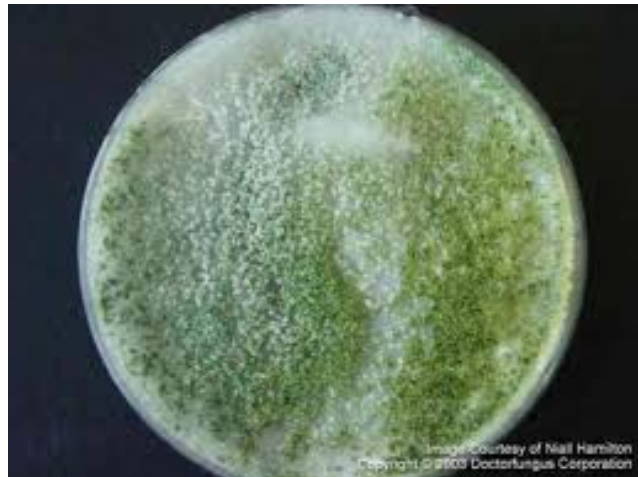
4.1. Anamorfni stadij

Vrsta *T. harzianum* opisana je kao brzorastuća kolonija (većina izlota 7-9 cm) na hranjivim podlogama (Slika 3.). Tijekom konidizacije stvaraju se zrnate ili praškaste nakupine koje će u kratkom vremenu promijeniti boju iz žućkasto-zelene u tamnozelenu boju i stvoriti pukotine ili pustule koje su obrubljene sterilnim bijelim micelijem (Kubick, 2002). U početku razvoja glatke je teksture te je prozirne ili vodenasto bijele boje. Kroz samo tjedan dana, kolonija poprima karakterističnu smaragdno do maslinasto-zelenu boju. Pojava zelene boje kolonije odaje fruktifikaciju tj. sporulaciju konidiofora nespolnim sporama- konidija tipa fijaspora (Bissett, 1991; Kumar i Pundhir, 2009). Optimalna temperatura potrebna za razvoj kolonije je 25-30° C. Dnevni porast na malt agaru može dostići čak 3,3 cm. Najviša temperatura na kojoj gljiva može rasti i razvijati se iznosi 36° C (Kubick, 2002). Sa samim razvojem, primjećuje se nastanak više ili manje sporodohija u različitim nijansama zelene boje, pa sve do žute ili rjeđe bijele boje što ovisi o kemijskom sastavu hranjivog supstrata. Sporodohiji predstavljaju nakupine konidiofora, a ujedno i nespolni stadij, anamorf.

Konidiofori su zračni ogranci hife koji se nalaze na rastresitim ili kompaktnim i jako razgranatim snopićima te ih je teško pojedinačno izdvojiti i izmjeriti (Bissett, 1991). Njihovo grananje odgovara dendrik tipu grananja, nalik drvetu ili piramidi na način da su najdulje grane položene uz osnovu centralne osi konidiofora, a prema vrhu se skraćuju. Fijalide tj. vršne konidiogene stanice konidiofora koje su kruškolikog oblika s vršnim suženjem u subcilindrični vrat, često dolaze u pršljenovima. Holoblastično produciraju nespolne spore (konidije) koje su po tipu nastanka fijaspore (Kumar i Pundhir, 2009).

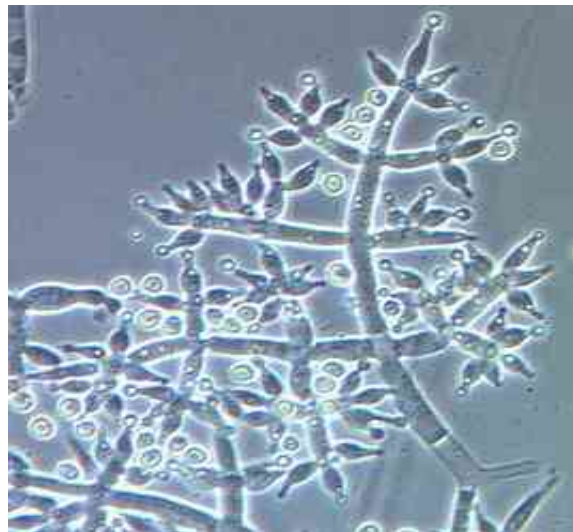
Fijalide povremenom mogu biti uparene (3,5-7,5x2,5-3,8 µm) dok su terminalne fijalide dugačke 10 µm (Kubick, 2002). Primarne grane se mogu ponovo granati u sekundarne grane koje su većinom u paru i blizu glavne osi, što kod primarnih grana nije slučaj. Sve primarne i sekundarne grane se granaju blizu kuta ili pod kutom od 90° s obzirom na glavnu os.

Konidije (Slika 4.) su elipsoidnog oblika, dimenzija 3-5x2-4 µm. Mogu imati glatke stijenke ili mogu biti lagano ornamentirane. Boja konidija varira od bijele, smeđe, rjeđe sive i najčešće zelene nijanse (Mukerjee i sur., 2012). Konidije cijeloj koloniji daju pigmentaciju te sadrže razne antibiotke tvari. Proizvodnja konidija inducirana je brojnim faktorima kao što su stres, temperatura, dostupna hraniva u mediju, nedostatak vlage ili dodatak glutamata u medij (Anderson i Smith, 1971; Jin i sur., 1996; Lapaire i Dunkle, 2003; Mukherjee i sur., 2012).



Slika 3. Kultura *Trichoderma harzianum* na PDA supstratu

Izvor: (<https://www.google.hr/search?q=trichoderma+harzianum&tbm=isch&imgil=pp8gcVngSvaU-M%253A%253Bhttps%253A%252F%252F#imgrc=FS4CcUL-zTuZmM-> 18.07.2020.)



Slika 4. Konidije vrste *Trichoderma harzianum*

Izvor: (https://www.google.hr/search?q=trichoderma+harzianum&tbm=isch&imgil=pp8gcVngSvaU-M%253A%253Bhttps%253A%252F%252F#imgrc=vSbQJuTXg_8LKM- 13.06.2020.)

4.2. Teleomorfni stadij *Hypocrea lixii* Pat

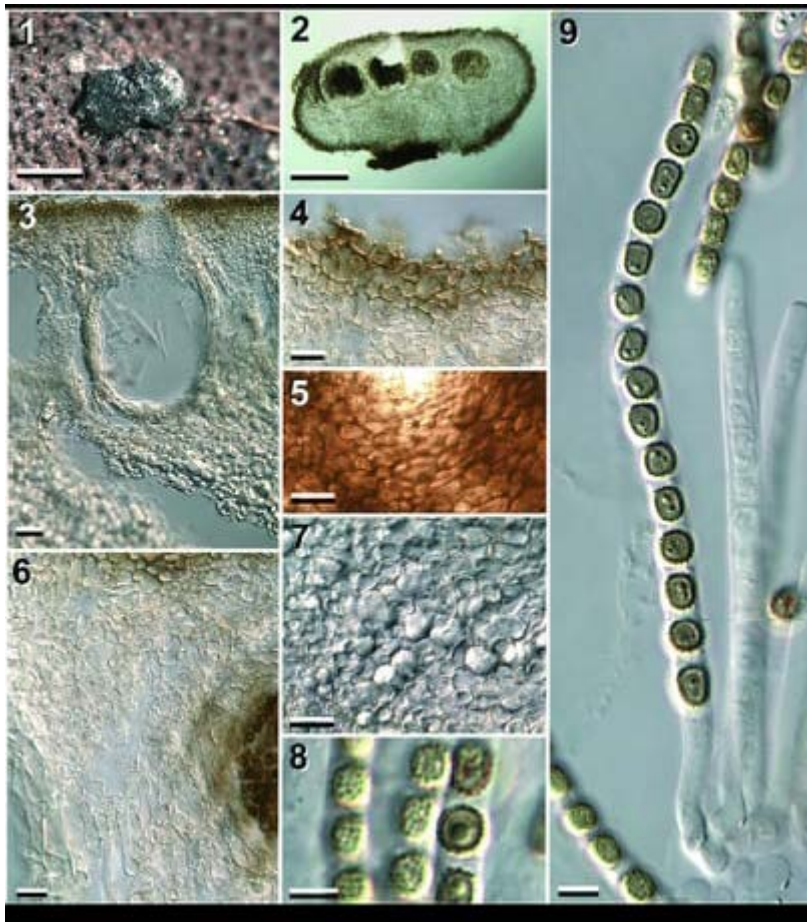
Teleomorf vrste *Trichodema harzinaumje* determiniran i pripada vrsti *Hypocrea lixii*. Zabilježen je i sinonim *Trichoderma lixii* (Pat.). Teleomorf je prvi puta opisan 1891. godine, a poticao je od kulture izolirane sa basidioma gljive *Ganoderma*, koji je najvjerojatnije parazitirala sa lokacije Papua New Guinea (Patouillard, 1891.)

Stroma može biti samostalna ili se javljati u skupini od nekoliko njih, gotovo kružnog izgleda, promjera (0,3)1,0-1,1(3,0) μm visine (440)730-785(1400) μm (Chaverii i sur., 2002). Površina joj je glatka te ponekad mogu biti vidljiva lagana peritecijalna izbočenja tamnosmeđe ili zelene boje. Boja se može promijeniti iz tamno zelene u smeđu prilikom stavljanja u otopinu kalijevog hidroksida (KOH^-). Otvori često uopće nisu vidljivi upravo zbog tamne boje strome. Površina strome debljine je od 17-20 μm te je formirana od uglatih stanica. Stanice su zbijene, pigmentirane smeđe (KOH^-) ili tamno zelene (KOH^+), „uglate stranice promjera (2.0)7.0–7.5 (22.0) μm , stijenki debljine (0.2)0.5–0.6(1.0) μm . Tkivo neposredno ispod stromatalne površine kompaktne je do labave teksture. Bezbojno je ili blago pigmentirano, promjera (2.0)7.0-7.5(22.0) μm i debljine (0.2)0.5-0.6(1.0) μm .

Unutarnje tkivo ispod peritecija formirano je od uglatih stanica, također je bezbojno te mu promjer iznosi (5.0)13-14(31) μm i debljine (0.4)0.7-0.8(1.5) μm .

Spolno plodno tijelo, peritecij u potpunosti je uronjeno u stromu, većinom uskih dimenzija i visine (153)231-244(336) μm . Prekriven je himenijumom, okruglasog je oblika te na vrhu ima otvor (ostiola) kroz koju izlaze spore. Ostiolarni kanal, dugačak (44)63-68(101) μm , može biti prekriven dlakavim strukturama koje se zovu perifize.

Na askgenom miceliju nastaju askusi s askosporama. Askusi se razvijaju u unutrašnjosti peritecija, cilindričnog su oblika, (44)73-78(138)x(3.0)4.5-4.7(6.5) μm , te se u njima nalaze askospore. Askospore su zelenkaste boje, distalni dio im je okrugli (3.0)4.3-4.4(5.6)x(2.8)3.9-4.0(5.2) μm , a proksimalni dio klinastog do cilindričnog oblika (3.4)4.5-4.6(6.5) μm (Chaverii i sur., 2002). Kada su askospore fiziološki zrele, opna askusa upija vodu iz okolne sredine. Uslijed toga, na pojedinim mjestima dolazi do razgradnje opne koja se pretvara u želatinoznu masu. Tako na askusu nastaju otvori kroz koje izlazi sadržaj askusa zajedno s askosporama.



Slika 5. (1-9). *Hypocrea lixii*. Slika 1. Stroma. Slika 2. Odjeljak strome. Slika 3. Peritecij. Slika 4. Vanjsko tkivo strome. Slika 5. Pogled odozgo na površinu strome. Slika 6. Tkivo neposredno ispod stromatalne površine. Slika 7. Unutarnje tkivo ispod peritecija. Slika 8. Askus i askospore. Slika 9. Askospore.

Izvor:(Chaverii i sur., 2002)

5. Primjena *Trichoderma harzianum* u poljoprivredi

Bio-fungicidi na osnovu *Trichoderma* vrsti dominantni su na svjetskom tržištu s udjelom od 60% i danas broje oko 250 bio-pripravaka. Danas samo bio-pripravci na osnovu vrsta *T.harzianum* čine 83 % svjetske proizvodnje od čega je 55% njih kombinirano s *T.viride*, a 28% s *T.konigii*. Najčešće su to formulacije za aplikaciju u tlo, a koriste se u proizvodnji 87 kultura te protiv 70 tzv. Soil-borne i 18 foliar-borne ugovnom gljivičnih.

Prvi *Trichoderma* biofungicid komercijaliziran širom svijeta bio je Trichodex proizveden od strane Makhteshim Agan Industries (Beersheba, Izrael). Trichodex se temelji na *Trichoderma harzianum* izolatu T-39 (Slika 6.) koji se koristi kao kontaktni antibiotski fungicid s enzimatskim djelovanjem protiv *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi i jagodama (Topolovec-Pintarić, 2019). Za vrijeme cvatnje ovim pripravkom tretira se vinova loza u koncentraciji od 0,3-0,4%. Tijekom sezone potrebno je obaviti 4 prskanja. Pripravak Trichodex je u kontroli sive plijesni u vinogradima primjenjen u više od 130 pokusa na 34 različite sorte pod različitim komercijalnim uvjetima. Karenca za grožđe je 2 tjedna i to se odnosi na suzbijanje patogene gljive *Botyitis cinerea*. U Hrvatskoj su mikroplati s Trichodexom rađeni od 1999. godine u vinogradima poznatog vinogradarskog područja Kutjevo, gdje je *B.cinerea* nanosila štetu od 50-60%. Pripravak Trichodex je pokazao djelotvornost u intervalu od 13 do 55%, ovisno o vremenskim uvjetima u godini, što je bilo zadovoljavajuća kontrola te je ponekad bio jednako učinkovit kao sintetički fungicid Kidan na osnovu iprodiona (Topolovec-Pintarić, 2019).



Slika 6. Pripravak Trichodex WP

Izvor: (<https://www.trichodex.com/en/products/bioestimulants/>- posjećeno 22.06.2020)

Još jedan najpoznatiji i koristan pripravak *T.harzianum* soja bio je T-22 (Poznat kao 1295-22, KRL-AG₂ i ATCC 20847). Proizveo ga je dr. Harman 1980-ih godina i licenciran je od Sveučilišta Cornell od strane Eastman Kodak Company koja je razvila paket toksičnosti i učinila registraciju mogućom. Oko 1990., Kodak je odlučio napustiti tržište poljoprivrednih pesticida i darovao registraciju T-22 i druge podatke koje su generirali dr. Harman i njegovi kolege u Cornell Research Foundation, koji je osnovao tvrtku Bio Works Inc. Oni su enkapsulirali T-22 u komercijalnim proizvodima RootShield i T-22 Planter Box. Prodaja tih proizvoda započela je 1993., a 1998., prodaja se povećala za 20% godišnje. Soj T-22 općenito je bio inhibitor rasta biljaka kao i mikofungicid protiv biljnih patogena koji se nalaze u tlu. U biljkama, soj T-22 pojačava izražavanja proteina uključenih u fotosintezu i nakupljanje škroba.

Sojevi koji su bili osigurani su *T.harzianum* T-95 i T-12 jer je prvi bio rizosferni kompetentni mutant proizveden od soja izoliranog iz *Rhizoctonia*-supresivnog kolumbijskog tla, a drugi je bio sposobniji za kompeticiju s bakterijama u uvjetima koji ograničavaju željezo.

RootShield se temelji na dvije *Trichoderma* vrste i sadrži soj *T.virens* G-41 zajedno sa sojem *T.harzianum* T-22. Komercijalni naziv proizvoda je RootShield PLUS te ga se primjenjuje na biljke bez bolesti koje su prethodno bile tretirane fungicidom jer sojevi T-22 i G-41 agresivno rastu izvan korijena i ne ulaze u biljno tkivo (Topolovec-Pintarić, 2019).

Pripravak PlantShield (Slika 7.) temelji se na *T.harzianum* soju T-22. Koristi se za suzbijanje gljivičnih bolesti kao što su *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* i *Pythium*. U Virginiji na kulturama kao što su kupusnjače, rajčica, krastavci i u rasadnicima drvenstih biljaka. Također se može koristiti za suzbijanje korijesnke nematode *Meloidogyne incognita*.



Slika 7. Pripravak Plantshied

Izvor: (<https://www.bioworksinc.com/plantshield-hc/> -posjećeno27.07.2020.)

RootShield je organski biološki fungicid koji se temelji na *Trichoderma harzianum* izolatu T-22. Sprječava široki spektar korjenskih bolesti. Oslobađa enzime koji otapaju stanične stijenke mnogih gljivičnih patogena. Omogućava zdraviji sustav korijena te povećava potencijal mase korijena. Najčešće se upotrebljava u staklenicima, rasadnicima te prilikom tretiranja povrtlarskih kultura. Samo jednim tretiranjem moguće je održati zaštitu i do 12 tjedana (<https://www.bioworksinc.com/rootshield-wp/>- posjećeno 14.7.2020.).



Slika 8. Pripravak RootShield

Izvor: (<https://www.bioworksinc.com/rootshield-wp/>. Posjećeno 14.7.2020.)

RootShield PLUS je organski biološki fungicid s dvostrukim aktivnim sastojcima i temelji se na *Trichoderma harzianum* soju T-22 i *T.virens* soju G-41. Sprječava široki spektar bolesti korijena te svojom aktivnošću potiče na razvoj zdravog korjenovog sustava. Suzbija gljivične patoge, pa često izaziva otpor domaćina. Ima sposobnost brze prilagodbe različitim tipovima tala te se razvija u širokom rasponu pH. Uporabom ovog pripravka poboljšava se unos hraniva u tlo, pomaže biljkama prevladati abiotske stresove i transplatacijski šok i odlično pruža otpor prilikom primjene fungicida. Primjenjuje se aplikacijom izravno na sjeme ili prilikom presađivanja. Osigurava 3 mjeseca preventivne zaštite za *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Cylindrocladium* i *Thielaviopsis*. RootShield Plus na tržištu je dostupan u granuliranoj formulaciji (<https://www.bioworksinc.com/rootshield-plus-wp/>- posjećeno 15.7.2020.).

Tablica 2. Preparati temeljeni na *T.harzianum* izolatima

IME PREPARATA	IZOLAT	PRIMJENA	DRŽAVA/PROIZVOĐAČ
Trichodex	T-39	<i>Botrytis cinerea</i>	Italija
PlantShield	T-22	<i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> i <i>Pythium</i>	Kalifornija
RootShield	T-22	<i>Pythium</i>	sjeverna Europa, SAD
RootShield Plus	T-22 i G-41	<i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Cylindrocladium</i> i <i>Thielaviopsis</i> .	SAD

Dostupnost i disperzija pripravaka na bazi *Trichoderma* vrsta raširena je te imaju opće poznatu tendenciju širenja zbog lakše registracije. Dopusćeni pripravci za uporabu u ekološkom uzgoju u Europi su: RootShield (sjeverna Europa, SAD), Plant Box (sjeverna Europa, SAD), Bio Trek (sjeverna Europa, SAD), Binap (Švicarska, Švedska, Velika Britanija, SAD), Supersivit (Češka), Trichodex (Italija), Trifender (Mađarska) i Trianum (Avantagro, Španjolska). Formulacije *Trichoderme* se ne temelje na jedinsvenoj kulturi jedne vrste već dolaze kao mješavina dvije ili tri vrste ili kao različiti sojevi iste vrste (Toplovec-Pintarić, 2019).

Pripravke koji se temelje na sojevima *T.harzianum* najučinkovitije je aplicirati na samo sjeme. To je jednostavna i efikasna metoda prilikom koje se sjeme tretira praškastom formulacijom na osnovu hifa i spora *T. harzianum* netom prije sjetve (Šimanović, 2018). Djeluje na način da konidije *T. harzianum* kliju na površini sjemena, a nastali micelij će kolonizirati korjenčić po njegovu nastanku te okolni supstrat. Biološka metoda premazivanja sjemena pokazala se uspješnom na rajčici, soji i slanutku. Ova metoda ima potencijalne prednosti u odnosu na obično tretiranje sjemena, upravo zbog toga što rezultira bržim i ujednačenijim pojavljivanjem sadnica. Konidije gljive kliju na površini sjemena i formiraju zaštitni sloj na tretiranom sjemenu, te ovakvo sjeme puno bolje podnosi nepovoljne uvjete. Osim tretiranja samog sjemena efikasnim se pokazalo i tretiranje korijena. Korijenje sadnica tretira se kratkim umakanjem u suspenziju spora gljive ili se ona može dodati u sustav navodnjavanja u uzgoju u zaštićenim prostorima te hidroponskom uzgoju. Ova metoda najčešće se koristi kod povrtnih kultura i kod riže na kojoj je obavljen pokus (Šimanović, 2018).

Vrste roda *Trichoderma* od iznimne su važnosti u poljoprivredi, pa tako i navedena vrsta *Trichoderma harzianum*. Zbog brojnih benefita koje posjeduje vrsta *T.harzianum*, pa i njezini

produkti, današnju poljoprivrednu proizvodnju nemoguće je zamisliti bez nje. Neke od prednosti ove gljive su to da izlučuje enzime inhibitornog djelovanja na patogene, povećava otpornost biljke prilikom pojave bolesti te u konačnici pomaže u ponovnom uspostavljanju ravnoteže u tlu koja je narušena prilikom unošenja velikih količina kemijskih sredstava u tlo. Također, gljiva ima mogućnost promicanja rasta biljke, povećanja visine, povećanja lisne mase te mase suhe tvari. Gljiva najbolje raste i prolifera u prisutnosti zdravog korijena. Saharoza koja curi iz korijena potiče rast micelija gljive i dovodi do interakcije s biljkom. Kako bi se biljka potaknula na davanje veće količine saharoze, *Trichoderma* razvija brojne mehanizme za usmjeravanje. Povećanjem metabolizma saharoze, dolazi do pojačanog intenziteta fotosinteze i disanja jer rast biljaka potaknut *Trichoderma* vrsta zahtjeva energiju. Naravno, što je bolja fotosinteza to će se više saharoze prenositi do korijena i metabolički krug se nastavlja. Sa svojim enzimom (arsenal), poboljšava topljivost hranjivih tvari u tlu. Gljiva također poboljšava unos hranjivih tvari te omogućava bolju ishranu bilja koja će kasnije rezultirati povećanje prinosa. Vrsta *T.harzianum* znatno povećava toleranciju deficita vode i smanjuje učinke na fotosintetske sustave čak i kad su biljke u stalnoj točki uvenuća ili se tome približavaju (Topolovec-Pintarić, 2019).

Danas se pozitivan učinak gljive na rast biljaka smatra neovisnom sposobnosti te ima jednako vrijedan značaj kao i njezina antimikotična sposobnost jer je povećanje rasta uočeno u nedostatku bilo koje bolesti i u sterilnom tlu. Nova genetska istraživanja pokazala su da je aktivnost *Trichoderma* vrsta, kroz njihove sposobnosti stvaranja mehanizma za obranu biljaka. Tako se, na primjer, antibioza *T.virens* protiv *Rhizoctonia* solani na sadnicama pamuka i mikoparazitizam *T.harzianum* protiv *Pythium* utvrđuje kao posljedica isključivo izazavanog otpora.

Sposobnost gljive je prodiranje u koru korijena, epidermu i nekoliko slojeva stanica ispod ove razine, na temelju dokaza s *Trichoderma* mutata sojevima koji proizvode zelene fluorescentne proteine. Nakon prodora u korjensko tkivo, gljiva uspostavlja odnos s biljkom i komunicira na molekularnoj razini. Unutar korjenskih stanica može izmijeniti gensku ekspresiju biljke kako bi aktivirala svoj imunološki sustav. Te posljedice u početku rezultiraju indukcijom mehanizama otpornosti, pa biljka formira zadebljane stanične stijenke i iziva taloženje fenola koji presretnu gljivu na području infekcije i spriječe daljnu kolonizaciju biljaka (Topolovec-Pintarić, 2019).

Aktivnost *Trichoderma* vrsta protiv fitopatogenih gljiva i nematoda, kao i kompeticija za hraniva, provode se proizvodnjom izvančelijskih hidrolitičkih enzima i/ili proizvodnjom sekundarnih metabolita s antimikotičnom aktivnošću. Postulirano je da gljiva ima sposobnost djelovati kao kolonizator tla, ostvariti pseudomikorizalni odnos s biljkom domaćinom s dobrobiti za zdravlje i kondiciju biljke. Mikoparazit i nematofag treba osigurati *Trichoderma* genom. Koevolucija genoma dokazana je u mnogim biljno-patogenim interakcijama. Vrsta snažne genetske komponente na odgovore kukuruza na *T.harzianum* T-22 potvrđeni su u ispitivanjima s nizom INBRED linija kojima je predhodilo veliko ispitivanje provedeno u SAD kukuruznom pojasu sa 160 hibrida kukuruza i T-22. Danas je poznato nekoliko stotina

odvojenih biljnih gena ili proteina čiji izraz mijena kolonizacija korijena, iako su posljedice izraženije na izbojcima nego na korijenu (Topolovec-Pintarić, 2019).

Osim što su *Trichoderma* vrste zaslužne za suzbijanje patogena one su poznate po stimulaciji rasta same biljke i korjenovog dijela te povećavaju otpornost biljke (Harman, 2004). Nakon samo nekoliko mjeseci tretiranja sa *T. harzianum* u pripravku T-22 korijen biljke je bio gotovo duplo veći u odnosu na one koje nisu bile tretirane (Harman, 2004). U drugom istraživanju dokazalo se da sekundarni metaboliti koje proizvodi *T.harzianum* (6-pentil-alfa piron, skraćeno 6-PP) djeluje kao regulator rasta biljke (Cutler i sur., 1986).

Ovaj enzim je zaslužan za karakterističnu kokos aromu *T. harzianum* te je osim toga što služi kao inhibitor rasta odgovoran i za antifungalna svojstva. Sekundarni metabolit (6-PP) ima karakteristike hlapivih organskih komponenti (Volatile Organic Compounds-VOCs). Biosinteza VOCs-a ovisi o uvjetima u kojima biljka obitava, tu se prije svega misli na dostupnost hraniva, pH supstrata, svijetlost i temperaturu.

6. Zaključak

Danas u zaštiti bilja dominiraju kemijske mjere zaštite, odnosno primjena pesticida. Činjenica je da kemijska sredstva zagađuju okoliš, te imaju štetan utjecaj kako na čovjeka tako i na cijeli biljni i životinjski svijet. Svi ti razlozi usmjeravaju ka razvoju bezopasnih i novih strategija u zaštiti bilja, odnosno korištenje bioloških preparata. Biološki preparati su alternativa kemijskim sintetičkim spojevima i podrazumjevaju primjenu korisnih mikroorganizama ili produkata njihovog metabolizma.

Biološki preparati nisu kompletna zamjena za kemijska sredstva, ali predstavljaju značajnu dopunu i unapređenje cjelokupne zaštite bilja. Zbog svojih prednosti i kvaliteta, u budućnosti, će svakako dobiti svoje zasluženo mjesto u zaštiti bilja od štetočinja. Komercijalni proizvodi biofungicida na bazi *Trichoderme* čini oko 60% tržišta, te su dostupnost i disperzija preparata na bazi *Trichoderme* rašireniji od ostalih zbog lakše registracije.

Vrste roda *Trichoderma*, pa tako i *T.harzianum* okarakterizirane su kao vrlo kvalitetne te predstavljaju potencijal za sve češće korištenje u zaštiti poljoprivrednih kultura te kao zamjena za brojna kemijska sredstva. Veliku prednost pred kemijskim sredstvima imaju upravo zato jer su bezopasne za čovjeka i okoliš te svojim djelovanjem mogu smanjiti djelovanje drugih čimbenika na biljku. Također, velika prednost je to što nakon apliciranja imaju sposobnost brze kolonizacije.

Vrste roda *Trichoderma* izuzetno su korisne u zaštiti usjeva od bolesti, jer imaju sposobnost mjenjanja genetskog materijala tako da biljka postaje otpornija. Gljivice djeluju kao promotori rasta uz pomoć 6-PAP-a. Sekundarni metaboliti *Trichoderma* spp. imaju brojne prednosti kao što su izuzetna efikasnost u kontroli korova, stvaranje inducirane otpornosti biljke na određenog patogena, pa čak imaju mogućnost izmjene genetskog materijala. Stvaranjem enzima *Trichoderma* spp. efikasne su u razgradnji stanične stijenke štetnika koji napada biljku što dovodi do ugibanja štetnika.

Postoje različiti načini borbe ove gljivice za hranjive tvari kako bi osigurala biljci što veću količinu te se zbog toga smara kako je ova gljivica zapravo neizostavna u uzgoju bilo koje kulture. Zbog velikog niza prednosti i sposobnosti nje same, sve više poljoprivrednika koji prelaze sa konvencionalnog na integrirani način uzgoja uporebljava bas vrste roda *Trichoderma*.

7. Popis literature

1. Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J. (2011). Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications
2. Bell A., FAVIER JEAN-CLAUDE. (1982). Influence des transformations technologiques traditionnelles sur la valeur nutritive des ignames (DISCOREA s.s.p.) du Cameroun. *Revue Science et Technique. Série Sciences de la Santé*, (1-2), 135-150. ISSN 0253-746X
3. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C., (2004). Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249 – 260.
4. Bissett J. (1990). A revision of the genus *Trichoderma*, Intrageneric classification *Canadian Journal of botany*. 69: 2357 – 2372.
5. Chaverii P., Samuels G. J. (2002). *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. Article in *Mycological Progress*. August 2002.
6. Chet I., Viterbo A., Brotman Y., Lousky T. (2006). Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*.
7. Cutler G., Cox H., Crumley G., Cole D. (1986). 6-Pentyl- α -pyrone from *Trichoderma harzianum*: Its Plant Growth Inhibitory and Antimicrobial Properties. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (11), 2943-2945.
8. Čačić, B. (2017). Korištenje benefitne gljive *Trichoderma* spp. U biološkoj zaštiti poljoprivrednih kultura. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
9. Dennis C., Webster J., (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*: 51-58.
10. Diáñez, F., Santos, M., Tello, J. C., (2005). Suppression of Soilborne Pathogens by Compost: Suppressive Effects of Grape Marc Compost on Phytopathogenic Oomycetes, *Acta Horticulturae*, 697: 441 – 460.
11. Elad, Y., Chet, I., Katan, J. (1980.): *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70:119-121.
12. Freeman, G., Freeman, R. (2004): Gérer les difficultés de contact : une approche axée sur l'enfant. *Journal du droit des jeunes* 2004/7 (N° 237), pages 18-30

13. Grahovac M., Inđić M., Lazić S., i Vuković S. (2009). Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine.
14. Harman G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease* 84:377-393.
15. Harman G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* spp.- opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Microbiol. Rev.* 2:43-56
16. Howell C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 2003;87:4-10.
17. <https://www.mycobank.org/BioMICSDetails.aspx?Rec=27600>- posjećeno 31.08.2020.
18. Igrc Barčić J., Maceljski M. (2001). Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika. Zrinski, Čakovec.
19. Imitaj, A., Im, K.H., Lee, M.W., Lee, G.W., Jayasinghe, C., Hur, H. (2008): Degradation of Three Aromatic Dyes by White Rot Fungi and the Production of Ligninolytic Enzymes. Pages 114-120.
20. Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., Bhat, M. A., (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1: 39 – 57.
21. Kubicek C.P., Harman G.E. (2002). *Trichoderma* & *Gliocladium*, Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis e-Library, London.
22. Kumar J., Pundhir V. S. (2009). Recent advances in biological control of plant diseases. Centre of advanced studies in plant pathology, . Posjećeno: 25.lipnja 2020.
23. Martinko K. (2015). Interakcija *Trichoderma viride* i *Fusarium solani* u prisutnosti Raxil TM GEL 206, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
24. Miličević, T. i Kaliterna, J. (2014). Biološko suzbijanje bolesti kao dio integrirane zaštite bilja. *Glasilo biljne zaštite*, 14 (5), 410 – 415. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/169296>. Posjećeno [1.srpnja 2020.](https://hrcak.srce.hr/169296)
25. Mukherjee A. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Schmoll M. (2012). *Trichoderma*: Biology and Applications, . Posjećeno: 6. Srpnja 2020.

26. Papavizas G., C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 23 – 54.
27. Peroon CH. (1974). *Disposita methodica fungorum*
28. PATOUILARD N (1891) Recueil trimestriel illustré, consacré à l'étude des champignons et des lichens. – *Revue Mycologique.* (Toulouse) 13: 138
29. Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers.* 116:1-56.
30. Sivan A., Chet I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiologi* 135 (3), 675-682.
31. Sharma, R. (2012). A brief review on mechanism of *Trichoderma* fungus use as biological control agents. *International Journal of Inovations and BioSciences*, 2: 200 – 210.
32. Skendžić, S. (2018). Antagonizam i antibioza *Trichoderma longibrachiatum* na *Fusarium solani* i *Alternaria solani*. Diplomski rad, Agronomski fakultet, Zgreb.
33. Szilvinyi, A. von. "Trichoderma nunbergii n. sp." *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskrankh. Hyg., Abt 2.* 86 (1932): 135-139.
34. Tochinal & Shimada. 1930.) *Sporotrichum narcissi* *Trans. Sapporo nat. Hist. Soc.:* 124
35. Tomljanović, A. (2015). Testiranje antagonizma *Trichoderma harzianum* naspram fitopatogene vrste *Sclerotinia sclerotiorum*. Završni rad, Agronomski fakultet, Zagreb.
36. Topolovec-Pintarić S., Cvjetković B., Miličević T. (2004). Biofungicidi temeljeni na *Trichoderma* vrstama / *Glasilo biljne zaštite*, 4;239 – 241.
37. Topolovec-Pintarić S., Sušinjak I. (2005). Prva iskustva primjene pripravaka na osnovu *Trichoderma harzianum* proizvedenog na Zavodu za fitopatologiju. *Glasilo biljne zaštite* br. 6, 368-370.
38. Topolovec-Pintarić S. (2010). Influence of *Trichoderma harzianum* Rifai on the fiber flax germination and growth. 421-424.
39. Topolovec-Pintarić S. *Biološko suzbijanje*. Interna skripta, Merlin.
40. Topolovec-Pintarić S. (2019). *Trichoderma: Invisible Partner for Visible Impact in Agriculture*. U: *Trichoderma: The most widely used Fungicide.* (ur. Shah M.M. Sharif U., Buhari T.R.). IntechOpen, London. 15-35. Posjećeno 19. lipanj 2020.
41. Whipps, J. M., (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487 – 511.

42. Živković S. (2016). Biološka kontrola skladišnih fitopatogenih gljiva. XXI savetovanje o biotehnologiji. Zbornik radova, Vol. 21.(23)

Popis slika:

Slika 1.

Upotreba roda *Trichoderma* u biološkom suzbijanju

Izvor: (https://www.researchgate.net/figure/Model-for-Trichoderma-induced-resistance-TISR-against-Botrytis-cinerea-in-tomato-Root_fig5_242334471- posjećeno 28.6.2020.)

Slika 2.

Prikaz mikoparazitizma *Trichoderma* sp.

Izvor: (http://healthyhay.vt.tuwien.ac.at/division/project.php?project_id=6- posjećeno 22.6.2020.)

Slika 3.

Kultura *Trichoderma harzianum* na PDA supstratu

Izvor: (<https://www.google.hr/search?q=trichoderma+harzianum&tbm=isch&imgil=pp8gcVngSvaU-M%253A%253Bhttps%253A%252F%252F#imgrc=FS4CcUL-zTuZmM>). Pristupljeno 18.7.2020.

Slika 4.

Konidije vrste *Trichoderma harzianum*

Izvor: (https://www.google.hr/search?q=trichoderma+harzianum&tbm=isch&imgil=pp8gcVngSvaU-M%253A%253Bhttps%253A%252F%252F#imgrc=vSbQJuTXg_8LKM). Pristupljeno 13.06.2020.

Slika 5.

Hypocrea lixii

Izvor: Chaverii P., Samuels G. J. (2002). *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. Article in Mycological Progress. August 2002.

Slika 6.

Pripravak Trichodex WP

Izvor: (<https://www.trichodex.com/en/products/bioestimulants/>). Pristupljeno 22.06.2020.

Slika 7.

Pripravak Plantshied

Izvor: (<https://www.bioworksinc.com/plantshield-hc/>). Posjećeno 27.07.2020.

Slika 8.

Pripravak RootShield

Izvor: (<https://www.bioworksinc.com/rootshield-wp/>. Posjećeno 14.7.2020.)

Životopis

Patricija Petrinić rođena je 1. lipnja 1996. godine u Zagrebu. Od 2003.-2011. godine pohađala je Osnovnu školu Ljubo Babić u Jastrebarskom. Osnovnu školu završila je s odličim uspjehom pa je njezin odabir bio pohađati program opće gimnazije. Upisala je Srednju školu Jastrebarsko te ju je pohađala u periodu od 2011.-2015. godine. 2015. godine upisala je Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te je odabrala studij Zaštite bilja. Kroz dugogodišnja školovanja stekla je vještinu poznavanja engleskog i njemačkog jezika na osnovnoj razini. Učenjem engleskog jezika stekla je bolje pismene nego li govorne sposobnosti. Prilikom rada na računalu može izdvojiti poznavanje i dobro snalaženje u Microsoft Office programima. Najbolje se snalazi u Microsoft Office PowerPointu i Microsoft Office Wordu. U slobodno vrijeme volontira. Volonter je u Crvenom križu te sličnim humanitarnim udrugama.