

# Biostimulatori u organskoj proizvodnji voća

---

**Friganović, Tiana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:204:485558>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-15**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



# **BIOSTIMULATORI U ORGANSKOJ PROIZVODNJI VOĆA**

DIPLOMSKI RAD

Tiana Friganović

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

# **BIOSTIMULATORI U ORGANSKOJ PROIZVODNJI VOĆA**

DIPLOMSKI RAD

Tiana Friganović

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Kristina Batelja Lodeta

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Tiana Friganović**, JMBAG 0178116262, rođena 24.11.1996. u Dubrovniku, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

### **BIOSTIMULATORI U ORGANSKOJ PROIZVODNJI VOĆA**

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 studentice **Tiane Friganović**, JMBAG 0178116262, naslova

### BIOSTIMULATORI U ORGANSKOJ PROIZVODNJI VOĆA

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

1. Izv.prof.dr.sc. Kristina Batelja Lodeta mentor
2. doc.dr.sc. Jelena Gadže član
3. izv.prof.dr.sc. Ivana Pajač Živković član

potpisi:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Zahvala

*Hvala roditeljima, sestrama, bratu i cijeloj obitelji na pruženoj podršci tijekom studiranja, a hvala im i na kritikama koje su me promijenile.*

*Zahvaljujem se i mentorici Izv. prof. dr. sc. Kristini Batelji Lodeti na pomoći pri formiranju teme, pristupačnosti i pruženoj slobodi pri pisanju rada.*

*Hvala svim prijateljima, kolegama i profesorima, a posebno hvala mojoj prijateljici Lani, koja mi je studiranje učinila ljepšim, lakšim i zabavnijim.*

## **Sažetak**

Diplomskog rada studentice **Tiane Friganović**, naslova

### **BIOSTIMULATORI U ORGANSKOJ PROIZVODNJI VOĆA**

Nepovoljni okolišni uvjeti i neodržive ljudske aktivnosti sve češći su razlozi velikih gubitaka u voćarskoj proizvodnji. Primjena i istraživanje sigurnih i ekološki prihvatljivih preparata za organsku proizvodnju bilježe porast. Huminske i fulvinske kiseline, hidrolizati proteina, aminokiseline, hitozan, korisni kemijski elementi, ekstrakti morskih algi i mikrobnii biostimulatori dokazano mogu igrati ključnu ulogu u smanjenju ovisnosti o gnojivima, povećanju otpornosti na stres te u povećanju konačnog prinosa i kvalitete plodova. Pozitivno djelovanje biostimulatora uključuje poboljšani rast korijena, unos hranjivih tvari i proizvodnju fitohormona, a potvrđena je i osmotska prilagodba u uvjetima abiotskog stresa. Primjena biostimulatora je ekološki prihvatljiva praksa bez negativnih utjecaja na okoliš, kvalitetu plodova i ukupni prinos te predstavlja potencijal u rješavanju izazova održivosti u organskim nasadima, odnosno potencijal za integraciju u upravljanju modernim organskim voćnjacima.

**Ključne riječi:** biostimulatori, organsko voćarstvo, održiva poljoprivreda

## Summary

Of the master's thesis – student **Tiana Friganović**, entitled

### **BIOSTIMULANTS IN ORGANIC FRUIT PRODUCTION**

Unfavorable environmental conditions and non-sustainable human activities are increasingly common reasons for large losses in fruit production. The use and research of safe and environmentally friendly preparations for organic production is increasing. Humic and fulvic acids, protein hydrolysates, amino acids, chitosan, useful chemical elements, seaweed extracts and microbial biostimulants have proven to play a key role in reducing the dependence on fertilizers, increasing the resistance to stress and increasing the final yield and quality of fruits. The positive effect of biostimulants includes improved root growth, nutrient intake and phytohormone production. Also, osmotic adjustment in conditions of abiotic stress has been confirmed. The use of biostimulants is an ecologically acceptable practice without negative impacts on the environment, fruit quality and overall yield, and represents potential in solving sustainability challenges in organic plantations, i.e. potential for integration in the management of modern organic orchards.

**Keywords:** biostimulants, organic fruit production, sustainable agriculture



## Sadržaj

1.	Uvod .....	1
1.1.	Cilj rada.....	2
2.	Biostimulatori .....	3
2.1.	Složene organske tvari .....	5
2.1.1.	Huminske kiseline .....	5
2.1.2.	Fulvinske kiseline .....	7
2.1.3.	Hidrolizati proteina i aminokiseline .....	8
2.1.4.	Hitozan .....	12
2.2.	Korisni kemijski elementi .....	14
2.3.	Ekstrakt morskih algi .....	16
2.4.	Mikrobni biostimulatori .....	21
2.4.1.	Mikoriza .....	21
2.4.2.	Rizobakterije .....	26
3.	Primjena biostimulatora.....	29
3.1.	Folijarna primjena .....	29
3.2.	Primjena u tlo .....	31
4.	Mogućnosti i učinci primjene biostimulatora u uzgoju pojedinih voćnih vrsta .....	36
4.1.	Jabuke.....	36
4.2.	Masline .....	39
4.3.	Jagode.....	40
4.4.	Agrumi .....	42

4.5.	Koštičavo voće .....	44
4.6.	Grožđe .....	47
5.	Pregled komercijalnih biostimulatora za primjenu u voćarstvu .....	50
6.	Pravni okvir biostimulatora .....	55
7.	Zaključak .....	57
8.	Popis literature .....	58
	Životopis .....	67

## 1. Uvod

Organska poljoprivreda, koja podrazumijeva i organsko voćarstvo, je sustav poljoprivredne proizvodnje koji točno propisanim poljoprivrednim aktivnostima teži ostvariti samoodrživi agroekosustav koji je ekološki prihvatljiv, društveno pravedan i ekonomski isplativ. Uređena je pravilima kojima je cilj održati ili poboljšati plodnost tla, zdravlje životinja i biljaka te minimalno utjecati na okoliš. Prepoznatljivost navedenog sustava proizvodnje čine i propisi koji ograničavaju upotrebu mineralnih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja, što je razlog zašto poljoprivrednici pronalaze nova alternativna rješenja i inovacije, u svrhu ekološki prihvatljivog optimiziranja proizvodnje. U Europi, organsko voćarstvo zauzima 1,9 milijuna ha, a u Europskoj Uniji više od 1,7 milijuna ha. Najznačajniji su organski trajni nasadi maslina, vinove loze i orašastih plodova, a u periodu od 2011. do 2020. najveći rast zabilježen je kod agruma, tropskog i subtropskog voća (Willer i sur. 2022.). U Hrvatskoj, nasadi pod organskom proizvodnjom čine 12.000 ha (Ministarstvo poljoprivrede 2020). Navedeni podaci upućuju na to da površine pod organskim trajnim nasadima, u usporedbi sa prošlogodišnjim podacima, bilježe porast te da je osim proizvodnje, povećana i potražnja za organski uzgojenim voćem.

S druge strane, uslijed sve češćih nepovoljnih vremenskih uvjeta, koji su posljedica klimatskih promjena i ljudskih aktivnosti, raste i potreba za pronalaskom i primjenom alternativnih poljoprivrednih metoda u organskim voćnjacima. Vremenske nepogode, abiotski i biotski stres glavni su razlozi velikih gubitaka u sektoru voćarstva. Stoga znanstvenici i poljoprivrednici ulažu napore kako bi unaprijedili proizvodnju voća, u skladu sa propisima organske poljoprivrede. Ekološki prihvatljivi i dozvoljeni proizvodi i pripravci jedni su od rješenja za navedeni problem. Biostimulatori, kao takvi proizvodi, predstavljaju sigurne, učinkovite i dostupne proizvode na prirodnoj bazi. Iako postoji više definicija, biostimulatori se mogu jednostavno opisati kao različite tvari prirodnog podrijetla koje povoljno utječu na rast i razvoj biljaka, otpornost na stres te prinos i kvalitetu usjeva (Parađiković i sur. 2019.). Europsko vijeće industrije biostimulatora (EBIC) izvijestilo je kako je u Europi 2012. godine više od 6,2 milijuna hektara tretirano biostimulatorima te da se tržišna vrijednost prodaje biostimulatora u EU za 2012. godinu može procijeniti na 400 - 500 milijuna eura (Traon i sur. 2014.). Također, 2013. godine predviđeno je da će unutar sljedećih pet godina globalno tržište za biostimulatore doseći 2.241 milijuna dolara (Calvo i sur. 2014.). Prema rezultatima ankete koje je provelo Europsko vijeće industrije biostimulatora, tržište biostimulatora u EU raste minimalno 10% godišnje, a kao glavne razloge takvom rastu navode: europske poljoprivredne politike i politike sigurnosti hrane promiču sigurnu upotrebu poljoprivrednih inputa; zahtjeve potrošača za zdravim prehrambenim proizvodima s minimalnim utjecajem na okoliš; visoke i nestabilne cijene gnojiva i optimizacija inputa u poljoprivredi; povezivanje proizvođača biostimulatora sa globalnim

distributerima; razvoj novih inovativnih proizvoda (Traon i sur. 2014.). Primjena biostimulatora je relativno novi alat u organskoj poljoprivredi te se smatra jednom od najboljih metoda brzog i učinkovitog djelovanja pri pojavi abiotskog i biotskog stresa, čime se na ekološki prihvatljiv i siguran način pospješuje rast i otpornost uzgajane kulture.

### **1.1. Cilj rada**

Cilj ovog rada je prikazati sažet pregled literature o porijeklu, mehanizmu djelovanja, primjeni i utjecajima različitih biostimulatora u organskom voćarstvu, sa naglaskom na primjenu kod pojedinih voćnih vrsta.

## 2. Biostimulatori

Biostimulatori su relativno mlada kategorija poljoprivrednih pripravaka i tvari, zbog čega još ne postoji jedinstvena definicija. Također, definicija biljnih biostimulatora je često predmet rasprave, zato što više spojeva organskih ili anorganskih, iz raznih izvora, imaju stimulirajuće djelovanje na biljke (Rodrigues i sur. 2020.). Također, bitno je razumjeti da biostimulatori ne djeluju na isti način kao gnojiva, a niti kao pesticidi ili repelenti. Može se reći da je djelovanje biostimulatora indirektno. Biostimulatori definirani su i standardima Europske Unije: "Biostimulatori nisu ni gnojiva ni pesticidi. Umjesto toga, to je generički izraz za novu klasu proizvodnih resursa prema Uredbi EU o proizvodima gnojiureva (Uredba EU 2019/1009). U budućnosti će formirati nezavisnu grupu proizvoda sa CE oznakom (PFC 6)". Sam naziv biostimulatora također varira od zemlje do zemlje, a neke od definicija biostimulatora su:

- Biostimulator je svaka tvar ili mikroorganizam, koji se aplicira na biljke, sjemenke ili korijen, s namjerom stimulacije prirodnih procesa u biljkama koji pogoduju učinkovitosti korištenja hranjivih tvari i/ili toleranciji na abiotički stres, bez obzira na sadržaj hranjivih tvari i/ili mikroorganizama namijenjenih za tu upotrebu (Traon i sur. 2014.).
- Biostimulatori su tvari koje stimuliraju procese ishrane biljaka neovisno o sadržaju hranjivih tvari, s ciljem poboljšanja jedne ili više od sljedećih karakteristika biljke ili rizosfere biljke: (i) učinkovitost korištenja hranjivih tvari, (ii) tolerancija na abiotički stres, (iii) kvaliteta svojstva, ili (iv) dostupnost ograničenih hranjivih tvari u tlu ili rizosferi (Uredba EU 2019/1009).
- Biljni biostimulatori, ili fitostimulatori različite su netoksične tvari uglavnom prirodnog podrijetla koje pospješuju i potiču životne procese biljaka drugačije od gnojiva ili fitohormona. Njihov utjecaj na biljke nije posljedica njihove izravne sposobnosti regulacije metabolizma i njihovo djelovanje može biti višesmjerno. Ključno je da biostimulatori za razliku od bioregulatora i hormona poboljšavaju metaboličke procese biljaka bez promjene njihovog prirodnog puta (Posmyk i sur. 2016.).
- Formulirani proizvod biološkog podrijetla koji poboljšava biljnu produktivnost kao posljedicu novih ili emergentnih svojstava kompleksnih sastojaka, a ne kao isključivu posljedicu prisutnosti poznate esencijalne biljne hranjive tvari, regulatora rasta ili zaštitnih spojeva biljaka (Yakhin i sur. 2017.).

Biostimulatori se mogu lako zamijeniti sa bioregulatorima, gnojivima ili biopesticidima, ali razlike postoje glede mehanizma djelovanja, porijekla, aktivnih tvari, koncentracije u kojoj se primjenju itd. U tablici 2.1. prikazane su osnovne razlike između biostimulatora i bioregulatora.

Tablica 2.1. Bioregulatori i biostimulatori: usporedba svojstava

	<b>Bioregulatori</b>	<b>Biostimulatori</b>
<b>Djeluje na:</b>	Usjev	Biljke, tlo, mikroorganizmi
<b>Vrste</b>	Auksin, giberelin, citokinin, abscisinska kiselina, salicilna kiselina, etilen, brasinolid itd	Huminska i fulvinska kiselina, ekstrakt morskih algi, hidrolizat proteina, aminokiseline, mikroorganizmi itd.
<b>Porijeklo</b>	Prirodni sekundarni metaboliti ili sintetičke tvari	Prirodni izvori, biološki ekstrakti i njihove mješavine
<b>Aktivna tvar</b>	Nehranjivi elementi; aktivne tvari su poznate	Osiguravaju unos hranjivih elemenata ili organskih tvari koje sudjeluju u kompleksnim biokemijskim reakcijama u biljkama; aktivne tvari nisu u potpunosti poznate
<b>Put djelovanja</b>	Transportira se od mjesta sinteze do mjesta djelovanja u usjevu	Aktivno mjesto apsorpcije, mjesto djelovanja ili transport do svih biljnih organa
<b>Koncentracija</b>	Djeluje pri manjim koncentracijama	Različite koncentracije mogu djelovati
<b>Mehanizam djelovanja</b>	Direktno regulira rast i razvoj biljaka na molekularnoj i staničnoj razini	Direktno regulira biljne životne procese djelujući na više metaboličkih procesa
<b>Efekt</b>	Kao signalna molekula aktivira reakcije unutar i izvan stanice, pokazuju pleiotropiju	Neki od njih mogu aktivirati pojačanje raznih biljnih signala
<b>Glavna funkcija</b>	Poboljšati životne procese biljaka, egzogena uporaba biljnih hormona može promijeniti izvorni signalni put biljaka	Poboljšati biljni rast, razvoj i životne procese bez promjene u biljnim prirodnim procesima
<b>Glavna aktivnost</b>	Regulacija rasta	Ima više funkcija: regulacija rasta, povećanje otpornosti na bolesti i stres itd.

Izvor: Jimmy, J., 2020. [https://www.linkedin.com/pulse/whats-difference-between-plant-growth-regulators-jimmy-ji-?trk=read\\_related\\_article-card\\_title](https://www.linkedin.com/pulse/whats-difference-between-plant-growth-regulators-jimmy-ji-?trk=read_related_article-card_title) – pristup: 01.09.2022.

Prema Europskom vijeću industrije biostimulatora U Europskoj uniji ekonomska vrijednost biostimulansa procjenjuje se na između 200 i 400 milijuna eura (Xu i Geelen 2018.). Također, zabilježeno je povećanje korisnika. Iako su biostimulatori još uvijek “mlada” kategorija poljoprivrednih preparata, brzorastuća ulaganja u istraživanja daju veći uvid u potencijal ovih proizvoda. Studija iz 2014. pokazuje da globalno tržište biostimulatora bilježi rast od oko 20% godišnje. Najveće tržište je Sjeverna Amerika (oko 40% prodaje), dok Europa, Azija i Južna

Amerika predstavljaju 25%, 20% i 10% (Traon i sur. 2014.).

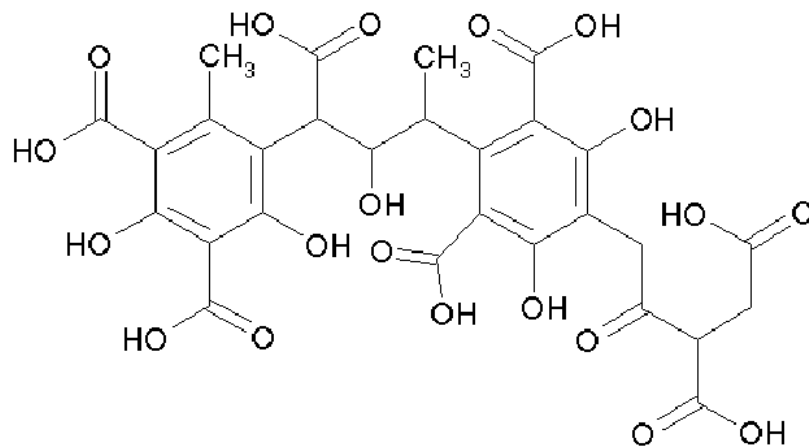
Jedan je od glavnih ciljeva u organskim nasadima je održivo upravljanje plodnošću tla, povećanje otpornosti kultura i ekološki prihvatljivo suzbijanje štetnika i bolesti. U postizanju tih ciljeva u korist ide i primjena biostimulatora kao učinkovite alternativne metode u poljoprivredi. Biostimulatore čine razne tvari organskog i anorganskog porijekla te mikroorganizmi, a **prema porijeklu i sastavu mogu se podijeliti na: humusne tvari i složene organske tvari** (hidrolizati proteina, aminokiseline, huminske i fulvinske kiseline), **korisne kemijske elemente, mikrobnе inokulante** (arbuskularno-vezikularna mikoriza, N-fiksirajuće bakterije) i **ekstrakte morskih algi** (Calvo i sur. 2014).

## 2.1. Složene organske tvari

Humusne ili organske tvari općenito, su tvari nastale procesom raspadanja organskih ostataka, resinteze i humifikacije. Prema tome, razlikuju se dvije grupe humusnih tvari: nespecifične i specifične humusne tvari (Gluhić, 2017). U kategoriju složenih organskih tvari mogu se svrstati sve tvari koje stimuliraju biljni rast, a organskog su porijekla: huminske i fulvinske kiseline, hidrolizati proteina, slobodne aminokiseline, polifenoli i vitamini.

### 2.1.1. Huminske kiseline

Huminska kiselina je kompleks različitih kiselina, odnosno molekula koje sadrže karboksilne i felotane skupine (Stevenson 1982., prema Gluhić 2017.). Huminska kiselina je, dakle, zajednički naziv kiselina prisutnih u humusnoj tvari. Huminske kiseline su, zajedno sa njihovim solima teško topive, ne ispiru se i u tlu se nalaze u obliku "gela", zbog čega se zadržavaju u površinskom, gornjem profilu tla. Huminske kiseline (slika 2.1.1.1.) imaju povoljno djelovanje u tlu - imaju sposobnost kompakcije stabilnih agregata u tlu, sorbiraju i drže vodu, adsorbiraju i izmjenjuju ione, sadrže stimulatore rasta te djeluju kao rezerve biogenih elemenata (Gluhić, 2017.).



Slika 2.1.1.1.: Molekularna struktura huminskih kiselina.

Izvor: Sirbu i sur. 2010. [https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-humic-acids\\_fig1\\_266458005](https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-humic-acids_fig1_266458005)

- pristup: 10.03.2022.

Istraživanja su pokazala da huminske kiseline imaju biostimulacijski učinak koji se očituje u strukturnim i fiziološkim promjenama na korijenu i izbojcima. Promjene se odnose na asimilaciju i distribuciju hranjivih tvari, odnosno na učinkovitost iskorištavanja hranjivih tvari. Također, huminske kiseline, zajedno sa ostalim humusnim tvarima potiču promjene u primarnom i sekundarnom metabolizmu biljaka, koje se odnose na tolerantnost prema abiotskom stresu, kao i povećanje otpornosti uzgajane kulture te pojačanje disanja i aktivnosti invertaze dajući C substrate (Canellas i sur. 2015.).

Huminske kiseline kao biostimulatori imaju široku upotrebu u hortikulturi. Uočeno je višestruko pozitivno djelovanje, koje se prije svega odnosi na poboljšanje mikrobiološke aktivnosti tla, što je od iznimne važnosti za organsku poljoprivrednu proizvodnju. Prema Gluhiću (2017), ostale koristi huminskih kiselina u tlu su:

- povećavaju kapacitet adsorpcije hraniva u tlu
- stabiliziraju pH u tlu (djeluju kao puferi)
- poboljšavaju usvajanje hraniva iz tla u nepovoljnim uvjetima (niska temperatura, nedostatak vode, stres soli)
- potiču pretvorbu netopivih elemenata u topive, biljci pristupačne elemente
- zadržavaju anorganska vodotopiva gnojiva u zoni korijena i smanjuju ispiranje minerala
- potiču rast i razvoj korijena
- služe kao hrana mikroorganizmima
- imaju sposobnost vezanja toksičnih elemenata (npr. Hg, Cd, Pb) u tlu



Huminske kiseline imaju i izravno djelovanje na biljku - spojevi mogu imati različite biokemijske učinke bilo na staničnoj stijenci, membrani ili u citoplazmi, uključujući povećanu sintezu proteina, fotosintezu i brzinu disanja u biljkama (Aghaeifard i sur. 2016.). Prema više istraživanja, pozitivni učinci huminskih kiselina na biljku mogu se pripisati hormonskoj aktivnosti, jer je identificiran niz hormona u humusnoj strukturi - posebno auksina tj. indol-3-octene kiseline (Nardi i sur. 2016.).

Na tržištu postoji veći broj preparata koji sadrže huminske kiseline, često u kombinaciji sa fulvinskim kiselinama ili nekim drugim humusnim tvarima. Preparati koji su u granuliranom obliku su rijetki na tržištu zato što sadrže veću koncentraciju huminskih kiselina, samim time imaju i veću cijenu. Treba napomenuti da je čistoća takvog komercijalnog proizvoda vrlo važna - huminske kiseline dobivaju se ekstrakcijom iz organskog materijala, zbog čega može sadržavati povišenu koncentraciju teških metala. Huminske kiseline kao tekući preparati mogu se prije sadnje aplicirati na sadnice voćka (Gluhić, 2017.). Huminske kiseline mogu se na biljku aplicirati i folijarno, čime se poboljšava fotosintetska aktivnost i sinteza enzima.

Huminske kiseline imaju značajan utjecaj na kemijska, fizikalna i biološka svojstva tla, čime predstavljaju važnost za ekološko voćarstvo. Njihov unos u tlo, bilo prirodnim ili antropogenim putem može rezultirati raznim dobitima u proizvodnji voća.

### 2.1.2. Fulvinske kiseline

Osnovna razlika između fulvinske i huminske kiseline je ta što su sve fulvinske kiseline ujedno i huminske kiseline, dok huminske kiseline nisu fulvinske. Dakle, fulvinska kiselina je vrsta spojeva huminske kiseline, odnosno, to je najaktivniji spoj huminskih kiselina. Isto tako, osnovna razlika je u molekularnoj masi, odnosno huminske kiseline se ne apsorbiraju u biljke, dok se fulvinska kiselina apsorbira, zbog male molekularne veličine. Također, specifične strukturne karakteristike huminskih i fulvinskih kiselina variraju ovisno o izvornom organskom materijalu i vremenu njegove transformacije (Berbara i García, 2014.). Fulvinske kiseline frakcioniraju se i izoliraju iz huminskih kiselina, u skladu sa postupkom koje je predložilo Međunarodno društvo za humusne tvari IHSS (Swift, 1996.).

Fulvinske kiseline na biljke djeluju slično kao i huminske. Ipak, istraživanja su pokazala da fulvinske kiseline imaju veći kapacitet adsorpcije i kationske izmjene od huminskih (Bocanegra i sur. 2006.). Istraživanja su pokazala da fulvinska kiselina primijenjena u obliku otopine ili spreja povećava unos kalija za 95% (Priya i sur. 2014.). Također, mogu ostati u otopini tla čak i pri visokim koncentracijama soli (Calvo i sur. 2014.). Rezultati više istraživanja pokazali su da

fulvinske kiseline poboljšavaju rast više biljnih vrsta, među kojima su istraživane i drvenaste kulture. Najčešća manifestacija poboljšanja rasta očitovala se u rastu korijena. (Calvo i sur. 2014.).

Terensko ispitivanje u Iranu provedeno je posebno kako bi se procijenili učinci fulvinske kiseline, primijenjene u obliku otopine, na kvalitetu voća, posebno antioksidativno djelovanje (Aminifard i sur. 2012.). Iako ukupni prinos nije procijenjen, fulvična kiselina je poboljšala više parametara kvalitete ploda, uključujući ukupne topive krute tvari, antioksidativno djelovanje, ukupne fenole, ugljikohidrate, kapsaicin i karotenoide. Terenska studija stabala limuna (*Citrus limon*) u Španjolskoj, koja je prvenstveno bila osmišljena za procjenu unosa Fe (Sánchez-Sánchez i sur. 2002.), također je izvijestila o učincima na prinos voća. Primjena "humusne tvari" u tlu (za koju je analiza pokazala da sadrži 90,7% fulvinske kiseline), rezultirala je povećanjem mase ploda, ekvatorijalnog promjera ploda, pH soka i sadržaja vitamina C. Komercijalni proizvod fulvinske kiseline smatra se najmanje rizičan i toksičan, a u kombinaciji sa gnojivom omogućuje bolju iskoristivost gnojiva. Uzgajane kulture najbolje je tretirati folijarno, u obliku spreja. Svaki proizvod fulvinske kiseline siguran je za upotrebu u organskom voćarstvu.

Sumirano, uloge fulvinske kiseline kao biostimulatora su sljedeće: poboljšava germinaciju, rast biljke i prinose, poboljšava razvoj korijena, poboljšava otpornost na gljivična oboljenja, povećava unos hraniva, proteinski metabolizam i djelovanje biljnih enzima, povećava sintezu klorofila i respiraciju, pomaže u stvaranju novog sloja humusa u tlu, razbija anorganske supstance u tlu i veže teške metale.

### 2.1.3. Hidrolizati proteina i aminokiseline

Proizvodi na bazi proteina mogu se podijeliti u dvije velike kategorije: proteinski hidrolizati, koji se sastoje od mješavine peptida i aminokiselina životinjskog ili biljnog podrijetla i pojedinačne aminokiseline kao što su glutamat, glutamin, prolin i glicin betain (Calvo i sur. 2014.). Hidrolizati proteina također se ubrajaju u biostimulatore - postoje brojni pripravci za široki spektar upotrebe u poljoprivredi općenito, pa i u organskom voćarstvu. Uglavnom sadrže peptide i slobodne kiseline, a mogu sadržavati i ugljikohidrate, mineralne elemente, fenole, fitohormone i druge organske spojeve (Ertani i sur. 2009.). Prema Parrado i sur. (2008.), glavne aminokiseline u proteinskim hidrolizatima su alanin, arginin, glicin, prolin, glutamat, glutamin, valin i leucin. Također, u hidrolizatima mogu biti prisutne i neproteinske tvari - na primjer hidrolizat ekstrakta klica rogača sadržava masti, ugljikohidrate, makro i mikroelemente te najmanje šest fitohormona, dok je proizvod životinjskog podrijetla "Siapton" imao sličan profil proteina, aminokiselina, masti, makro i mikronutrijente, ali nedostajali su ugljikohidrati i fitohormoni

(Parrado i sur. 2008.). Stoga se može reći da kemijske karakteristike proteinskih hidrolizata variraju ovisno o izvoru proteina.

Hidrolizati se uglavnom proizvode kemijskom (kiselinska i alkalna hidroliza), toplinskom i enzimskom hidrolizom životinjskog otpada i biljne biomase (Colla i sur. 2017.). Životinjski ostaci uključuju životinjska epitelna ili vezivna tkiva kao što su nusproizvodi kože, krvno brašno, riblji nusproizvodi, pileće perje i kazein, dok biomasa biljnog podrijetla uključuje sjemenke mahunarki, sijeno lucerne, mokro mljevenje kukuruza i nusproizvode povrća. Trenutačno, većina tržišta za biostimulanse proteinskih hidrolizata otpada na proteine životinjskog podrijetla dobivene kiselom hidrolizom, dok ostatak dolazi iz enzimske hidrolize bjelančevina biljnog podrijetla (Colla i sur. 2017.).

Proteinski hidrolizati imaju višestruko pozitivno djelovanje na biljke. U komercijalnim proizvodima hidrolizata, sadržaj proteina, peptida i slobodnih aminokiselina varira. Prvi komercijalni proizvod hidrolizata proteina je porijeklom iz životinjskom epitelnog tkiva - razvijen je 1969. u Italiji te je namjenjen za folijarnu primjenu (Calvo i sur. 2014.). Studije o hidrolizatima pokazale su povećanje prinosa i unosa hranjivih tvari: potiču asimilaciju dušika u biljkama kroz koordiniranu regulaciju metabolizma ugljika (Schiavon i sur. 2008.); poboljšavaju klijanje, rast presadnica, rast biljaka, kvalitetu voća i povrća i produktivnost usjeva, posebno u stresnim uvjetima okoliša (Colla i sur. 2017.); poboljšavaju fizikalna, biološka i kemijska svojstva tla, pospješuju proces respiracije, neutraliziraju pH tla. Osim navedenih pozitivnih utjecaja na biljku i svojstva tla, biostimulatori na bazi hidrolizata proteina djeluju kao stimulatori rasta na mikroorganizme tla - izvor su lako dostupnog ugljika i dušika za mikroorganizme, što rezultira povećanjem broja kolonija i aktivnosti mikroba u tlu (Pylak i sur. 2019.). Isto tako, imaju važnu ulogu u stimulaciji rasta korijena, što je dokazano na istraživanju provedenom na jagodama (Pylak i sur. 2019.). Prema istim autorima, proteini su zajedno sa slobodnim aminokiselinama sposobni su djelovati kao signalne molekule, poput hormona. Primjer djelovanja hidrolizata proteina opisan je na proteinima dobivenim iz lucerne (*Medicago sativa*) - uočena je povećana proizvodnja biomase izdanaka, nakupljanje topljivog šećera, povećana aktivnost triju enzima (malat dehidrogenaza, izocitrat dehidrogenaza i citrat sintaza) koji djeluju u ciklusu trikarboksilne kiseline i pet enzima (nitrat reduktaza, nitrit reduktaza, glutamin sintetaza, glutamat sintaza i aspartat aminotransferaza) uključenih u redukciju i asimilaciju dušika, poboljšani rast ispitivanih biljaka uzgajanih u uvjetima stresa soli, povećan omjer Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> u lišću te sinteza flavonoida (Nardi i sur. 2016).

Promatra li se djelovanje specifičnog biostimulatora na bazi životinjskog proteina, prema dostupnim znanstvenim istraživanjima najčešće se izdvaja Pepton. Polo i Mata (2018.) Pepton opisuju kao biostimulator prirodnog porijekla, dostupan u mikrogranuliranom obliku, visoko

topiv u vodi i proizveden korištenjem enzimatske hidrolize životinjskog proteina. Prema istim autorima, Pepton sadrži velike količine L- $\alpha$  aminokiselina (84,83%), slobodnih aminokiselina (16,52%) i sadržaj organskog dušika (12%) s niskim sastavom mineralnog dušika (1,4%), srednjim kalijem (4,45%), i visok sadržaj željeza (4061 ppm). Casadesús i sur. (2019.) Pepton spominju kao enzimatski hidrolizirani biostimulator koji je pokazao pozitivno djelovanje na hormonski profil lišća, ali kao i protein koji pojačava abiotsku obranu u uvjetima vodnog stresa te obrambene fitohormone i antioksidanse. Detaljnije, u uvjetima vodnog stresa Pepton utječe na povećanje endogenog sadržaja indol-3-octene kiseline (auksina), trans-zeatina (citokinina) i jasmonske kiseline. Povećanje ovih fitohormona posljedično su utjecali na povećanje antioksidansa tokokromanola. Osim toga, utvrđeno je da primjena proizvoda na bazi hidrolizata životinjskih membrana, povećava fotokemijsku učinkovitost i integritet stanične membrane u usporedbi s kontrolnim biljkama (Kauffman i sur. 2007.).

Još jedan sve češće istraživani biostimulator životinjskog porijekla je želatina. Želatina se definira kao mješavina peptida i proteina koji se dobivaju djelomičnom hidrolizom kolagena dobivenog iz vezivnog tkiva životinja, što može uključivati kožu i kosti (Američki institut proizvođača želatine, 2012., prema Wilson i sur. 2018.). Želatina sadrži 18 aminokiselina, a oko 50% ukupnih aminokiselina u želatini su glicin, prolin i hidroksoprolin (Wilson i sur. 2018.). Aktualna su istraživanja utjecaja želatine na klijanje sjemena, a prema istim autorima (Wilson i sur. 2018.), ispitivanje želatinskih kapsula na sjeme različitih usjeva pokazalo je poboljšani rast i značajno povećan sadržaj dušika u biljci, što je posljedično utjecalo na veće prinose.

Biostimulatori na bazi proteinskih hidrolizata smatraju se sigurnim za upotrebu u poljoprivredi, uz poštivanje smjernica EU za proizvodnju i izolaciju hidrolizata. U organskoj poljoprivredi se koriste i kao atraktanti.

Druga kategorija biostimulatora na bazi proteina su proizvodi koji sadrže pojedinačne, slobodne aminokiseline. Uključujući gore već spomenute glavne aminokiseline, sveukupno ih ima 20, proteinskih i neproteinskih (koje se nalaze u nekim biljnim vrstama). Prema istraživanju (Calvo i sur. 2014.), postoji više dokaza da egzogena primjena brojnih strukturnih i neproteinskih aminokiselina, uključujući glutamat, histidin, prolin i glicin betain, može pružiti zaštitu od stresa iz okoliša. Prema istom autoru, prolin i betain sa njihovim derivatima povećavaju toleranciju biljaka na abiotski stres, a posebno na stres suše, soli i nepovoljne temperaturne i oksidativne uvjete. Također se pokazalo da nekoliko neproteinskih aminokiselina ima ulogu u obrani biljaka, te da mogu imati signalnu ulogu u reguliranju apsorpcije dušika korijenjem. Ustanovljeno je i da egzogeno primijenjen glutamin ima sposobnost smanjenja dotoka nitrata i amonijaka u korijenu (Kauffman i sur. 2007.). U tablici 2.1.3.1. prikazan je popis fiziološki važnih aminokiselina koje imaju specifične uloge u metabolizmu biljaka.

Tablica 2.1.3.1. Popis važnih aminokiselina za biljni metabolizam

Alanin	Izoleucin
Aspargin	Leucin
Aspartanska kiselina	Lizin
Arginin	Metionin
Cistein	Prolin
Fenilalanin	Serin
Glicin	Treonin
Glutamin	Triosin
Glutaminska kiselina	Triptofan
Histidin	Valin

Izvor: Jardin i sur. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021> - pristup: 20.03.2022.

Sve u tablici navedene aminokiseline imaju različite uloge u biljnom metabolizmu. Tako prolin ima važnu ulogu u abiotskom stresu, odnosno u uvjetima suše i visoke temperature, ali i u fazi cvatnje i oplodnje. Uloga arginina povezuje sa rastom korijena i sintezom hormona rasta - auksina, a alanin i glutaminska kiselina utječu na sintezu klorofila (Jardin i sur. 2015.). Aminokiseline se mogu ekstrahirati iz različitih sirovina: iz materijala životinjskog ili biljnog porijekla, iz metabolita mikroorganizama ili se mogu dobiti sintetskom proizvodnjom (Gluhic 2020.).

Biostimulatore na bazi hidrolizata proteina i aminokiselina preporučljivo je primjeniti kao preventivnu mjeru protiv biotskog i abiotskog stresa, a u slučaju nepredvidljivih stresnih situacija, dobro djeluju i kao kurativno sredstvo protiv posljedica (Gluhic 2020.). Agroklimatski stres uključuje: nedostatak vode ili svjetla, visoku količinu soli, onečišćenost teškim metalima, niske ili visoke temperature, nepovoljnu pH vrijednost tla, visoku koncentraciju hraniva u tlu te zagađenje različitim polutantima. Vegetacijski stres uključuje: sadnju, rezidbu, cvatnju, rast plodova i dozrijevanje plodova, dok ostali izvori stresa mogu biti posljedica oštećenja biljaka nakon tuče, fitotoksičnosti nakon primjene kemijskih sredstava za zaštitu bilja te oštećenja uzrokovana biljnim bolestima, štetnicima ili nematodama (Colla i Roupael 2019., prema Gluhic 2020.).

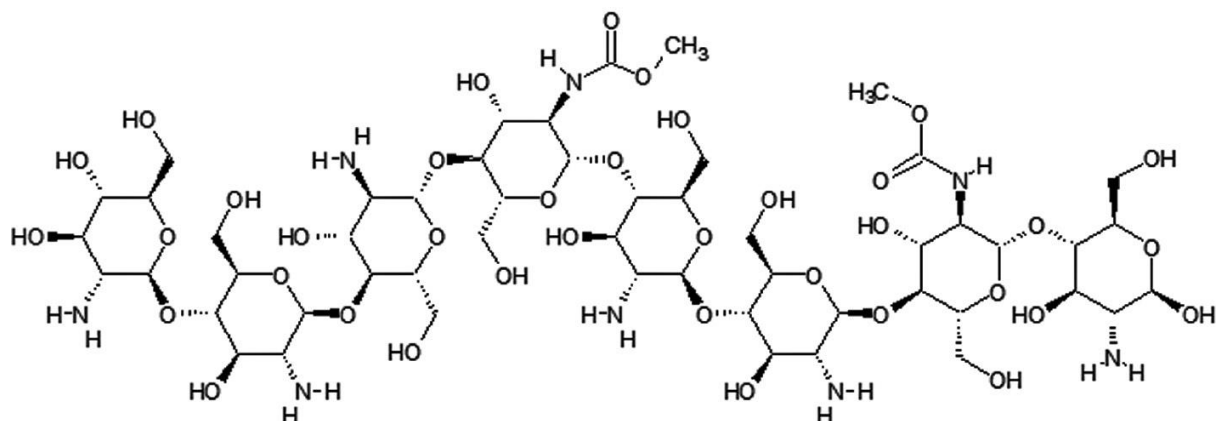
2020.). Kao i kod svakog tretiranja u svrhu smanjenja posljedica stresa na uzgajanu kulturu, doza i način primjene ovisi o vrsti stresa, intenzitetu stresa, oštećenju, razvojnoj fazi biljke, uzgajanoj kulturi i koncentraciji slobodnih aminokiselina u preparatu. Osim svih navedenih čimbenika o kojima ovisi način primjene i doza, bitan faktor kod izbora biostimulatora je poznavati fiziološku ulogu pojedinih aminokiselina. Tako na primjer, imajući na umu da glicin povećava otpornost biljke u uvjetima klimatskog ili abiotskog stresa, potrebno je odabrati biostimulator prema odnosu pojedinih aminokiselina u preparatu, odnosno prema aminogramu, koji prikazuje količinu pojedinih aminokiselina (Gluhić 2020).

Može se zaključiti da su biostimulatori na bazi hidrolizata proteina i slobodnih aminokiselina preparati koji u stresnim uvjetima mogu optimizirati uzgoj voća te se smatraju posebno prikladnim za organsku proizvodnju. Hidrolizati proteina i aminokiseline su često korišteni proizvodi koji su sigurni za okoliš i ljudsko zdravlje te postoji široka ponuda na domaćem i stranom tržištu.

#### 2.1.4. Hitozan

Hitozan je prirodni, biorazgradivi i netoksični spoj čija se biostimulativna svojstva u posljednje vrijeme sve više istražuju. Hitozan je polisaharid koji nastaje razgradnjom hitina, a najčešće se proizvodi od hitinskih elemenata egzoskeleta člankonožaca i drugih morskih ili vodenih organizama (Pylak i sur. 2019.). Drugi izvori hitozana su: gljive (*Mucor rouxii*, *Aspergillus niger*, *Penicillium crysogenum*, *Lactarius vellereus*), kukci i mekušci (Shahrajabian i sur. 2021.). Hitozan ima višestruke prednosti u odnosu na druge biopolimere: siguran je, jeftin i njegova kemijska struktura lako omogućuje uvođenje specifičnih molekula u strukturu polimera za odabrane primjene (Malerba i Cerana 2018.). Zbog ovih karakteristika uloga hitozana je raznolika te primjenu pronalazi u medicini, biotehnologiji, kozmetici, ali i u agronomiji. Posljednjih godina sve više se istražuju učinci spojeva na bazi hitozana na biljke. Hitozan u ulozi biostimulatora se koristi za poticanje rasta biljaka, poboljšanje tolerantnosti na abiotski stres te za induciranje otpornosti na patogene. Ipak, biostimulativno djelovanje hitozana je složeno i ovisi o strukturama i koncentracijama na bazi hitozana, kao i o biljnoj vrsti i razvojnoj fazi (Pichyangkura i Chadchawan 2015.).

Ovaj spoj (slika 2.1.4.1.) ima sposobnost vezanja staničnih komponenti, posebno DNA i stanične stijenke, kao i vezanja specifičnih receptora koji su uključeni u aktivaciju obrambenih gena, u čemu se očituje fiziološko djelovanje na biljke (Jurčić 2019.).



Slika 2.1.4.1.: Molekularna struktura hitozana

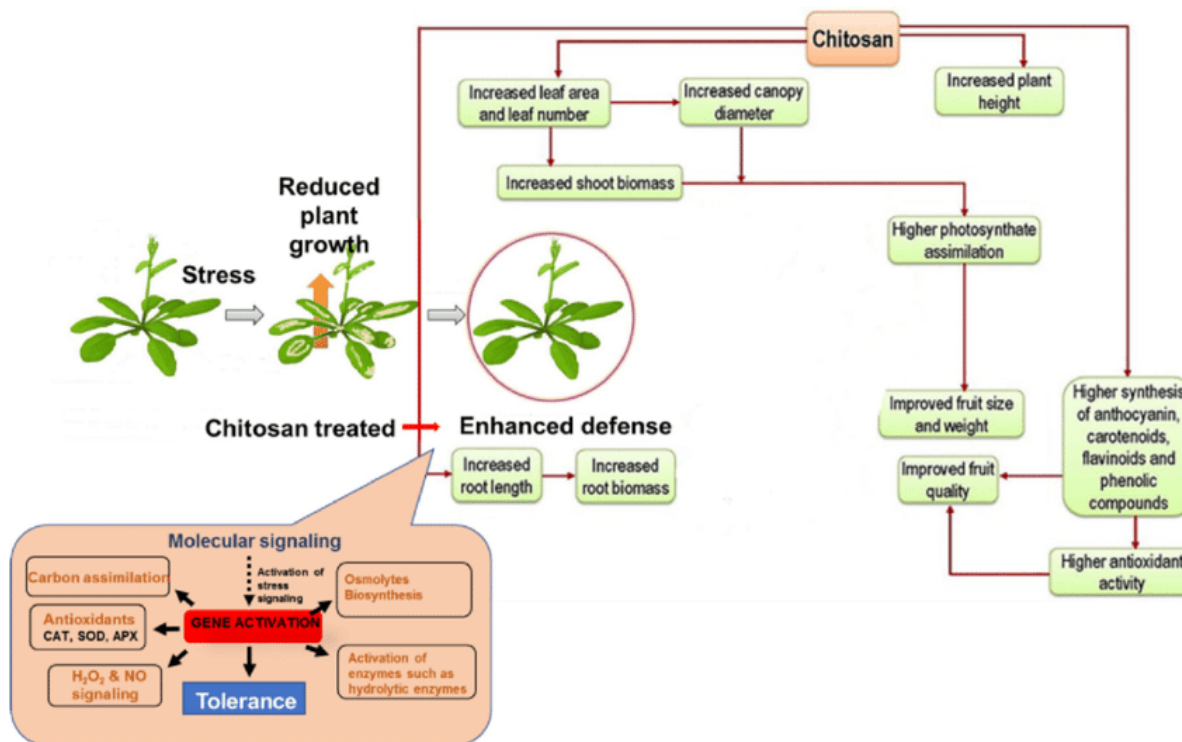
Izvor: Goñi i sur. 2016. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0701> - pristup: 20.03.2022.

Više istraživanja dokazalo je učinkovitost primjene hitozana pri zaštiti biljaka od gljivičnih patogena, što predstavlja potencijal za ekološki prihvatljivo suzbijanje bolesti u organskom voćarstvu. Hitozan inhibira rast patogena, pospješuje proizvodnju fitoaleksina (antimikrobna tvar) u biljkama, što omogućuje tretiranim biljkama da unište stanične stijenke patogena. Isto tako, može vezati vodu kako bi stvorio barijeru za vlagu i tako prolongirao proces starenja, što također smanjuje stopu gljivičnih infekcija. Fungicidno djelovanje očituje se i u tome što ovaj spoj ima sposobnost uništenja spora i micelija (Pylak i sur. 2019.).

Istraživanje utjecaja hitozana na gljivične bolesti kod jagoda pokazalo je da su jagode koje su folijarno tretirane sa  $10 \text{ g L}^{-1}$  hitozana imale znatno bolju kontrolu infekcije sa *Botrytis cinerea*. Također, kod tretiranih jagoda zabilježeno je značajno povećanje visine biljaka, duljine korijena, ukupne mase ploda, ukupnih antocijanina, karotenoida, flavonoida i antioksidativna aktivnost kod svježeg voća. Prema istom autoru (Pylak i sur. 2019.), istraživanja su pokazala da su tretmani hitozanom nakon berbe značajno smanjili gljivičnu trulež, zadržali očuvanost, čvrstoću i kvalitetu plodova.

Iako se primarna upotreba hitozana u poljoprivredi temelji na njegovom utjecaju na biosintezu zaštitnih biomolekula protiv štetnika i patogena te na povećanju regulacije obrambenih gena, hitozan ima stimulatívno djelovanje na uzgajane kulture izložene abiotičkom stresu. Brojna istraživanja pokazala su da primjena hitozana ima pozitivne učinke na povećanje tolerantnosti biljaka na stres suše, soli i ekstremnih temperatura (Shahrajabian i sur. 2021.). Slika 2.1.4.2. prikazuje utjecaj hitozana na regulaciju rasta biljaka u uvjetima stresa, odnosno utjecaj hitozana na povećanje lisne površine, lisne mase i promjera krošnje te utjecaj hitozana na molekularno signaliziranje koje je uzrok pojačane biljne obrane. Potrebna su dodatna istraživanja ovog

biostimulatora, kako bi se sa sigurnošću mogao definirati rok primjene, doza te sadržaj aktivne tvari u samim proizvodima za tretiranje.



Slika 2.1.4.2.: Prikaz utjecaja hitozana na regulaciju biljnog rasta u uvjetima stresa.

Izvor: Chakraborty i sur. 2020. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624> - pristup: 25.03.2022.

Proizvodi na bazi hitozana mogu se primijeniti na više načina: tretiranjem sjemena, folijarnim prskanjem, unošenjem u tlo ili kao sredstvo za premazivanje voća u svrhu zaštite nakon berbe. Treba naglasiti da, iako proizvodi na bazi hitozana imaju svojstva biostimulatora, njihova službena klasifikacija u skupinu biostimulatora se još razmatra (Soppelsa i sur. 2018.).

## 2.2. Korisni kemijski elementi

Najčešći esencijalni elementi koji su prisutni u tlu u obliku anorganskih soli su aluminij, natrij, silicij, cink, selen i kobalt. Poznato je da makro i mikroelementi imaju važnu ulogu u normalnom funkcioniranju fizioloških procesa u biljci, ali i na potencijalne morfološke promjene, koje često nisu željene kod plodova. Kako bi se uspostavila ravnoteža i nadoknadili nedostaci, korisnim kemijskim elementima tretiraju se uzgajane kulture u obliku biostimulatora. Ovi kemijski elementi potiču rast biljaka, toleranciju na abiotički stres te doprinose visokoj kvaliteti plodova.



Silicij pripada skupini mikroelemenata, dakle grupi minerala čije se dnevne potrebe kreću od >1 mg do 100 mg. Iako se silicij u tlu nalazi u većim količinama, teško je biljci dostupan zbog vrlo sporog otpuštanja iz minerala gline. Iako se silicij ne ubraja u biogene elemente, ima značajne pozitivne učinke na uzgajane kulture: povećava prirodnu otpornost na gljivična oboljenja, povećava mehaničku čvrstoću i otpornost površinskog sloja lista, povećava otpornost biljke kod povećane koncentracije mangana i aluminijska u biljci, značajno povećava otpornost biljaka na stres soli, pozitivno utječe na fiziološku raspoloživost cinka u listu te utječe na otpornost biljaka na napad štetnika (Gluhić 2014.). Isto tako, utvrđeno je da je silicij učinkovit protiv pucanja trešanja zbog svoje sposobnosti da ograniči propusnost stanične stijenke za vodu i daje veću elastičnost tkivu voća (Soppelsa i sur. 2018.).

Silicij se kao biostimulator nalazi u obliku ortosilicijeve kiseline ( $H_4SiO_4$ ), a nerijetko se nalazi u formulacijama zajedno sa ekstraktom morskih algi, proteinima i aminokiselinama. U ortosilicijevoj kiselini, silicij se nalazi u biljci dostupnom obliku koji je lako topiv. Istraživanje ortosilicijeve kiseline u komercijalnom proizvodu "Silicon" pokazala su odlične rezultate pri tretiranju presadnica, sadnica i sjemena - stimuliran rast biljaka, poboljšani unos esencijalnih hranjivih tvari (Ca, P, K) pri primjeni u rasadničarstvu, kao i povećani sadržaj klorofila i bolju otpornost na bolesti i štetnike (Neeru i sur. 2019.). Silicij koji se koristi u kombinaciji sa drugim biostimulatorima je odgovoran za poboljšanje kvalitete i čvrstoće plodova, jačanje površine lista i ploda, smanjenje količine vlage na površini lista i intenziteta zaraze gljivičnim bolestima. Neki od proizvođača preparata koji sadrže ortosilicijevu kiselinu navode i sljedeće prednosti silicija: intenzivnija je boja cvijeta, bolji je raspored listova, jače su stanične stijenke, bolje je prodiranje korijena te se smanjuje transpiracija za vrijeme suše. Kod takvih kombiniranih preparata, silicij uglavnom čini udio od 20%.

Smatra se da cink također igra ključnu ulogu kod smanjenja poremećaja morfologije plodova nakon berbe, jer je zajedno s kalcijem odgovoran za stabilnost staničnih stijenki i djelomičnu inhibiciju polifenol oksidaze, enzima koji je uglavnom uključen u sve reakcije posmeđivanja mesa i kože voća (Tarantino i sur. 2018.). Komercijalni proizvod koji sadrži cink (namijenjen stimulaciji biljaka) najčešće se proizvodi u formulaciji zajedno sa aminokiselinama. Naime, aminokiseline imaju svojstvo kelatiranja iona, što utječe na bolju iskoristivost i dostupnost elemenata. Isto tako, ustanovljeno je da primjena cinka također utječe na nakupljanje fenolnih spojeva, a time i na antioksidativni potencijal u jabuci (Soppelsa i sur. 2018.).

Ostali korisni kemijski elementi koji imaju stimulatивно djelovanje na biljke su: aluminij, kobalt, natrij i selen. Ovi elementi pozitivno djeluju na tolerantnost biljke na abiotski stres, doprinose povećanju kvalitete plodova te potiču rast. Osim toga, imaju sposobnost smanjenja transpiracije

i zaštite od patogena te potiču sintezu biljnih hormona i inetrakciju sa drugim elementima i simbiontima (Jurčić 2019.).

Ipak, kada je riječ o kemijskim elementima koji imaju stimulirajući učinak na biljke, treba biti na oprezu, kako se ne bi zamijenili sa gnojivima. Osnovna razlika je u tome što kemijski elementi kao biostimulatori sami ne daju hranjive tvari, već pomažu biljci da usvoji neophodne elemente za rast i razvoj te stimuliraju metaboličke procese u biljci.

### **2.3. Ekstrakt morskih algi**

Kada je riječ o biostimulatorima općenito, ekstrakt morskih algi je često prva asocijacija na takav proizvod, koji se ne svrstava niti u biognojiva niti u sredstva za biokontrolu. Proizvodi na bazi morskih algi čine 37% od ukupnog tržišta biostimulatora te su dostupni kao proizvodi u obliku praha, granula i kao tekući ekstrakti, namijenjeni za folijarnu primjenu i za tretiranje u području korijena (Rouphael i Colla 2018.). Sektor organskog voćarstva, slijedeći trendove organske poljoprivrede, također nastoji pronaći održiva rješenja kojim se postiže poboljšanje rasta i produktivnosti voćnih nasada na ekološki prihvatljiv način. Ekstrakti morskih algi kategorizirani su unutar skupine nemikrobnih biljnih biostimulatora. Morske alge su se pokazale kao cijenovno dostupni proizvodi, a kao biljni biostimulatori se komercijalno najčešće upotrebljavaju smeđe, a zatim crvene i zelene makroalge (Rouphael i Colla 2018.), koje se mogu prikupljati iz mora ili iz velikih pogona za proizvodnju. Glavni rodovi algi koji se koriste kao biljni biostimulatori su *Ascophyllum*, *Ecklonia*, *Fucus*, *Laminaria* i *Sargassum* (Chiaiese i sur. 2018.), a popis ostalih važnih vrsta prikazan je u tablici 2.3.1. Najistaknutiji pozitivni učinci primjene morskih algi u poljoprivredi su: bolja opskrba nutrijentima, poboljšanje zakorjenjivanja sadnica, cvjetanja i zretanja plodova, bolji fiziološki status te otpornosti na abiotski stres.

Tablica 2.3.1. Popis važnih vrsta morskih algi s dokumentiranim biostimulacijskim djelovanjem

<b><i>Phaeophyceae</i></b>	<b><i>Rhodophyta</i></b>	<b><i>Chlorophyta</i></b>
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Macrocystis pyrifera</i>	<i>Ulva lactuca</i>
<i>Ecklonia maxima</i>	<i>Porphyra perforate</i>	<i>Enteromorpha prolifera</i>
<i>Durvillea antarctica</i>	<i>Nereocystis spp.</i>	<i>Caulerpa paspaloides</i>
<i>Durvillea protatorum</i>	<i>Cyanidium caldarium</i>	<i>Ulva armoricana</i>
<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Gelidium serrulatum</i>	<i>Codium liyengarii</i>
<i>Sargassum spp.</i>	<i>Acanthophora spicifera</i>	<i>Codium tomentosum</i>
<i>Hydroclathrus spp.</i>	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	<i>Caulerpa sertularioides</i>
<i>Ralfsia spp.</i>	<i>Garcilaria edulis</i>	
<i>Laminaria digitate</i>	<i>Garcilaria dura</i>	
<i>Cystoseira myriophylloides</i>	<i>Laurencia johnstonii</i>	
<i>Fucus spiralis</i>		
<i>Padina pavonica</i>		
<i>Fucus gardneri</i>		
<i>Durvillaea antarctica</i>		

Izvor: Ali i sur. 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10030531> - pristup 20.07.2022.

Bioaktivni spojevi prisutni u komercijalnim proizvodima morskih algi se razlikuju s obzirom na vrstu alge, vrijeme berbe, starost tkiva, područje rasta ili način uzgoja algi. Najčešće su to spojevi poput lipida, proteina, ugljikohidrata (najviše polisaharida), aminokiselina, fitohormona, osmoprotektora, mineralnih nutrijenata i antimikrobnih spojeva. Ekstrakti morskih algi sadrže i različite vrste karotenoida, koji su vrlo jaki antioksidansi, zatim fenolne spojeve (fenolne kiseline, flavonoide, izoflavone, cimetnu kiselinu, benzojevu kiselinu, kvercetin i lignane) te razne minerale bioakumulirane iz mora (Ali i sur. 2021.). Neke vrste smeđih morskih algi (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* i *Saccharina longicuris*) sadrže složene polisaharide koji nisu prisutni u kopnenim biljkama - na primjer laminaran, fukoidan i alginat (Khan i sur. 2009.). Prema istim autorima, laminaran i fukoidan pokazuju širok raspon bioloških aktivnosti koje kod biljaka utječu na stimulaciju prirodnih obrambenih reakcija i kodiranje proteina povezanih s patogeneozom s antimikrobnim svojstvima. Prisutnost aminokiselina u ekstraktu morskih algi je također povezana sa biološkom aktivnošću preparata. Smatra se da triptofan i arginin u ekstraktima morskih algi utječu na značajno povećanje prinosa i rasta biljaka, tako što djeluju kao prekursori fitohormona, odnosno citokinina, auksina i abscisične kiseline (ABA), kao i poliamina, koji sudjeluju u mnogim važnim biološkim procesima, kao što su embriogeneza i organogeneza (važni procesi za cvatnju i razvoj, zametanje plodova, sazrijevanje i starenje lišća) te u zaštiti od osmotskog stresa (Chiaiese i sur. 2018.). Metode ekstrakcije imaju velik utjecaj na sastav ekstrakta morskih algi - tijekom procesa ekstrakcije, kompleksne molekule, kao što su

polisaharidi, pretvaraju se u oligomere koji su visoko bioaktivni u biljkama. Na isti način, male molekule poput hormona mogu biti značajno degradirane (Ali i sur. 2021.).

Nadalje, Stirk i sur. (2020.) izvješćuju da ekstrakti morskih algi kod biljaka potiču povećanu toleranciju na biotski i abiotski stres, što se može pripisati različitim biološki aktivnim spojevima. Dokazano je i postojanje molekula koje regulacijom gena hormona stimuliraju biljni metabolizam i obrambene reakcije. Tako je eksperiment sa ekstraktom *Ascophyllum nodosum* (slika 2.3.1.) pokazao da tretirane biljke u uvjetima stresa soli imaju transkripcijski odgovor s pojačanom regulacijom gena uključenih u tolerantnost na NaCl (Stirk i sur. 2020.). Eksperimenti provedeni u uvjetima stresa niskih temperatura, stresa suše i napada patogena ekstrakt morskih algi se također pokazao kao djelotvoran pripravak koji značajno smanjuje posljedice nepovoljnih uvjeta, samim time i potencijalan gubitak prinosa i kvalitete plodova. Neke od biljnih fizioloških promjena u uvjetima stresa su: pojačana regulacija gena uključenih u metabolizam DNA, RNA i stanične stijenke, smanjena regulacija gena uključenih u reakcije na stres, poboljšani metabolizam lipida i hormonska ravnoteža, biosinteza sekundarnih metabolita, smanjena ekspresija gena koji uzrokuju degradaciju klorofila, povećanje prolina (tvar koja stabilizira membrane i sudjeluje u osmotskoj prilagodbi), nakupljanje topivih šećera i nezasićenih masnih kiselina, povećanje antioksidativne enzimske aktivnosti, fenolnih spojeva i metabolita ključnih u mehanizmu protiv oksidativnog stresa (Stirk i sur. 2020., Chiaiese i sur. 2018.). Iz navedenih fizioloških promjena biljaka, može se reći da ekstrakt morskih algi ima značajno djelovanje na staničnoj i molekularnoj razini, što je od velike važnosti za rast i razvoj biljaka u uvjetima stresa.



Slika 2.3.1.: *Ascophyllum nodosum* u prirodnom staništu - izgled alge; komercijalni biostimulator.

Izvor: Agriculture XPRT.

<https://www.agriculture-xprt.com/products/algeafert-solid-k-ascophyllum-nodosum-seaweed-extract-507464> – pristup 25.07.2022.

Ekstrakti morskih algi imaju značajan utjecaj na biosintezu fitohormona. Brojna istraživanja komercijalnih biostimulatora na bazi morskih algi detektirala su citokinine i auksine, dok se giberelini (GA) i abscisična kiselina (ABA) spominju kao manje prisutni hormoni u proizvodima. Kao najznačajniji se ističe fitohormon citokinin, koji se povezuje sa uzročnikom povećane biljne tolerantnosti na stres (Stirk i sur. 2020.). Istraživanja su pokazala da ekstrakti morskih algi i njihove komponente mogu modulirati ekspresiju gena odgovornih za endogenu biosintezu hormona rasta, uključujući auksin, citokinin i giberelin (Ali i sur. 2021.), što se povezuje sa povećanjem prinosa i kvalitete plodova.

Osim što biostimulator na bazi morskih algi djeluje na fiziološke procese biljaka, ima pozitivno djelovanje i na mikrobiom tla. Mikrobiološka bioraznolikost u tlu predstavlja posebnu važnost u organskom voćarstvu, s obzirom na to da je obrada tla reducirana te da se teži postići samoodrživi sustav tlo-biljka. Značajna aktivnost mikroba je u rizosferi tla, gdje se odvijaju interakcije između korijena biljke, mikroorganizama i inokuliranih biostimulirajućih tvari. Razgradnjom organskog materijala u tlu i biljnim izlučivanjem nastaju organske kiseline, aminokiseline, šećeri i dr. spojevi koji utječu na rast postojećih populacija te aktiviraju razvoj novih populacija korisnih mikroorganizama. S obzirom na to da korijenske izlučevine također imaju sposobnost aktivacije mikroorganizama u rizosferi, može se zaključiti da tretiranje voćki ekstraktom morskih algi pozitivno djeluje i na mikrobiom tla, a osim toga, može se tretirati i tlo. Smatra se da ekstrakti morskih algi predstavljaju potencijal za poticanje rasta i razvoja biljaka, ali i svojstva rizosfernih mikroba (Ali i sur. 2021.). Istraživanja su pokazala sljedeće učinke ekstrakta morskih algi na mikrobiom tla:

- Nakon tretmana biljaka ekstraktom vrste *Ascophyllum nodosum*, sastav gljivica i bakterija na korijenju i u rizosferi je značajno varirao u odnosu na kontrolu. Zabilježen je i značajni rast biomase korijena, izdanaka i korijena, a smatra se da je to posljedica pojave nekoliko korisnih skupina mikroba u rizosferi ekstraktom tretirane biljke (Renaut i sur. 2019., prema Ali i sur. 2021.).
- Tretiranje fermentiranog pripravka vrste *Ascophyllum nodosum* uzrokovalo je značajni porast brojnosti bakterija u tlu te povećanje enzimske aktivnosti dehidrogenaze, nitrit reduktaze, ureaze i celulaze u tlu.
- Biostimulator na bazi *Lessonia nigrescens* i *Lessonia flavicans* primijenjen je na tlo prije sadnje presadnica *Malus hupehensis*. Uočena je povećana aktivnost enzima invertaze, ureaze, proteinaze i fosfataze u tlu u usporedbi s kontrolom. Rezultati ukazuju i na

značajnu promjenu gljivične zajednice tla nakon primjena ekstrakta morske trave (Wang i sur. 2016., prema Ali i sur. 2021.).

- Tretiranje rizosfere jagode ekstraktom *Ascophyllum nodosum* u stakleničkim i poljskim uvjetima, ukazalo je na povećanje metaboličke aktivnosti mikroba, njihove funkcionalne raznolikosti te povećanje broja kolonija i disanja tla (Cluzet i sur. 2004., prema Ali i sur. 2021.).

U organskoj poljoprivredi poznata je važnost interakcije biljka-mikroorganizmi-tlo, a primjena biostimulatora na bazi morskih algi pokazala se kao jedan od načina za uspostavljanje ravnoteže postojećih populacija mikroorganizama i poticanje stvaranja novih kolonija, a sve s ciljem postizanja zdravog tla, kvalitetnih i većih prinosa.

Prema El Boukhari i sur. (2020.), biostimulatori na bazi ekstrakta morskih algi imaju i sljedeće pozitivne utjecaje na biljke: povećanje gustoće i duljine korijena, povećanje učinkovitosti iskorištavanja vode i hranjivih tvari, značajno pojačana fitohormonska aktivnost, poboljšani rast stabljika tretiranjem prije sadnje, povećanje površine izdanaka, povećanje brzine prijenosa elektrona, transpiracije, stomatalne vodljivosti i fotosinteze, veći ukupni sadržaj klorofila, dulji rast grana, ublažavanje stresa soli, povećanje lisne površine, suhe mase, veći sadržaj fosfora i natrija u lišću, poboljšana hidrofilna antioksidacijska aktivnost u lišću, povećanje ukupnog sadržaja fenola, vitamina C, fruktoze, saharoze, suhe tvari i antocijana te smanjenje indeksa posmeđivanja kod skladištenja voća. Navedeni pozitivni učinci morskih algi na biljke posljedično utječu i na povećanje prinosa i tržišne vrijednosti. Autori (Stirk i sur. 2020) brojne korisne učinke ekstrakta morskih algi pripisuju mnogim komponentama sadržanim u morskim algama, a neke od tih komponenta podrazumijevaju bioaktivne molekule florotanini i oligosaharidi, brasinosteroidi, betaini, poliamini, polimeri, florotanini dr.

Biostimulatori na bazi morskih algi mogu se primjenjivati raznim metodama, što ovisi o proizvodu i formulaciji proizvoda. Moguće je tretiranje tla ekstraktom ili suhom biomasom algi (u obliku kuglica, granula ili praha), tretiranje tekućom suspenzijom kultura, folijarnim prskanjem ili namakanjem supstrata kulturom algi. Od navedenih metoda primjene, folijarna metoda se pokazala kao najučinkovitija, u uvjetima visoke relativne vlažnosti (Chiaiese i sur. 2018.).

Koncentracija kontaminanata u ekstraktu ne smije prelaziti neke definirane koncentracije, npr. 1,5; 120; 1 mg/kg<sup>-1</sup> suhe tvari su pragovi za kadmij, olovo i živu. Koncentracija bakra i cinka ne smije prelaziti 600 odnosno 1500 mg/kg suhe tvari. Također, koncentracije uzročnika *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* ili *Enterococcaceae* moraju se provjeriti u ekstraktu (El Boukhari i sur. 2020). U statutu o biostimulatorima i regulativama vezanim uz komercijalne

proizvode stoji da proizvod biostimulatora mora imati učinke navedene na etiketi proizvoda za biljke navedene na njoj. Ovakvi propisi bi mogli predstavljati izazov za proizvođače, budući da istraživanja pokazuju varijabilnosti učinaka nakon primjene ekstrakata morske trave, što upućuje na potrebu o dodatnim istraživanjima i prilagodbi proizvodnje ili primjene ovih biostimulatora zakonskim regulativama i smjernicama ili obratno.

## 2.4. Mikrobni biostimulatori

Mikrobni biostimulatori imaju veliki potencijal kod stabilizacije prinosa u uvjetima malog inputa, ali i kod pospješivanja ekoloških uvjeta koji nisu povoljni za rast određene kulture. Mnoga istraživanja pokazala su da mikrobne populacije u tlu mogu imati važnu ulogu u oblikovanju rizosfere, pozitivno djelujući na ekosustav tla. U organskom voćarstvu, vrlo je važna plodnost tla i sposobnost tla da se regenerira, pohranjuje hranjive tvari te tako samoregulira procese razgradnje i sinteze organskih i anorganskih tvari. Bioraznolikost mikroorganizama, kao i njihova aktivnost u tlu, za organsko voćarstvo predstavlja najvažniji "alat" za poboljšanje plodnosti tla, koja posljedično rezultira većim i kvalitetnijim prinosima, boljim gospodarenjem vodom, boljim iskorištavanjem hraniva te većoj otpornosti kultura na stres, štetnike i patogene. Više je stimulacijskih učinaka mikrobnih biostimulatora, a kao najvažniji smatraju se: poboljšani unos i translokacija hranjivih tvari (N, P i mikronutrijenata), pojačan razvoj korijenskog sustava (veća biomasa korijena, površina i broj bočnog korijenja), poboljšana apsorpcija vode, jači antioksidativni obrambeni sustav, bolja regulacija biljnih hormona, poboljšana sinteza enzima i fotosintetska aktivnost. Kao najvažnija uloga mikroorganizama u tlu ističe se sudjelovanje u procesu mineralizacije organske tvari, odnosno stvaranja humusa.

Prema Europskom vijeću industrije biostimulatora (EBIC), više od 60 različitih vrsta, sojeva i rodova mikroorganizama ima biostimulativno djelovanje, a komercijalni biostimulatori uglavnom podrazumijevaju mikorizne gljive i druge nesimbiotske gljive te razne sojeve rizobakterija.

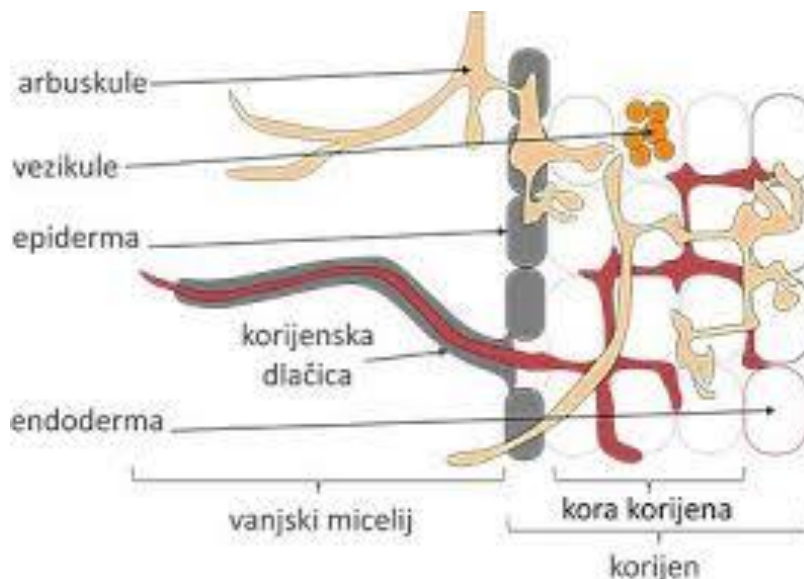
### 2.4.1. Mikoriza

Mikoriza dolazi od grčkih riječi *mykes* (gljiva) i *rhizos* (korijen). Predstavlja simbiotsku vezu između viših biljaka i mikroskopskih gljiva u tlu. Glavni mehanizam simbioze podrazumijeva izmjenu tvari u kojoj se anorganske tvari prenose iz gljive u biljku, a organski spojevi iz biljke u gljivu. Mikorizne gljive lokalizirane su u području korijena, a anorganske tvari koje biljci prenose su voda i makro i mikro hraniva, dok biljka zazvrat gljivi prenosi ugljikohidrate sintetizirane u

procesu fotosinteze. Postoji više tipova mikorizne simbiotske veze: endomikoriza, ektomikoriza, ektoendomikoriza, orhidejska mikoriza i erikoidna mikoriza.

Arbuskularno-vezikularna mikoriza (AVM) je najčešći i najpoznatiji tip endomikorize. Upotreba ove vrste mikorize najraširenija je u poljoprivrednoj proizvodnji. Glavni sastavni dijelovi AVM su arbuskule i vezikule. Prema Buechelu i Bloodnicku (2016.), arbuskule su strukture koje u biljnoj stanici tvore hife, nakon prodiranja u stanice korijena te služe za olakšavanje prijenosa hranjivih tvari, odnosno predstavljaju mjesto izmjene tvari. Prema istim autorima, vezikule su vrećaste strukture koje se formiraju između stanica te sadrže lipide kojima je glavna svrha da gljivama služe kao skladišni organi, a mogu i poslužiti kao i organi za razmnožavanje tako što koloniziraju druge dijelove biljnog korijena. Mikorizne gljive koje se najčešće koriste kao biostimulativni preparati, pripadaju razredu *Glomeromycetes*, rodu *Glomus*.

Mehanizam djelovanja AVM (slika 2.4.1.1.) je kompleksan i još uvijek se istražuje. Otkriveno je da tzv. "efekt rasta" kod koloniziranih biljaka ovisi o sistemskim posljedicama simbioze, koje utječu na fiziologiju cijele biljke. Također, posjeduju transportere za anorganski fosfat, gene za transport amonijaka i aminokiselina, arginin, hormon strigolakton (potiče metabolizam i grananje gljiva), a zabilježena je i prisutnost bakterija (*Bacillus sp.*, *Bacillus thuringiensis* i *Paenibacillus rhizosphaerae*) čija je uloga antagonističko djelovanje na patogene (Andre i Takaaki 2012.).



Slika 2.4.1.1.: Arbuskularno-vezikularna mikoriza

Izvor: Vukadinović (2020). [http://tlo-i-biljka.eu/Tekstovi/Buducnost\\_IB.pdf](http://tlo-i-biljka.eu/Tekstovi/Buducnost_IB.pdf) - pristup: 01.07.2022.



Endomikoriza, odnosno AVM pokazala je odlične rezultate u uzgoju jabuka, agruma, maslina i koštičavog voća. Višestruke se uloge AVM u poljoprivredi, kako za uzgajanu biljku, tako i u poboljšanju plodnosti tla te fizikalnim, kemijskim i biološkim karakteristikama tla. Prema Bugarčiću (2015.) i Čoliću (2013.), primjenom mikorize u poljoprivredi se postiže:

- bolja ishrana uzgajane voćne kulture (gljiva pospješuje usvajanje vode, ugljika i dušika);
- lučenje enzima od strane gljive koji ubrzavaju mineralizaciju organske tvari tla te povećanu dostupnost dušika iz tla;
- lučenje kiseline kojima gljive otapaju i usvajaju teško topive minerale te njihov transport sa većih udaljenosti do korijena biljke;
- povećanje biljne otpornosti na klimatski nepovoljne uvjete - hife AVM gljiva djeluju kao rezervoar vode tijekom suše;
- stabilizacija nepovoljnog pH u tlu te zaslanjenosti tla u neposrednoj blizini korijenovih dlačica;
- bolja prilagođenost biljke na otežane uvjete u tlu općenito;
- zaštita biljke od iznadprosječne koncentracije teških metala u tlu - gljive nakupljaju teške metale u stanicama te ih ne prosljeđuju biljci;
- povećana biljna rezistentnost na patogene organizme prisutne u tlu - AVM gljive napadaju nematode i patogene aktivirajući mehanizme zaštite;
- jačanje imunološkog sustava uzgajane kulture;
- lučenje hormona i vitamina koji stimuliraju rast biljaka;
- uspostavljanje mikorizne veze između više biljaka, putem koje se vrši transport vode i nutrijenata;
- bolja iskoristivost dušika i fosfora;
- smanjena potrošnja vode do 40%;
- smanjena potrošnja gnojiva i sredstava za zaštitu bilja do 35%;
- ubrzanje rasta biljke, povećanje uroda za 25%;
- povećanje kvalitete plodova.

Drugi tip mikorize - ektomikoriza, također nalazi široku primjenu u voćarstvu te je općenito više prisutna kod šumskih drveća i uzgajanih voćnih kultura. Osnovna razlika između endo i ektomikorize je u načinu prodiranje hifa u stanice korijena. Ektomikorizne gljive koloniziraju korijen bez prodiranja u stanice, tvoreći hartigovu mrežicu (čine je hife unutar korijen) i omotač (debeli sloj hifa koje prekrivaju površinu korijena). Biljka kolonizirana ektomikoriznim gljivama je tolerantnija na sušu, visoku temperaturu tla, ekstremnu kiselost tla, toksine u tlu te ima efikasniju i veću aktivnu površinu korijena (Slankis 1973.), što rezultira boljim usvajanjem vode i nutrijenata.

Istraživanja utjecaja mikorize na voćne kulture pokazala su brojne pozitivne ishode povezane sa stresom soli: arbuskularna mikoriza smanjuje nepoželjne promjene na biokemijskoj razini koje se javljaju uslijed uzgoja jagoda na zaslanjenom tlu (Koc 2015.). Prilikom stresa soli, kod uzgoja naranče se vrsta *Glomus versiforme* pokazala najučinkovitijom gljivom (Zou i Wu 2011.). Osim toga, primjena čistog mikoriznog pripravka ili kombinacije mikorize i pojedinih bakterija se pokazala kao metoda koja značajno poboljšava toleranciju na stres soli kod grožđa, uz poboljšanje usvajanja vode i teško dostupnih hraniva (Upreti i sur. 2015.).

Osim pozitivnog učinka na abiotički stres, mikorizom kolonizirane sadnice, u odnosu na kontrolu, apsorbiraju značajno veće koncentracije fosfora, NO, surkoze, glukoze i fitohormona auksina IAA (Wu i sur. 2016., prema Cimprić 2017.), te tako djeluju na poboljšanje kemijskih svojstava tla. Same gljivice, ali i drugi mikroorganizmi čiju prisutnost mikorizna simbioza pospješuje, imaju sposobnost promjene i stabilizacije pH vrijednosti tla - procesima oksidacije sumpora i amonijaka otpuštaju se H<sup>+</sup> ioni u tlo te se sintetiziraju organske kiseline. Takav efekt mikoriznih gljivica posebno može biti važan kod uzgoja vrsta koje imaju zahtjeve za kiselim tлом, kao što su borovnice, kupine, maline itd. Nadalje, struktura tla, vodozračni režim i ispiranje hraniva iz tla su pod direktnim utjecajem micelija mikoriznih gljiva, što posljedično utječe na smanjenje potreba za gnojidbom. Osim toga, gljive imaju sposobnost apsorpcije toksina i teških metala iz tla, čime djeluju i kao bioremedijacijski ili mikoremedijacijski alat za sanaciju onečišćenih tala.

Mikorizacija sadnica ili stabala voćki posebno je važna u područjima lošije kvalitete tla gdje su vodni resursi ograničeni. Mediteranske voćne kulture (maslina, agrumi, kivi, nar, smokva, badem, pistacija, rogač, vinova loza i drugo koštičavo i jezgričavo voće) u takvim područjima zahtjevaju dodatnu inokulaciju mikoriznim gljivama (slika 2.4.1.2.), kako bi se postigla veća biljna otpornost na biotski i abiotički stres, povećan unos P i Zn, bolji razvoj korijena sadnica u osiromašenim tlima te povećan urod i kvaliteta plodova.

(A)



(B)



Slika 2.4.1.2.: Nemikorizirani vinograd (A) i mikorizirani vinograd (B) sađeni u isto vrijeme.

Izvor: Ministarstvo poljoprivrede, 2015. <https://www.savjetodavna.hr/2015/11/26/mikoriza-nova-tehnologija-u-poljoprivredi/> - pristup: 01.07.2022.

Mikorizne gljive mogu se inokulirati u obliku praha spora, prilikom sadnje ili naknadno, a mogu se koristiti i drugi biostimulatori koji potiču uspostavljanje simbioze već postojećih gljiva u tlu sa uzgajanom kulturom. Biostimulatori koji se najčešće koriste kao aktivatori lokalnih, autohtonih mikoriznih gljiva u tlu su: mineral kalcit, formononetin, mješavina mikroorganizama promotora biljnog rasta i ekstrakt morskih algi (Draguzet 2015.). Odabir biostimulatora, kao i vrsta

mikoriznih cjepiva, treba biti prilagođen kulturi koja se uzgaja, ekološkim uvjetima (tipu tla, klimi) i sustavu proizvodnje. Čimbenik koji utječe na odabir biostimulatora ili samog cjepiva mikoriznih gljiva, odnosno na isplativost tretiranja, dosta ovisi o cijeni, kvaliteti i garanciji uspostavljanja mikoriznog odnosa. Prednost primjene biostimulatora u odnosu na mikorizna cjepiva je u cijeni – biostimulatori su jeftiniji, zbog čega se poljoprivrednici često odlučuju za takav indirektan način kolonizacije korijena biljke.

#### 2.4.2. Rizobakterije

Rizobakterije su bakterije koje žive u području korijena biljke te mogu imati štetno, korisno ili neutralno djelovanje na samu biljku. Biostimulirajuće rizobakterije se odnose na korisne, simbiotske vrste koje žive u mutualističkom odnosu sa biljkom te takve vrste čine 2 - 5% od ukupnih rizobakterija (Antoun i Prévost 2005.). Glavna podjela rizobakterija je na rizosferske i endofitske bakterije. Rizosferske bakterije koloniziraju površinu korijena ili površinu međustaničnog prostora, često tvoreći tvorevine u obliku kvržica. Endofitske bakterije podrazumijevaju vrste koje koloniziraju unutarstanično ili apoplastično područje korijena.

Rizobakterije se često spominju u kontekstu biljnih regulatora i stimulatora rasta, fiksacije dušika, stvaranja biljne otpornosti na razne bolesti i oslobađanja anorganskog fosfora. Simbiotski odnos rizobakterija i biljke razlog je njihove široke primjene u poljoprivredi, odnosno u organskom voćarstvu. Rizobakterije su prisutne u mnogim komercijalnim biostimulatorima, pojedinačno ili u kombinaciji sa mikoriznim ili drugim korisnim gljivama. Takvi proizvodi se primjenjuju kao biostimulirajući pripravci s ciljem poboljšanja rasta uzgajane kulture i povećanja kvalitete i prinosa.

Neke od rizobakterija koje imaju biostimulativno djelovanje su: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, a značajne bakterije koje vežu dušik te se povezuju s mahunarkama uključuju *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* i *Rhizobium*. Ove vrste rizobakterija imaju općenito pozitivne učinke na rast biljaka, proizvodeći indol-3-octenu kiselinu (IAA), 1-aminociklopropan-1-karboksilat-deaminaze (ACC-deaminazu), enzim za otapanje fosfata i siderofor te pokazuju antimikrobno djelovanje protiv biljnih patogena (Azizoglu 2019.).

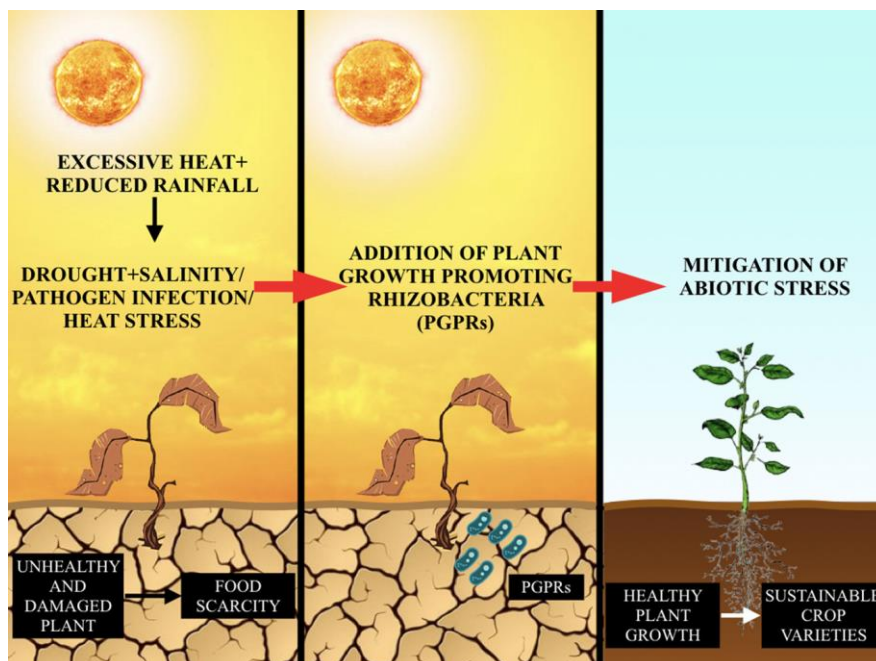
Rizobakterije iz roda *Bacillus* su najrasprostranjenije vrste bakterije u rizosferi i endosferi korijena te čine 95% od ukupnog broja rizobakterija (Poveda i González-Andrés 2021.). Biostimulativna funkcija ovog roda se svodi na pospješivanje rasta biljaka i proizvodnju antibakterijskih i antifungalnih sekundarnih metabolita.

*Bacillus thuringiensis* je vrsta rizobakterije koja je poznata po svom insekticidnom djelovanju - primjenjuje se kao sredstvo za kontrolu insekata i drugih poljoprivrednih štetnika. Svojstva biokontrole ove vrste istraživana su i kod suzbijanja fitopatogenih gljiva. Osim toga, *B. thuringiensis* djeluje kao biostimulator sudjelujući u interakcijama sa biljkama - djeluje kao endofit u biljkama te može izravno pospješiti biljni razvoj ili neizravno potaknuti rast suzbijanjem bolesti (Azizoglu 2019.). Prema istom autoru, ova vrsta bakterije, zajedno sa drugim rizobakterijama, kolonizira korijenje biljaka te predstavlja ključnu ulogu u biljnoj patologiji i interakciji između biljaka i drugih simbiotskih mikroorganizama, kao što su mikorizne gljivice. Posjeduju i sposobnost proizvodnje fitohormona, koji djeluju kao regulatori i signali u rastu i razvoju biljaka. Biofungicidno djelovanje *B. thuringiensis* opisano je u mnogim istraživanjima. Zabilježena je učinkovitost djelovanja *B. thuringiensis* na sivu plijesan jagode - zajedno sa drugim vrstama iz roda *Bacillus* inhibira rast sive plijesni te smanjuje klijavost konidija na plodovima jagode za 80% (Donmez i sur. 2011., prema Pylak i sur. 2019.). Ova vrsta rizobakterija koristi se u proizvodnji raznih komercijalnih biopesticida i biofungicida, međutim, na tržištu biostimulatora i biognojiva još uvijek ne postoji proizvod koji sadrži izolirane kolonije *B. thuringiensis*. Buduće istraživanje novih sojeva može značiti i potencijalni razvoj biostimulatora na bazi ove rizobakterije.

Od drugih vrsta rizobakterija iz roda *Bacillus*, vrste koje su sposobne proizvoditi biljne hormone su: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. anthracis* i *B. telluris* (Poveda i González-Andrés 2021.). Ove vrste se u mnogim istraživanjima spominju kao vrste koje imaju sposobnost sinteze fitohormona IAA - auksina, bilo u in vivo ili u in vitro uzgoju. Posljedice proizvodnje auksina su povećan rast glavnog i bočnih korijena, a samim time i veći nadzemni biljni rast. Osim auksina, vrste roda *Bacillus* sposobne su sintetizirati i fitohormone citokinine i gibereline te tako indirektno utjecati na povećanu biljnu otpornost na abiotički stres, kao što je stres suše i soli (Poveda i González-Andrés 2021.).

Neke od biostimulativnih rizobakterija koje pripadaju rodu *Pseudomonas* su: *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. vancouverensis* i *P. striata* (Backer i sur. 2018.). Prema istim autorima, ove vrste imaju sposobnost ublažavanja stresa suše (slika 2.4.2.1.), zahvaljujući akumulaciji osmolita i drugim procesima, što posljedično rezultira ekspresijom gena za biosintezu etilena i transkripciju salicilne kiseline. Također, *Pseudomonas fluorescens* u uvjetima stresa izazvanog poplavama proizvodi enzim deaminazu, koja utječe na povećano izduživanje korijena (Backer i sur. 2018.). Azospirillum spp. podrazumijeva bakterije koje se smatraju među najvažnijim za fiksaciju dušika (Calvo i sur. 2014), a neke druge vrste koje također imaju tu sposobnost su *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Rhizobium* i dr. Mineralizacija organskog atmosferskog dušika preko nitrita, u biljci lako dostupan nitrat je proces koji vrše N-

fiksirajuće bakterije. Simbiotske rizobakterije tvore specijalizirane strukture koje se nazivaju kvržice. Nesimbiotske rizobakterije, koje također fiksiraju N<sub>2</sub>, slobodno žive u tlu te su vrlo rasprostranjene u raznim usjevima, nasadima i tipovima tala. Mnoge fiksirajuće bakterije se koriste kao biognojiva i biostimulatori već duže vrijeme, a osim što fiksiraju dušik, sintetiziraju tvari za poticanje rasta biljaka i povećavaju dostupnosti nutrijenata u tlu (P, K, Zn), što rezultira boljom ishranom bilja (Aasfar i sur. 2021.).



Slika 2.4.2.1.: Uloga biostimulativnih rizobakterija kod stresa suše.

Izvor: Ojasvini i sur. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032> - pristup: 20.07.2022.

Zbog svih navedenih djelovanja i pozitivnih učinaka na biljke, mikroorganizmi kao biostimulatori predstavljaju potencijal za dodatne inovacije. Međutim, propisi, zakonski i regulatorni okviri Europske unije zahtijevaju osmišljavanje i moderniziranje preparata na bazi mikroorganizama, s ciljem širenja tržišta i stvaranja veće prepoznatljivosti proizvoda i svih njihovih benefita u održivoj poljoprivredi i organskom voćarstvu.

### **3. Primjena biostimulatora**

Biostimulatori koji se u voćarstvu primjenjuju u svrhu povećanja rasta, prinosa i kvalitete uroda često su lako primjenjivi te se mogu aplicirati na više načina. Ipak, ovisno o tipu proizvoda, aktivnim tvarima i uzgajanoj kulturi, postoje određeni idealni i preporučljivi načini primjene svakog biostimulatora. Biološki učinci biostimulatora često ovise o uzgajanoj vrsti i pod velikim su utjecajem vanjskih uvjeta, odnosno uzgojnih uvjeta (Andreotti i sur. 2022.). Kod primjene su posebno važni način, doze i vrijeme primjene. Preparati na bazi ekstrakta morskih algi, huminske i fulvinske kiseline primjenjuju uglavnom folijarno, a proteinski hidrolizati i korisni kemijski elementi se uglavnom primjenjuju u tlo (natapanjem) ili folijarno (Andreotti i sur. 2022.). Biostimulatori koji ublažavaju biotski, a posebno abiotički stres, uglavnom se primjenjuju u razdoblju koje prethodi stresu, pri čemu je potrebno praćenje vanjskih uvjeta i prema tome pravovremeno djelovanje. Biostimulatori se mogu podijeliti prema načinu primjene: preparati koji se primjenjuju prskanjem krošnje, odnosno folijarno te preparati koji se primjenjuju zalijevanjem, natapanjem ili inokulacijom u tlo. Svi preparati se bez obzira na preporuke mogu primijeniti na oba načina, što ovisi o sastavu preparata, uzgajanoj vrsti, fenofazi i razlogu zbog kojeg se primjenjuju.

#### **3.1. Folijarna primjena**

Proizvodi od morskih algi općenito su primjenjivani folijarnim prskanjem u koncentracijama u rasponu od 0,15 do 0,7%, često zajedno s malim količinama sredstva za vlaženje kako bi se povećala homogenost distribucije proizvoda po krošnjama biljaka (Andreotti i sur. 2022.). Ekstrakti morskih algi se folijarno često primjenjuju u kombinaciji sa drugim biostimulatorima. Istraživanja su pokazala da su ekstrakti morskih algi često rezultirali promjenom u koncentraciji fenola, odnosno u povećanju sadržaja antocijana što je posljedično utjecalo na promjenu u vanjskoj obojenosti voća. Ovaj učinak potvrđen je kod sorti crvene vinove loze, neovisno o području uzgoja i sezonskim meteorološkim uvjetima na jabuci i na jagodi (Sopelsa i sur. 2018, prema Andreotti i sur. 2022.). Prema istim autorima, prskanja krošnje često su se ponavljala tijekom vegetacijske sezone u intervalima od 1 - 2 tjedna, općenito u fenološkim fazama od cvatnje do početka sazrijevanja. Kod vinove loze, aplikacije su općenito obavljene od faze bobice veličine zrna graška, dok su za jagode prvi tretmani prethodili vremenu cvatnje, a naknadna prskanja su obavljena do tjedan dana prije prve berbe. U nekoliko studija provedenih na vinovoj lozi i na gorkoj naranči (Frioni 2021.; Spann 2011., prema Andreotti i sur. 2022.) uspoređeni su folijarni način primjene i metoda natapanja u uvjetima suše. Kod vinove loze,



folijarna primjena potaknula je fotosintetski oporavak nakon suše, dok primjena natapanjem nije imala nikakav učinak na fiziološko stanje vinove loze. Kod gorke naranče samo je primjena natapanja povećala potencijal vode stabiljike tijekom vodnog stresa i konačne akumulacije biomase, dok folijarna primjena nije pokazala značajan učinak na performanse biljaka pod ograničenjem vode. Primjene morskih algi općenito su ponovljene prije i tijekom stresnog događaja suše dok istraživanja primjene u slučaju drugog abiotskog stresa nisu dovoljno provedena. Može se zaključiti da je učinkovitost folijarne primjene biostimulatora ekstrakta morskih algi ovisna o tipu stresa, uzgajanoj vrsti i sastavu proizvoda te da još uvijek nisu definirane točne doze za svaku voćnu vrstu. Najbolje vrijeme za prskanje krošnje ovim biostimulatorom je u rano jutro ili kasno popodne, za vrijeme kada nema jakog vjetra i mogućnosti kiše.

Proizvodi na bazi silicija mogu biti kruti ili tekući. Čvrsti proizvodi Si dobiveni su iz različitih izvora (stijene, sedimenti, nusproizvodi iz biljaka, reciklirani materijal) i stoga su ovisno o karakteristikama sirovine karakterizirani vrlo različitim sadržajem Si. Tekući proizvodi namijenjeni za folijarnu primjenu sadrže Si u različitim formulacijama, poput mono ili polisilicijeve kiseline. Koncentracija Si u tekućim proizvodima odgovara sadržaju Si dostupnom biljkama. Pri visokom sadržaju Si, pH proizvoda je visok (oko 9) i stoga je potrebno razrjeđivanje prije primjene proizvoda (Andreotti i sur. 2022.). Istraživanja istih autora su pokazala da je folijarna primjena manje učinkovita od primjene putem fertirigacije u povećanju koncentracije Si i općenito zahtjeva visoku koncentraciju otopine za prskanje (do 1500 ppm) da bi bila učinkovita. Ipak, folijarna primjena omogućuje izbjegavanje problema povezanih s mogućom imobilizacijom Si u tlu i stoga se često odabire kada su potrebna ponovljena prskanja ciljnih organa. U slučaju folijarnog prskanja, Si se može apsorbirati izravno kroz sloj kutikule. Osim kalijevog silikata, druge testirane formulacije Si bile su kalcijev metasilikat ( $\text{CaSiO}_3$ ) i nanočestice silicija. Folijarno prskanje s nanočesticama Si provedeno je pri visokim koncentracijama (5,3 i 10,6 mM Si) i bilo je učinkovito u prevladavanju učinaka stresa soli (Elsheery i sur. 2020., prema Andreotti i sur. 2022.).

Biostimulatori na bazi proteina i aminokiselina se najčešće primjenjuju folijarno, a mogu i kroz sustave fertirigacije ili zalijevanjem pojedinačnih stabala. Najčešće primjenjivane doze su 1 - 5 L  $\text{ha}^{-1}$ . Pri folijarnoj primjeni mogu se kombinirati sa gnojivima ili se može obaviti samostalni tretman. Lako se i brzo usvajaju preko lista, a neloše je usvajanje i putem korijena, kada aminokiselina imaju i pozitivan učinak na mikroorganizme tla (Gluhić 2020.). Prema Gluhiću (2020.), autori (Bulgari i sur. 2015; Brown i Sa, 2015; Calvo i sur. 2014; Jardin 2015; Yakhin i sur. 2017.) su u raznim istraživanjima izdvojili vrijeme primjene biostimulatora na bazi aminokiselina prema uzgajanoj kulturi i kritičnim razvojnim stadijima: kod drvenastih kultura najbolje je primijeniti preparat u fazi kretanja vegetacije u rano proljeće, odnosno kada postoji opasnost



od kasnih mrazova zatim u fenofazi cvatnje i oplodnje ili tijekom ljetnog perioda rasta plodova. Kod masline se preporuča primijeniti biostimulator na kraju zimskog mirovanja, u fenofazi cvatnje, u periodu visokih ljetnih temperatura i suše te u fazi sinteze ulja u plodovima. Folijarna primjena hidrolizata i aminokiselina se u pravilu vrši kada je cilj poboljšati prinos i kvalitetu plodova (Andreotti i sur. 2022.). Ispitivanje primjene proteinskih hidrolizata za poboljšanje kvalitete plodova ukazuje na to da folijarna primjena ima značajni utjecaj na sastav plodova voća: primijenili su se proteinski hidrolizati biljnog ili neodređenog porijekla, u koncentracijama od 0,036 do 0,3%, više puta tijekom vegetacije. Biostimulatori su primijenjeni u fenofazama razvoj ploda (u slučaju jabuke) te u fenofazi dozrijevanja ploda (u slučaju vinove loze). Rezultati su pokazali značajnu modulaciju sekundarnih metabolita kao što su polifenoli, antocijanini, prekursori arome i hlapljive tvari, što je rezultiralo poboljšanom bojom kože voća, antioksidativnom aktivnošću i senzornim karakteristikama (Andreotti i sur. 2022.).

Biostimulatori na bazi huminskih i fulvinskih kiselina se većinski primjenjuju folijarnim prskanjem. Kao i drugi preparati, mogu se primijeniti i natapanjem ili kombinaciju dviju metoda primjene. U istraživanju Irani i sur. (2021.) su se preparati na bazi navedenih kiselina primijenili u koncentracijama u rasponu od 0,0025 do 1,5%, 2 - 4 puta tijekom vegetativne sezona - prije cvatnje, u punoj cvatnji i tijekom rane faze razvoja plodova (Irani i sur. 2021., prema Andreotti i sur. 2022.). Rezultati navedenog istraživanja pokazali su pozitivne učinke na prinos, odnosno povećanje mase ploda, povećanje koncentracije antocijana i vitamina C te pozitivan utjecaj na primarni i sekundarni metabolizam, što posljedično utječe na bolju biljnu ishranu i povećanje koncentracije klorofila u lišću. Osim toga, huminske i fulvinske kiseline su se pokazale kao dobar biostimulator za primjenu u slučaju stresa suše. Pojedini proizvođači biostimulatora na bazi huminskih i fulvinskih kiselina navode sljedeće doze i vrijeme primjene:

- primjena u tlo: 2 - 4 kg/ha; 2 - 3 puta tijekom faze rasta sadnica i faze rasta odrasle biljke
- folijarna primjena: 1 - 2 kg/ha; 2 - 3 puta tijekom faze klijanja i faze rasta.

### **3.2. Primjena u tlo**

Biostimulatori koji se najčešće primjenjuju inokulacijom u tlo su mikrobnii biostimulatori, odnosno prethodno opisane mikorizne gljive i bakterije koje pozitivno utječu na rast, razvoj i otpornost uzgajane kulture. Osim mikroba, u tlo se mogu aplicirati i drugi biostimulatori, poput ekstrakta morskih algi, silicija i drugih korisnih kemijskih elemenata te hidrolizata proteina.

Mikrobni biostimulatori se mogu primijeniti kao živi inokulum jedne ili više vrsta mikroorganizama. Najčešća metoda kolonizacije korijena mikoriznim gljivicama je inokulacijom, odnosno zarazom korijena biljke domaćina. Prije inokulacije, potrebno je odabrati soj gljiva pogodan za uzgajanu kulturu. Najčešći rodovi endomikorize koji se koriste u poljoprivredi su: *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora*, *Sklerocystis* i *Entrophospora* (Ravnjak 2015.). U voćnim nasadima koja prethodno nisu kolonizirana mikoriznim gljivicama, može se obaviti inokulacija naknadno, pomoću cjepiva, na primjer aparata "Kwazar", kojim se aplicira suspenzija mikorize u korijen biljke. Kod velikih stabala, aplikaciju je potrebno provesti svakih 0,5 m po rubu krošnje, a kod malih, dovoljna je jedna aplikacija u području korijena. Proces je jednostavan te se obavlja ručno, a prema podacima OPG-ova koja su vršila ovakav oblik mikorizacije, može se inokulirati 1300 sadnica za 2000 eura (Slezak 2013.). Ako se biljka razmnožava putem sjemena, prije mikorizacije i sjetve potrebno je osigurati sterilan supstrat, uglavnom glinu, perlit, vermikulit ili pijesak koji se potom miješa sa supstratom u kojem će se uzgajati sadnice (Ravnjak 2015.). Treća opcija mikorizacije je pri samoj sadnji - umakanjem sadnice u otopinu vode i spora mikoriznih gljivica te sadnja koju je potrebno odmah obaviti. Ova metoda mikorizacije je najčešća. Osim prije navedenih koristi, mikorizacijom sadnica se značajno skraćuje vrijeme do punog roda te su plodovi veće kvalitete, mase, volumena, arome i okusa.

Kada je riječ o aplikaciji korisnih biostimulirajućih bakterija, nužno je uzeti u obzir vanjske uzgojne uvjete, kao što su: pH tla, tip tla, srednja temperatura zraka, sadržaj vlage u tlu, količina oborina tijekom vegetacijske sezone, način uzgoja (poljski uvjeti, staklenički uzgoj i sl.) itd. Ako uvjeti nisu povoljni, kolonizacija bakterijama može biti neuspješna (Lucy i sur. 2004.). Postoji više načina za inokulaciju bakterija. Simbiotske bakterije roda *Rhizobium spp.* se često inokuliraju u treset, koji služi kao nosač inokuluma. Takva metoda, iako je jeftina i lako primjenjiva, ima pojedine nedostatke: treset se općenito smatra nesterilnim medijem te zadržava veliku količinu onečišćivača. Također, kvaliteta treseta može biti promjenjiva, a sam treset nije nužno lako dostupan u cijelom svijetu. Kod toplinske sterilizacije treseta može doći do oslobađanja tvari toksičnih za bakterije, a bakterije u formulacijama treseta su osjetljive na temperaturne fluktuacije i imaju ograničen rok trajanja (Bashan 1998., prema Lucy i sur. 2004.). Bakterije se još mogu aplicirati u tlo u obliku granula, koje osim dehidriranih bakterija često sadrže i mikro i makrohraniva, čime utječu na poboljšanje apsorpcije hranjivih tvari te smanjuju utjecaj okolišnog stresa (Pylak i sur. 2019.). Biostimulirajuće bakterije mogu se primijeniti u tlo u obliku formulacija koje sadrže i druge korisne organizme. Takvi proizvodi se nazivaju humusni bio proizvodi i dostupni su u različitim oblicima, a glavni sastav je mješavina korisnih mikroorganizama (bakterija i gljivica) i organske tvari nastale tijekom procesa humifikacije. Zbog aktivnih mikroorganizama i složenih kemijskih spojeva, takvi humusni bio proizvodi se najčešće primjenjuju kao tekućina koja se u razrijeđenom stanju aplicira izravno u tlo, u područje biljnog

korijena (Pylak i sur. 2019.). Postoje i biostimulatori koji sadrže korisne bakterije u kombinaciji sa ekstraktom morskih algi, proteinima i kemijskim elementima, a koji su namijenjeni za apliciranje na korijen sadnica neposredno prije sadnje, u obliku granula ili inokulanta koji inokuliraju u tlo kod starijih višegodišnjih voćnih vrsta.

Kod odabira preparata na bazi bakterija, potrebno je znati i mehanizme djelovanja, odnosno fiziološki utjecaj pojedinih vrsta bakterija na biljku. Primjerice, *Pseudomonas putida* sadrži gen za deaminazu, enzim koji inhibira sintezu etilena, a koji se javlja u uvjetima stresa (Hall i sur. 1996., prema Lucy i sur. 2004.). Prema tome, navedenu vrstu bakterija preporuča se aplicirati u nasade kao preventivu za sve negativne posljedice abiotskog stresa. Prema istraživanjima (Lucy i sur. 2004.), za određenu voćnu vrstu preporučuje se sljedeće vrste bakterija: za badem, jabuku, trešnju, breskvu, krušku i jagodu - *Pseudomonas fluorescens*; za jezgričavo voće i agrume - *Pseudomonas syringae*; za orašasto voće - *Agrobacterium radiobacter*. Također, potrebno je spomenuti i to da se bakterije koje imaju fungicidna svojstva mogu primijeniti i folijarno. Način primjene ponajprije ovisi o uzgajanoj kulturi, utjecaju bakterije na biljku, ekološkim uvjetima, vremenu apliciranja, vrsti bakterije te o samom proizvodu, odnosno sastavu biostimulirajućeg proizvoda.

Kada je riječ o primjeni biostimulatora ekstrakta morskih algi, iako se pretežno primjenjuju folijarno, u specifičnim slučajevima se mogu primijeniti i u tlo. Prema Andreotti i sur. (2022) specifični slučajevi podrazumijevaju slučajeve iscrpljenog tla i/ili prisutnost biljnih bolesti koje se prenose putem tla. Kao i kod folijarne primjene, apsorpcija i učinak ekstrakta morskih algi primijenjenih u tlo ovisi o okolišnim čimbenicima (temperaturi, vlažnosti zraka i tla, količini oborina, tipu tla i sl.) koji imaju veliki utjecaj na fiziološko stanje biljke i transport aktivnih tvari. Primjena ekstrakta morskih algi dobivenih od mikro i makro algi slabo je istraživana u području voćarstva. U kontekstu primjene u tlo putem zalijevanja ili natapanja, autori (Andreotti i sur. 2022) spominju primjenu:

- *A. nodosum* u nasadu grožđa: u dozi  $1 \text{ g L}^{-1}$  (0.1%); ukupno 6 aplikacija, 5 prije stresa i 1 na kraju stresnog razdoblja (za oporavak) te primjenu u uvjetima stresa suše. Rezultati i usporedba sa folijarnom primjenom: primjena natapanjem nije utjecala na oporavak vinove loze, dok je folijarna primjena bila učinkovita u poticanju stope fotosinteze nakon oporavka od stresa (Frioni i sur. 2021, prema Andreotti i sur. 2022.).
- *A. nodosum* u nasadu naranče: u dozi  $5 \text{ mL L}^{-1}$  (0.5%), jednom tjedno, ukupno 12 aplikacija. Rezultati: povećan vegetativni rast i učinkovitost iskorištavanja vode (Spann i sur. 2010., prema Andreotti i sur. 2022.).

- *A. nodosum* u nasadu jabuke: u dozi 30 L/ha, ukupno 4 aplikacije tijekom vegetacije. Rezultati: smanjena alternativna rodnost, povećan sadržaj klorofila u lišću (~+12%) i fotosintetska aktivnost lišća (Spinelli i sur. 2009., prema Andreotti i sur. 2022.).
- Ekstrakt smeđih algi (*Sargassum*, *Laminaria*, *A. nodosum*) u nasadu jagode, u stakleničkim uvjetima: u dozi 33,3% (10 mL proizvoda u 20 mL vode iz slavine); jedna aplikacija, 1 tjedan nakon kloroze izazvane vapnom. Rezultati: povećano zakiseljavanje rizosfere s posljedičnim većim unosom iona željeza. Povećan vegetativni rast, sadržaj klorofila u listu, gustoća stomata, brzina fotosinteze i prinos (Spinelli i sur. 2010., prema Andreotti i sur. 2022.).

Silicij kao najčešći biostimulator na bazi kemijskih elemenata se aplikacijom u tlo učinkovitije primjenjuje nego folijarnom aplikacijom. Primjenom u tlo se koncentracija Si u biljnim tkivima povećava. Glavni razlog tome je taj što se Si apsorbira kao silicijeva kiselina u području korijena i nakon što uđe u ksilemske žile, transportira se do izdanaka i lišća putem transpiracijske struje (Andreotti i sur. 2022.). U istraživanjima provedenim u nasadima grožđa, jabuka, jagoda, manga, maline i borovnice, primjenjivala se najčešća formulacija silicija - kalijev silikat ( $K_2SiO_3$ ), koji je primijenjen na tlo sustavom fertirigacije ili izlivanjem otopine izravno u uzgojnu posudu.  $K_2SiO_3$  se aplicirao na tlo više puta tijekom vegetacije, sa koncentracijom Si koja se kretala između 0,5 i 19,4 mM. Pod različitim eksperimentalnim uvjetima, biljke tretirane  $K_2SiO_3$  općenito su pokazivale blaže simptome vodnog stresa ili stresa soli, vjerojatno zahvaljujući većoj metaboličkoj antioksidativnoj enzimskoj aktivnosti (Helaly i sur. 2017., prema Andreotti i sur. 2022.). Formulacije silicija mogu se putem fertirigacije/natapanja primijeniti u kombinaciji sa drugim hranivima, na primjer Zn, Fe i Mn. U uvjetima uzgoja na otvorenom, natapanje se provodi pri višim koncentracijama Si (178-280 mM Si) u usporedbi s folijarnim prskanjem (0,05 - 98,2 mM Si) (Valentinuzzi i sur. 2018.; Soppelsa i sur. 2019., prema Andreotti i sur. 2022.). U stakleničkim uvjetima, sa biljkama u posudama, Si je primijenjen na lišće ili fertirigacijom u niskim koncentracijama, u rasponu od 0,08 do 0,5 mM Si. Neovisno o metodi primjene, tretiranje Si je ponovljeno nekoliko puta tijekom sezone. Rezultati su pokazali da je Si inducirao veću čvrstoću plodova i, posljedično, dulji rok trajanja kvarljivog voća (stolno grožđe i malina) (Valentinuzzi i sur. 2018.; Zhang i sur. 2017., prema Andreotti i sur. 2022.). Također, uočeno je smanjenje učestalosti poremećaja (ozljeda, deformacija) nakon berbe u uskladištenom voću (na jabuci). Konačno, biljke tretirane silicijem često su bile produktivnije, neovisno o uvjetima uzgoja ili uzgajanim voćnim kulturama.

Hidrolizati proteina ili pojedinačne aminokiseline se u tlo primjenjuju natapanjem ili zalijevanjem. Za razliku od folijarne primjene, natapanje ili zalijevanje hidrolizatima proteina se vrši kada je cilj povećati otpornost uzgajane voćne vrste na abiotičke stresove (Andreotti i sur. 2022.). Isti autori daju pregled istraživanja prikladnosti primjene proteinskih hidrolizata putem

natapanja u slučajevima stresa soli i hladnoće. Tretiranje je kod japanske jabuke (kaki) provedeno svakih 6 - 8 dana tijekom srpnja i kolovoza (7 aplikacija) ili svibnja i rujna (24 aplikacije). Rezultati su pokazali smanjeni sadržaj klorida u lišću, nekroze lišća i vodnog potencijala stabljike (Jorda i sur. 2015., prema Andreotti i sur. 2022.). Tretiranje jagoda je provedeno svakih 14 - 30 dana od presađivanja u razdoblju veljača-svibanj (5 aplikacija). Rezultati su pokazali povećanu biomasu novonastalih korijena te ranije cvjetanje i formiranje plodova (Marfà i sur. 2008., prema Andreotti i sur. 2022.). Hidrolizati proteina biljnog porijekla (mješavina kukuruza, sirka i rogača) ispitivani su na vinovoj lozi putem fertirigacije, u omjeru 20 L ha<sup>-1</sup> u 8 doza, razrijeđenih 1:500 u vodenoj otopini. Rezultati su pokazali povećanu koncentraciju polifenola u moštu (+28%) i antocijana (+227%); poboljšanu crvenu boju mošta (više plavkasto-crvena boja) i stimuliranu sintezu petunidina, koja nije detektirana u kontroli (Parrado i sur. 2007., prema Andreotti i sur. 2022). Kod primjene ovih biostimulatora putem tla, ključno je poznavati osjetljivost uzgajane vrste na pojedini abiotički stres, mehanizam djelovanja aminokiselina ili proteina na fiziologiju biljaka, vrstu abiotičkog stresa i kritičan period, odnosno vrijeme tretiranja.

## **4. Mogućnosti i učinci primjene biostimulatora u uzgoju pojedinih voćnih vrsta**

Organsko voćarstvo se u gotovo svim klimatskim zonama i uzgojnim uvjetima susreće sa brojnim izazovima koji su posljedica klimatskih promjena, degradiranog tla, tržišnih trendova i raznih negativnih antropogenih utjecaja na okoliš. Bez obzira na izazove, poljoprivrednici i znanstvenici pronalaze rješenja za optimizaciju i unaprjeđenje produktivnosti, kao i za pronalazak novih rješenja u gnojidbi i tretiranju organskih nasada voća. U ovom poglavlju se daje pregled istraživanja biostimulatora na pojedine voćne vrste, odnosno na jabuke, masline, jagode, agrume, koštičavo voće i grožđe, koje ujedno predstavljaju i ekonomski značajne vrste u Republici Hrvatskoj.

### **4.1. Jabuke**

Organska proizvodnja jabuka u svijetu i EU predstavlja značajni udio u ukupnoj organskoj proizvodnji voća. U Republici Hrvatskoj, od ukupno 12.000 ha pod nasadima organskog voća, evidentirano je 580 ha jabuke (Ministarstvo poljoprivrede, 2020.). Kao i druge jezgričave voćne vrste, jabuka zahtjeva pravovremeno i detaljno praćenje pojave bolesti i štetnika, kao i zaštitu koja je u skladu sa propisima organske poljoprivrede. Istraživanja primjene i utjecaja biostimulatora na jabuke pokazala su pozitivno djelovanje raznih proizvoda na rast, prinos, otpornost i kvalitetu jabuke.

Istraživanje (Soppelsa i sur. 2018.) provedeno je u organskom nasadu jabuka, tijekom dvije godine, na sorti "Red Jonathan". Tretiranje biostimulatorima je počelo 40 dana nakon pune cvatnje, krajem svibnja i obavljano je u tjednim intervalima do kraja kolovoza (1 tjedan prije berbe), a sva tretiranja obavljena su s ukupnim volumenom od 1.500 L ha<sup>-1</sup>. Ispitivano je 10 različitih biostimulatora, uključujući huminske kiseline, ekstrakte makro i mirko morskih algi, hidrolizat proteina lucerne, aminokiseline same ili u kombinaciji s cinkom, vitamine B skupine, hitozan i komercijalni proizvod koji sadrži silicij. Tijekom i nakon tretiranja, ispitivan (Soppelsa i sur. 2018.) je vegetativni rast, izmjena plinova u listu, prinos i kvaliteta ploda i učestalost fizioloških poremećaja nakon skladištenja u hladnjači, a u rezultatima istraživanja su zabilježene sljedeće spoznaje:

- ekstrakt morskih makro algi (*A. nodosum*) uzrokovao je povećanje prosječne lisne površine za oko 20%
- proizvod na bazi cinka i makro algi uzrokovao je povećanje relativnog sadržaja klorofila u lišću
- primjena biostimulatora na bazi vitamina B grupe, hitozana i silicija rezultirala je većim stopama fotosinteze i transpiracije lišća u usporedbi s kontrolom
- u prvoj godini istraživanja plodovi po stablu bili su manje brojni, ali znatno veće mase, a konačni prinos po stablu se nije razlikovao između godina
- primjene biostimulansa bile su neučinkovite na vrijednosti prosječnog škroba u plodovima
- tretmani odabranim biostimulatorima imali su vidljiv i značajan učinak na konačni indeks boje ploda, neovisno o promatranj godini
- jabuke tretirane ekstraktom morskih algi (*A. nodosum*), hidrolizatom proteina lucerne i vitaminima B grupe pokazale su najintenzivniju crvenu boju ploda i vrijednosti indeksa boje koje su bile značajno više od kontrole. Među testiranim biostimulatorima, ekstrakt morskih algi je bio značajno učinkovit u povećanju postotka plodova koji imaju više od 75% prebojenosti
- Tretmani sa ekstraktom morskih makro algi (*A. nodosum*) i mikro algi (*Spirulina* spp.) i biostimulatorom na bazi aminokiselina i cinka značajno su povećali ukupni sadržaj fenola u kori ploda
- u jabukama tretiranim s hidrolizatom proteina lucerne, makro i mikro morskim algama, vitaminima B grupe i hitozanom konačna koncentracija antocijana bila je više nego dvostruko veća od one u kontroli
- tretmani sa ekstraktom makro algi i vitaminima B grupe značajno su povećali antioksidativni potencijal kože ploda u obje godine, dok su drugi biostimulatori poboljšali antioksidativni potencijal kože jabuke u samo jednoj godini
- biostimulatori na bazi hitozana i silicija pokazali su se najučinkovitijim biostimulatorima u poboljšanju antioksidativnog potencijala pulpe
- tretmani nisu utjecali na konačnu koncentraciju askorbinske kiseline u kori i pulpi jabuke, već je parametar ovisio o "godini", a ne tretmanu
- ekstrakt morskih makro i mikro algi, hitozan i silicij značajno su smanjili učestalost poremećaja "Jonathanove pjege" tijekom različitih faza hladnog skladištenja nakon berbe jabuka
- na kraju razdoblja skladištenja (4 mjeseca nakon berbe) jabuke tretirane cinkom su jedine pokazale značajno manju incidenciju fiziološkog poremećaja ploda, sa smanjenjem od približno 60% u usporedbi s kontrolom.

Istraživanje utjecaja biostimulatora na kvalitetu ploda jabuke pri berbi i nakon skladištenja (Soppelsa i sur. 2020.) bavi se problematikom nedostatka kalcija na razini voća, općenito kao uzrokom poremećaja nakon berbe jabuka. Najčešće rješenje za povećanje koncentracije Ca u jabukama je folijarnom primjenom Ca u obliku kalcijevog klorida, a u ovom istraživanju stabla jabuke u organskom nasadu su folijarno tretirana sa kalcijevim kloridom u kombinaciji s komercijalnim proizvodima biostimulatora, koji sadrže cink i silicij te ekstrakt morske alge. Rezultati, između ostalog, ukazuju na to da je: primjena morskih algi povećala broj plodova i konačni prinos stabala jabuke koja su sklona alternativnoj rodosti; biostimulator na bazi silicija značajno utjecao na povećanje broja plodova i prinosa po stablu, u usporedbi s pojedinačnim tretmanom kalcijevim kloridom; ekstrakt morskih algi je imao utjecaj na metabolizam biljnih hormona (uglavnom citokina i apscizinske kiseline), što dovodi do indukcije biosinteze antocijanina i nakupljanja u koži ploda prije berbe. Kombinirana primjena kalcijevog klorida s ekstraktom morske trave ili s proizvodom koji sadrži cink bila je učinkovita u smanjenju pojave fiziološkog poremećaja u uskladištenim jabukama, a veća koncentracija Ca, Zn i Mn koji se nalaze u zdravim plodovima jabuke u usporedbi s onima zaraženima, mogla bi predstavljati daljnji dokaz pozitivne uloge ovih elemenata u povećanju otpornosti voća na poremećaj skladištenja (Soppelsa i sur. 2020.).

Postoje brojna istraživanja na temu utjecaja mikrobnih biostimulatora na rast, razvoj, prinos i kvalitetu jabuke. U ovom poglavlju će se u tom kontekstu opisati istraživanje antagonizma bakterije *Pseudomonas Putida* i *Dematophora necatrix*, gljivičnog patogena jabuke. Navedena gljivica kod stabala jabuke izaziva tzv. bijelu trulež korijena te predstavlja ekonomski značajnu bolest koja može izazvati gubitke u proizvodnji. U istraživanju (Verma i sur. 2016.) je izolirano pet izolata *Pseudomonas sp.* iz rizosfere jabuka 4 različite sorte. Detaljno je proučena morfologija, fiziologija i biokemija bakterija, a ustanovljeno je da svi izolati proizvode siderofore, HCN, amonijak, litičke enzime i hormone koji potiču rast biljaka, odnosno auksine, gibereline i citokinine. U razvoju antagonizma, proizvodnja siderofora bakterija ima važnu ulogu i takve bakterije mogu djelovati kao bitni čimbenici u stresu povećavajući otpornost domaćina. Mikrobna proizvodnja HCN-a je važna antifungalna značajka za kontrolu gljivičnih patogena korijena. Proizvodnja auksina općenito pozitivno utječe na korijenski sustav, povećavajući veličinu i broj adventivnih korijena, omogućujući veću aktivnu površinu korijena, čime se biljci osiguravaju veće količine dostupnih hranjivih tvari. Rezultati ispitivanja inhibicije rasta micelija ispitivanih fitopatogenih gljiva pokazali su inhibiciju protiv dva gljivična patogena - *Dematophora necatrix* i *Phytophthora cactorum* (Verma i sur. 2016.). Sojevi korisnih bakterija, među koje spadaju i ispitivane *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas fluorescens*, su često izolirani iz tla i biljnog tkiva, istraživani i primjenjivani kao potencijalni agensi biokontrole fitopatogena. Može se reći da navedene korisne bakterije, osim drugih pozitivnih utjecaja na



biljku navedenih u poglavlju 2.5.2., imaju potencijal za razvoj kao ekološki prihvatljivo sredstvo za zaštitu bilja, odnosno kao biostimulator za primjenu u organskom voćarstvu.

## 4.2. Masline

Maslina (*Olea europaea* L.) je voćna kultura čija proizvodnja u RH i EU čini značajan udio u organskoj proizvodnji voća. Maslina je poznata kao otporna i prilagodljiva vrsta koja može dobro uspijevati na siromašnim mediteranskim tlima. Često su ekološki uvjeti u nasadima maslina ekstremni te se maslinari susreću sa problemima stresa suše i soli. Biostimulatori kao tvari i proizvodi pogodni za takve uvjete mogu predstavljati ekološki prihvatljivo rješenje za postizanje većeg prinosa i kvalitete organski uzgojenih maslina i maslinovog ulja.

Rezultati istraživanja (Nargesi i sur. 2022.) su pokazali da folijarna primjena organskih kiselina na stablima maslina može pozitivno utjecati na biokemijska svojstva maslina: tri sorte tretirane su sa biostimulatorima na bazi aminokiselina i organskih kiselina. Ispitivan je sadržaj ulja, proteina, klorofila, karotenoida, antocijanina, fenola te aktivnost antioksidativnih enzima. Rezultati djelovanja organskih kiselina otkrili su da su stabla tretirana argininom + huminskom kiselinom imala najveći sadržaj proteina ploda i ukupni klorofil, a ona tretirana huminskom kiselinom su imala najveći sadržaj antocijana i fenola. Isto tako, zaključeno je da utjecaj primijenjenih biostimulatora ovisi o ispitivanoj sorti.

Također, ekstrakt morskih algi primijenjen folijarno u dozi 6 ml/L, rezultirao je povećanjem površine lista, sadržaja klorofila u listovima, suha mase listova i sadržaja ugljikohidrata u listovima (Al-Hadethi i sur. 2019., prema Rana i sur. 2022.). Osim toga, istraživanje utjecaja polisaharida dobivenih iz morskih algi (ulvan, alginat i laminarin) na maslinama pokazalo je zanimljive rezultate kod kontrole verticilnog venuća masline uzrokovanog gljivičnim patogenom *Verticillium dahliae*: polisaharidi morskih algi su potaknuli fenolni metabolizam, a rezultati su pokazali i smanjenje simptoma venuća te se zaključuje da polisaharidi morskih algi mogu pomoći u prevladavanju venuća masline, i to jačanjem obrambenog metabolizma domaćina i ograničavanjem rasta patogena (Salah i sur. 2018.).

Mlade sadnice masline, posebno pojedine sorte, mogu biti osjetljive na gljivične infekcije korijena. Mikorizne gljive, kao biostimulatori se mogu primijeniti i u svrhu zaštite bilja. Mikorizne gljive su više kompetitivne od patogenih u pronalasku mjesta infekcije na površini korijena, odnosno zbog lake infekcije korijena, mikorizne gljive sprečavaju infekciju patogenih (Šeput 2017.). Nadalje, pri usporedbi dvaju kultivara maslina, koloniziranog i nekoloniziranog mikoriznim gljivama, autori (Khalil i El-Ansary 2020.) izvješćuju o pozitivnom učinku AM gljiva na

povećanje sadržaja klorofila u lišću, akumulaciju prolina, indeks rasta, ukupne ugljikohidrate i aktivnost katalaze. Osim toga, kolonizirana stabla masline pokazala su veći vodni potencijal lišća u usporedbi sa ne koloniziranim. Rahim i sur. (2020.) tvrde da što je veći postotak ekstrakta algi, veći su parametri produktivnosti i vegetativni rast te da se prskanje 0,1% ekstrakta alge tri puta, tj. prvo na početku rasta, drugo na cvatnji i treće nakon konačnog zretanja plodova, preporučuje za poboljšanje rasta, prinosa, kvalitete ploda i sadržaja ulja u uvjetima stresa soli.

### 4.3. Jagode

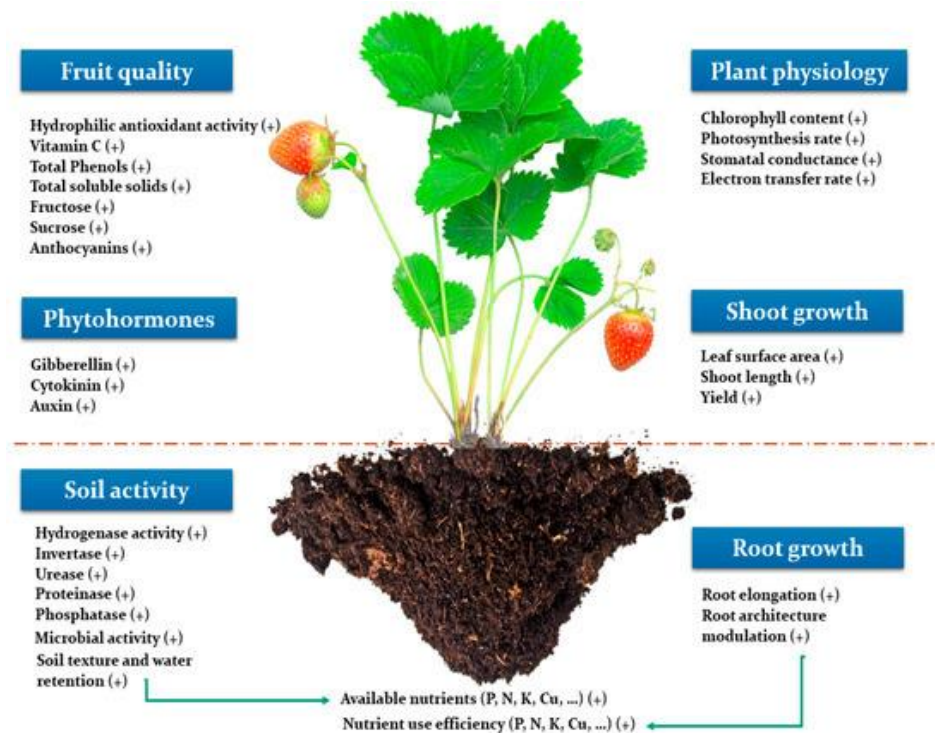
Jagode kao osjetljiva voćna vrsta dobro reagira na biostimulatore. Osim boljeg podnošenja abiotskog i biotskog stresa, zabilježena je i veća kvaliteta plodova. U preglednom radu (Rana i sur. 2022.) opisano je djelovanje raznih biostimulatora, primijenjenih u više istraživanja provedenih na jagodama. U radu su navedeni sljedeće tvrdnje:

- mikorizne gljive kod jagoda su utjecale na pojačanu sintezu sekundarnih metabolita. Tako je tretman sa *R. intraradices* utjecao na povećanje antocijanidina (cijanidin-3-glukozid) (Castellanos-Morales i sur. 2010., prema Rana i sur. 2022.)
- inokulacija korijena jagoda sa *Glomus spp.* i *Pseudomonas spp.* rezultirala poboljšanom sintezom dvaju glavnih oblika antocijanina u plodu jagode, pelargonidin malonil glukozida i pelargonidin 3-rutinosideina (Lingua i sur. 2013., prema Rana i sur. 2022.)
- huminska kiselina u kombinaciji sa ekstraktom morskih algi je tretirana folijarno i u tlo, u dozi od 400 mg/L i 1500 mg/L. Rezultati su pokazali povećanje prinosa i poboljšanje fizikalnih i kemijskih karakteristika (ukupne topljive krutine i titracijske kiselosti; količine vitamina C) (Alkharpotly i sur. 2017, prema Rana i sur. 2022.)
- hidrolizati proteina životinjskog porijekla (Animoflor) folijarno je primijenjen u dozi od 5 L/ha. Rezultati su pokazali povećanje sadržaja suhe tvari i nitrata u lišću te smanjenje mase mlade biljke razvijene vegetativnim putem (Lisiecka i sur. 2011, prema Rana i sur. 2022.)
- aminokiseline životinjskog porijekla aplicirane putem natapanja u dozi od 5, 1,0 i 1,5 g po biljci rezultirale su povećanjem otpornosti jagoda na oštećenja od mraza (Bogunović i sur. 2015., prema Rana i sur. 2022.)
- kombinirana aplikacija (na korijen + folijarno) bakterije *Bacillus licheniformis* kod jagoda je rezultirala povećanim rastom i prinomom te boljom kvalitetom plodova (Kumari i sur. 2018. prema Rana i sur. 2022.).

Slični podaci istih autora (Rana i sur. 2022.) daju pregled utjecaja biostimulatora na rast, razvoj i otpornost jagode u stresnim uvjetima:

- u uvjetima stresa hladnoće, tretiranje jagode folijarnim prskanjem i u tlo otopinom bora i biostimulirajućih bakterija (u dozi od 10% bora i 109 CFU/ml bakterije, 90 L/ha) rezultiralo je većim prinosom i većoj aktivnosti antioksidativnih enzima te smanjenim smržavanjem i posljedičnim ozljedama biljnih organa (Gunes i sur. 2016., prema Rana i sur. 2022.)
- u uvjetima stresa soli, umakanje korijena u suspenziju korisnih bakterija (*Bacillus subtilis* EY2, *Bacillus atrophaeus* EY6, *Bacillus sphaericus* GC) rezultiralo je smanjenjem sadržaja natrija i klora u lišću i korijenu te povećanjem relativnog sadržaja vode u lišću, kao i konačnog prinosa (Karlidag i sur. 2013, prema Rana i sur. 2022.)
- aplikacija arbuskularno vezikularnih gljiva (*Funneliformis caledonius*, *Funneliformis mosseae* i *Rhizophagus irregularis*) u tlo, u dozi od 50 do 100 gljivičnih propagula po biljci, u uvjetima stresa soli je povećala toleranciju jagoda na sol, kao i masu izdanaka i korijena (Sinclair i sur. 2014, prema Rana i sur. 2022.).

Istraživanje (Soppelsa i sur. 2019.) folijarne primjene biostimulatora na rast, prinos i kvalitetu jagoda u uvjetima ograničenih hraniva, ukazuje na pozitivne učinke ispitivanih biostimulatora. Autori su izvijestili da hidrolizat proteina lucerne utječe na nakupljanje biomase u korijenju i na površini lišća te na koncentraciju klorofila. Ističu da je način djelovanja proteinskih hidrolizata vjerojatno povezan s različitim biljnim fiziološkim mehanizmima, koji uključuju stimulaciju ključnih enzima uključenih u primarni i sekundarni metabolizam, hormonsku funkciju nekoliko komponenti proteinskog hidrolizata i neizravnu stimulaciju biološke aktivnosti mikroba. Nadalje, biostimulator na bazi vitamina B skupine poboljšao je performans rasta, dok su hitozan i proizvod Siliforce (Si + Zn) poboljšali podzemni i nadzemni biljni rast, fotosintetsku aktivnost i ukupni prinos jagoda. Isto tako, tretmani aminokiselinama i vitaminima B skupine doveli su do ranijeg sazrijevanja plodova jagoda, s višim sadržajem šećera, a hidrolizat proteina lucerne i ekstrakti morskih algi poboljšali su konačnu obojenost i koncentraciju fenola u plodu jagode pri berbi.



Slika 4.3.1.: Pozitivan učinak ekstrakata morskih algi na cijeli sustav tlo-biljka.

Izvor: El Boukhari i sur. 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9030359> - pristup: 15.08.2022.

Mattner i sur. (2018.) primijenili su komercijalni ekstrakt morske alge na bazi vrsta *Durvillaea potatorum* i *Ascophyllum nodosum* na jagodi u fazi rasta u rasadniku i u kasnijoj proizvodnji. Rezultati su pokazali povećanje gustoće i duljine korijena biljaka koje su tretirane, bez obzira na to je li tretman primijenjen u fazi proizvodnje ili u fazi rasta u rasadniku. Smatra se da je zabilježeno povećanje bilo u visokoj korelaciji s povećanjem konačnog prinosa. Posljedično, sugerirali su da bi ekstrakti morskih algi mogli biti uključeni u povećanje učinkovitosti iskorištavanja vode i hranjivih tvari, te da bi i druge komponente morskih algi, poput fitohormona, mogle biti uključene u tretmane. Pozitivni učinci ekstrakta morskih algi općenito obuhvaćaju poboljšanje kvalitete plodova, sadržaj biljnih fitohormona, povećanje enzimske aktivnosti tla, poboljšanje sustava korijenja i ukupnih fizioloških svojstava biljke (slika 4.3.1.).

#### 4.4. Agrumi

Voćne vrste koje pripadaju rodu *Citrus* (naranča, limun, mandarina, grejp, limeta itd.) najviše se uzgajaju na mediteranskim i južnijim područjima. Osim što su agroekološki uzgojni uvjeti na Mediteranu sami po sebi često ekstremni i nepovoljni, klimatske promjene i negativni antropogeni utjecaji dodatno otežavaju organsku proizvodnju agruma. Na prinos nasada

agruma nerijetko utječe stres suše, ekstremnih temperatura i soli - dolazi do poremećaja biokemijskih, metabolitskih, molekularnih i fizioloških procesa, što dovodi do usporavanja rasta i ekonomski značajnih gubitaka prinosa. Stoga se primjena biostimulatora kao ekološki prihvatljivih, dostupnih i raznovrsnih proizvoda smatra jednim od rješenja za unapređenje organskog uzgoja agruma.

Ekstrakt morske alge *Ascophyllum nodosum*, primijenjen folijarno ili natapanjem, pokazao se kao proizvod koji uspješno ublažava negativne učinke nedostatka vode kod mladih stabala naranče, podvrgnuta dvama različitim vodnim režimima (50% i 100% evapotranspiracije) (Spann i Little 2011., prema Basile i sur. 2020.). Stabla tretirana ekstraktom morske alge imala su veći vegetativni rast (duži izboji, veća lisna površina i veća suha masa izboja i lišća). Zabilježeno je i da mikrobnii biostimulatori temeljeni na arbuskularnim mikoriznim gljivama potiču otpornost agruma na stres suše. Rezultat takvog djelovanja AMF je promjena duljine, površine i volumena korijena nakon inokulacije, što dovodi do povećane apsorpcije vode. U uvjetima stresa suše, inokulacija AMF pokazala se pozitivnom i kod stabala *Poncirus trifoliata* (L.), omogućujući poboljšani rast i veći relativni sadržaj vode u lišću. Koncentracije osmotski aktivnih tvari, anorganskih ( $K^+$  i  $Ca^{2+}$ ) i organskih (saharoza, glukoza i fruktoza) tvari su više u lišću biljaka inokuliranih AMF-om tijekom stresa suše (Wu i sur. 2012., 2014., prema Basile i sur. 2020.).

Kada je riječ o stresu soli, primjena mikorize se također pokazala kao djelotvorna metoda. Basile i sur. (2020.) opisali su istraživanje (Wu i sur. 2010.) u kojem je tolerancija mandarine (*Citrus tangerine* Hort. ex Tanaka) na zaslanjenost tla poboljšana uslijed mikorizacije sadnica. Biljke inokulirane s *G. mossae* i *Pyrodictium occultum* pokazale su veći vegetativni rast (veća visina biljke, promjer stabljike i ukupna biomasa) i bolje stope fotosinteze, transpiracije i stomatalne vodljivosti u uvjetima stresa. U istraživanju (Rana i sur. 2022) su navede i sljedeće primjene i učinci biostimulatora na agrume:

- tretiranje limete huminskom kiselinom direktno u tlo (u dozi od 4.5 ml/L) rezultiralo je povećanjem mase svježih i suhih izdanka, suhe mase korijena i koncentracije kalija u izdancima (Jahromi i Hassanzadeh 2016., prema Rana i sur. 2022.)
- folijarno tretiranje gorke naranče ekstraktom morskih algi i citokininom (9 ml/L + CPPU 8 mg/L<sup>-1</sup>) rezultiralo je povećanjem visine sadnica, broja listova, površine listova i stope povećanja promjera stabljike (Ali i Al-Araji 2020.)
- slatka naranča Washington folijarno tretirana hitozanom (2 g/L) imala je veći postotak zametanja plodova i prinosa, veći sadržaj klorofila i poboljšana fizikalno-kemijska svojstva plodova (Mohamed i Ahmed 2019.)
- aplikacija AMF u tlo (*Glomus versiforme*), u dozi od 30 g inokuluma po posudi rezultirala je povećanjem vodnog potencijala lista, stope transpiracije, fotosintetske stope, puči,

vodljivosti, relativnog sadržaja vode i smanjenjem temperature lista (Wu i Xia 2006., prema Rana i sur. 2022).

Istraživanje utjecaja hitozana i giberelina na slatku naranču sorte "Washington" izvještava o zanimljivim rezultatima: maksimalne vrijednosti vitamina C su zabilježene pri tretmanu stabala hitozanom od 2 g/L u usporedbi s drugim tretmanima (hitozan pri 4 g/L, giberelinska kiselina) i kontrolom. Sadržaj vitamina C u plodovima bio je najveći nakon prskanja stabala hitozanom (2 g/L) dvaput tijekom sredina siječnja i travnja. Autori spominju i druga istraživanja koja su dala slične rezultate te zaključuju da folijarna primjena hitozana na stabla naranče utječu na povećanje prinosa, postotka zamatanja plodova, lisnih pigmenata, fizikalnih i kemijskih svojstava, dok primjena giberelina pozitivno utječe na vegetativni rast i odnos C/N u listu (Mohamed i Ahmed 2019.). Nadalje, autori (Ali i Araj 2020.) tvrde da je folijarni tretman limuna ekstraktom morskih algi rezultirao povećanjem broja listova i njihove površine. Takav rezultat pripisuju citokininu prisutnom u ekstraktu, koji potiče fiziološke aktivnosti biljke i povećava sadržaj klorofila u listovima, što pozitivno utječe na fotosintezu i sastav ugljikohidrata. Osim toga, navode da ekstrakti morskih algi mijenjaju hormonsku ravnotežu biljaka, čime utječu na biološke procese koji poboljšavaju metabolizam, čime se posljedično povećava i vegetativni rast biljke.

#### **4.5. Koštičavo voće**

Breskva, nektarina, marelica, šljiva, badem, trešnja i višnja zajedno se nazivaju koštičavim voćem. U RH su ove vrste često uzgajane, kako na kontinentalnom, tako i na mediteranskom obalnom području. Kao što je slučaj i kod drugih voćnih vrsta, organski uzgoj koštičavog voća često nailazi na probleme i izazove poput abiotskog i biotskog stresa, koji posljedično utječu na smanjeni prinos i ekonomske gubitke poljoprivrednika. Biostimulatori kao relativno nova tehnologija u poljoprivredi su se u pojedinim istraživanjima pokazali kao dobro rješenje navedenim problemima. Prema Rana i sur. (2022.), neki od zabilježenih rezultata istraživanja utjecaja biostimulatora na koštičavo voće su:

- biostimulatori na bazi hitozana i oligohitozana folijarno tretirani na stablu breskve (u dozi od 0.5 i 5.0 g/L) utjecali su na smanjenje gubitaka nakon berbe (odgađajući omekšavanje plodova) i na povećanje sinteze antioksidansa (Ma i sur. 2013., prema Rana i sur. 2022.)
- tretiranje trešnje hitozanom, metodom namakanja (2% otopina) rezultiralo je povećanjem čvrstoće plodova i smanjenjem ekspresije gena povezanih sa pektin metilesterazom (Xin i sur. 2020., prema Rana i sur. 2022.)

- korisne bakterije (*Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*) tretirane prskanjem lišća i cvijeća višnje utjecale su na povećanje duljine izdanaka i prinosa plodova (Arikan i Pirlak 2016., prema Rana i sur. 2022.)
- folijarno tretiranje breskve ekstraktom morskih algi (u dozi od 4 ml/L-1) utjecalo je na povećanje ukupne površine lišća, sadržaja klorofila u lišću, sadržaj ugljikohidrata, dušika i cinka u listu (Al-Rawi i sur. 2016., prema Rana i sur. 2022.).

Kada je riječ o učinkovitosti iskorištavanja hranjivih tvari, biostimulatori su se, prema izvještaju Basile i sur. (2020.), u više istraživanja pokazali kao pogodni i djelotvorni preparati. Zabilježeno je da primjena huminskih i fulvinskih kiselina u tlu značajno povećava koncentraciju cinka i željeza u lišću stabala trešnje (*Prunus avium* L.), što je važno posebno za uzgoj na vapnenastim terenima, gdje su vrste koštičavog voća često osjetljive na željeznu klorozu (Abay i Pirlak 2017., prema Basile i sur. 2020.). U istraživanju provedenom na stablima breskve, inokulacija korijena korisnim sojevima bakterija izazvala je značajno povećanje koncentracije aktivnog željeza u lišću, dok je drugo istraživanje folijarne primjene ekstrakta morske alge *A. nodosum* rezultiralo većim vegetativnim rastom stabala badema, uzgojenih u uvjetima nedostatka ili zadovoljavajuće dostupnosti kalija u tlu. Autori zaključuju da biostimulator na bazi ekstrakta navedene morske alge može značajno utjecati na povećanje unosa kalija u uvjetima deficita istog u tlu (Arikan i sur. 2018., prema Basile i sur. 2020.). Slično, inokulacija tla sa AMF vrste *G. fasciculatum* utjecala je na poboljšanje vegetativnog rasta, sadržaja klorofila i fenola u listu te sadržaja hraniva u sadnicama marelice (*Prunus armeniaca* L.) (Dutt i sur. 2013., prema Basile i sur. 2020.).

Autori (Vercammen i sur. 2008., prema Basile i sur. 2020.) su ispitali zanimljivu potencijalnu primjenu ekstrakta morskih algi, odnosno prikladnost ekstrakta za smanjenje učestalosti pucanja plodova trešnje, koje je uzrokovano oborinama. Istraživanje je provedeno na dva različita kultivara ('Kordia' i 'Sweetheart'), u dvije do tri folijarne primjene komercijalnog proizvoda koji sadrži ekstrakte morskih algi nedefiniranog sastava i porijekla. Tretman je obavljen 2 - 4 tjedna prije berbe, a rezultati su pokazali da je postotak raspuklih plodova smanjen do oko 10%.

Pregled istraživanja utjecaja biostimulatora na fiziologiju stabla i kvalitetu plodova trešnje (*Prunus Avium* L.) ukazuje na slične činjenice, što se grafički prikazano može vidjeti na slici 4.5.1. Autori (Afonso i sur. 2022.) navode sljedeća saznanja kod primjene:

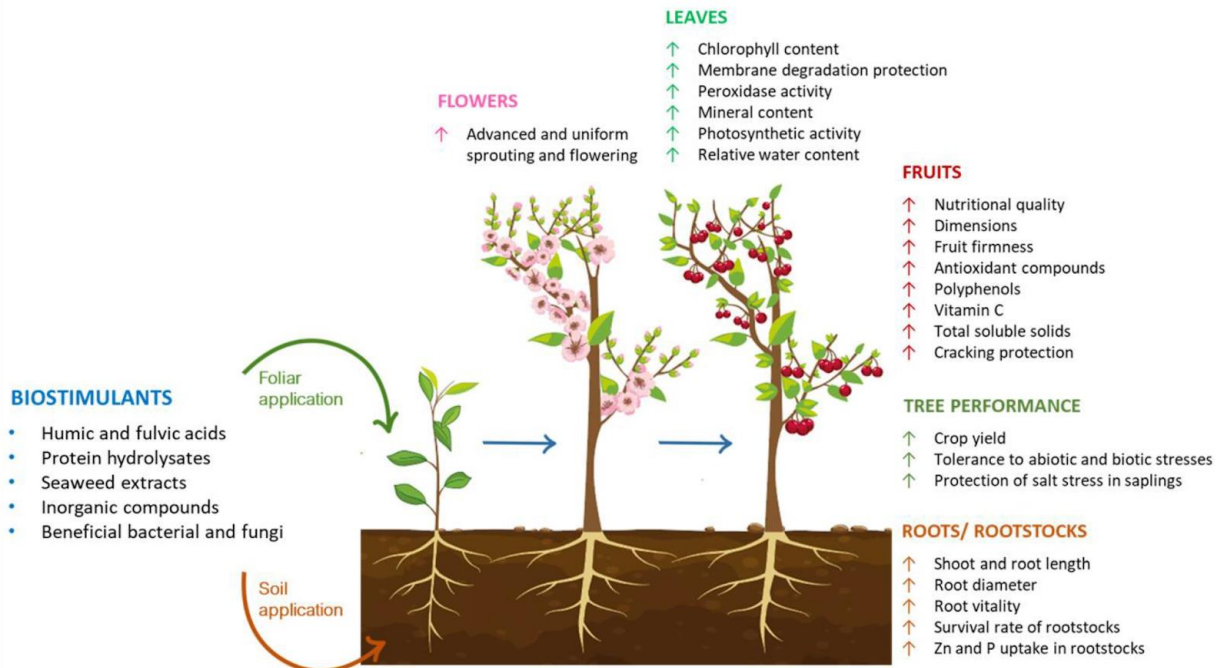
- a) Huminske i fulvinske kiseline: korištenje huminske kiseline u kombinaciji s ekstraktima sjemenki grožđa rezultiralo je smanjenjem pokazatelja stresa u lišću trešnje, odnosno smanjenjem razgradnje membrane i povećanjem aktivnosti

peroksidaze, kako bi se suzbio oksidativni stres. Primjena huminske kiseline na stablima trešnje rezultirala je i povećanjem sadržaja minerala (N, P, K, Ca) u lišću, čime se poboljšalo zdravstveno stanje tih biljaka. Također je dokazana upotreba huminske kiseline za ispravljanje željezne kloroze u lišću trešnje. Primjena fulvinskih kiselina rezultirala je povećanjem sadržaja suhe tvari i K u plodovima (Dumitru i sur. 2016.; Mayi i sur. 2015.; Demirer i sur. 2019, prema Afonso i sur. 2022.)

- b) Hidrolizati proteina: primjena glicin betaina rezultirala je većim plodovima, s povećanim sadržajem topivih suhih tvari, polifenola, vitamina C i antioksidativnog djelovanja, ali niže kiselosti. Isti tretman rezultirao je promjenama u vizualnom izgledu plodova, težini ploda, boji pri zrenju i sadržaja antocijana, ali je smanjila sadržaj karotenoida i askorbinske kiseline. Osim toga, uočena je smanjena učestalost pucanja plodova (Gonçalves i sur. 2020.; Correia i sur. 2019., prema Afonso i sur 2022.)
- c) Ekstrakti morskih algi: osim prije navedenog utjecaja na smanjeno pucanje plodova, autori spominju pozitivne učinke *A. nodosum* na lišće trešnje - smanjena oštećenja staničnih membrana, poboljšani status vode, povećani sadržaj topivih šećera, organskih kiselina i karotenoida, ali i veći proizvodni prinos. Povećan je i sadržaj bioaktivnih spojeva, odnosno polifenola i vitamina C, a primjena smeđe makroalge *Ecklonia maxima*, kao podloge za biostimulanse za primjenu u trešnji, rezultirala je povećanim zametanjem plodova i prinosom (Gonçalves i sur. 2020.; Correia i sur. 2019., prema Afonso i sur. 2022.)
- d) Hitozan i drugi biopolimeri: tretiranje trešnje biostimulatorima na bazi hitozana rezultiralo je odgodom sazrijevanja plodova i smanjenjem stope omekšavanja plodova. Osim kemijsko-fizikalnih promjena, hitozan ima i antifungalno djelovanje: kada se tretman obavljao prije berbe, hitozan je bio učinkovit u značajnom smanjenju indeksa infekcije nakon berbe plodova trešnje (Abdipour i sur. 2020.; Romanazzi i sur. 2001., prema Afonso i sur. 2022.)
- e) Anorganske tvari: kod trešanja je korištenjem kalijevog silikata povećana čvrstoća mesa ploda, dok je tretman fosfitom rezultirao poboljšanim unosom i asimilacijom hranjivih tvari, povećanom kvalitetom proizvoda i nutritivnom vrijednošću, otpornošću na abiotički stres i istovremenim poboljšanjem rasta korijena i prinosa (Kaiser i sur. 2014.; Gomez-Merino i sur. 2015., prema Afonso i sur. 2022.)
- f) Mikrobnji biostimulatori: dostupni podaci o korištenju bakterija u uzgoju trešnje također ističu pozitivne učinke: folijarna primjena *Pseudomonas* BA-8 i *Bacillus* OSU-142 u rezultirala je povećanim prinosom, većom težinom ploda i duljinom izboja, duljinom ploda, promjerom, masom sjemena i sadržajem topljive krute



tvari. Osim toga, mineralni sadržaj lišća je povećan i to za N, P, K, ali i Fe, Zn i Mn. Korištenje bakterijskih sojeva imalo je pozitivne učinke na smanjenje učinaka stresa soli u uzgoju sadnice trešnje, i to što se tiče rasta biljke, težine korijena, sadržaja klorofila, sadržaja vode u listu, fotosintetske aktivnosti, učinkovitosti korištenja vode i vitalnosti korijena (Esitken i sur. 2006.; Akca i sur. 2010.; Thakur i sur. 2017.; Arikani i sur. 2017.; Zhou i sur. 2015., prema Afonso i sur. 2022.)



Slika 4.5.1.: Shematski prikaz primjene biostimulansa na stablu trešnje.

Izvor: Afonso i sur. 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030659> - pristup: 17.08.2022.

Prema više istraživanja, utjecaj biostimulatora na koštičavo, a i drugo voće, u velikoj mjeri ovisi o klimatskim uvjetima i načinu tretmana. Pri pojavi nepovoljnih vremenskih uvjeta, posebno u kritičnim fenofazama (cvatnja, zametanje plodova), pozitivan učinak biostimulatora u dosta slučajeva nije zabilježen.

## 4.6. Grožđe

Kao što je slučaj kod drugih već spomenutih voćnih kultura, proizvodnja grožđa se također susreće sa problemima vezanim uz abiotski i biotski stres. Folijarna primjena ekstrakta morskih algi pokazala se još jednom kao proizvod koji u uvjetima suše ima biostimulirajuće i pozitivno

djelovanje na biljku. Prema Mancuso i sur. (2006.), bioaktivne tvari morskih algi dovode do poboljšanog razvoja korijena grožđa - ekstrakt je značajno poboljšao protok kalija i kalcija te je zabilježen bolji kapacitet nakupljanja makronutrijenata u biljnim organima. Osim toga autori navode da je ekstrakt morskih algi bio vrlo učinkovit u induciranju otpornosti na vodeni stres, održavanju višeg vodnog potencijala lišća i stomatalne vodljivosti tijekom razdoblja stresa, te poticanju brzog oporavka u rehidriranim biljkama. Folijarna primjena ekstrakta morskih algi se u proizvodnji grožđa pokazala djelotvorna u povećanju prinosa, poboljšanju fizikalnih i kemijskih svojstava bobica, odnosno sadržaja aminokiselina i vitamina, koji su posljedično poboljšali C/N omjer u biljci (Rana i sur. 2022.).

Nadalje, prema Rana i sur. (2022.) primjena hitozana je u grožđu utjecala na: poboljšanje sadržaja klorofila te ukorjenjivanje biljke i na reznice vinove loze, koje su nakon tretmana pokazale veću tolerantnost na visokotemperaturni stres i stres suše (Górník i sur. 2008., prema Rana i sur. 2022.). Autori navode da je kod hitozanom tretiranog lišća došlo do povećanja aktivnosti lipoksigenaze, koja može igrati vitalnu ulogu u stjecanju otpornosti (Trotel-Aziz i sur. 2006., prema Rana i sur. 2022.).

Antocijanini su važne komponente u kožici crvenog stolnog grožđa i pridonose izgledu bobica, što je ključna karakteristika kvalitete za kupce. Autori (Deng i sur. 2019) istražili su učinak biostimulatora na nakupljanje antocijana u bobicama grožđa. Ispitivani biostimulator sadržavao je vodu, ekstrakt cikle, kalij, ureu, ekstrakt morskih algi, glukozu, aminokiseline, natrijev hidroksid i limunsku kiselinu. Analize su pokazale da se nakon tretmana ukupni sadržaj antocijana povećao u grožđu - sadržaj antocijana porastao je za 1,16 puta i 1,4 puta. Analize ekspresije gena pokazale su da su gotovo svi geni uključeni u put biosinteze antocijanina pojačano regulirani nakon tretmana, a povećane su i aktivnosti fenilalanin amonija-liaze, kalkan izomeraze, UDP glukoze: flavonoid 3-o-glukozil transferaze i dihidroflavonol 4-reduktaze, ključnih enzima za biosintezu antocijana.

Folijarna primjena mješavine aminokiselina i ekstrakta morske alge *Ascophyllum nodosum* u različitim stadijima rasta ispitivana je na rastu i fizikalno-kemijskim karakteristikama grožđa sorte "Perlette". Vinova loza je prskana s 0,5 ml L-1 vodene otopine mješavine aminokiselina i ekstrakta morske alge u fazi cvatnje, fazi zamatanja plodova, fazama cvatnje i mjesec dana nakon faze zamatanja plodova. Kao kontrola su zadržani netretirani trsovi. Vinova loza tretirana višestrukim primjenama mješavine aminokiselina i ekstrakta morske alge pokazala je značajno veću veličinu lišća (41,5%), sadržaj klorofila, zamatanje bobica (6,66%), broj grozdova po trsu (6,66%), težinu bobice (14,78%), veličinu bobice (7,33%), pH soka (3%), ukupnih šećera (28%) i reducirajućih šećera (35%). Tretirana loza nije pokazala značajne promjene u sadržaju minerala u listu, veličini i težini grozda. Autori istraživanja (Khan i sur. 2012.) zaključili su da se višestruka

folijarna primjena mješavine aminokiselina i ekstrakta morske alge može učinkovito koristiti za poboljšanje rasta i fizikalno-kemijske kvalitete bobica vinove loze.

## 5. Pregled komercijalnih biostimulatora za primjenu u voćarstvu

Komercijalni proizvodi biostimulatora u velikoj mjeri variraju glede porijekla, načina proizvodnje, načina primjene, dostupnosti na tržištu i cijeni. Kod definiranja komercijalnih biostimulatora, često dolazi do miješanja sa pojmovima kao što su bioproizvodi i biopreparati. Ne postoje točne općeprihvaćene definicije navedenih pojmova, što otežava stvaranje predodžbe o jasnim razlikama. Bioproizvodi se najjednostavnije opisuju kao materijali, kemikalije i energija dobiveni iz obnovljivih bioloških izvora, dok se biopreparati opisuju kao tvari dobivene iz živih organizama te njihovi metaboliti (Singh i sur. 2003., prema Pylak i sur. 2019.). Navedeni pojmovi i njihove definicije imaju zajedničkih elemenata sa biostimulatorima, ali osnovna razlika je ta što se biostimulatori smatraju proizvodima namijenjenim konkretno za upotrebu u poljoprivredi, dok se bioproizvodi i biopreparati mogu koristiti i u druge svrhe. Svi proizvodi prije stavljanja na tržište dobivaju potrebna odobrenja i certifikate, kao što su GMP certifikat, koji odobrava Agencija za hranu i lijekove (FDA) u SAD-u, zatim HACCP (Hazard Analysis & Critical Control Points), a mogu sadržavati i HALAL i druge dodatne certifikate.

Tvrtke koje se bave distribucijom ili prodajom raznih proizvoda za prehrambene i industrijske svrhe nerijetko se nalaze u blizini drugih prerađivačkih tvrtki, čije nusproizvode koriste za proizvodnju biostimulatora. Takav primjer su tvrtke za proizvodnju hitozana, proteina i aminokiselina životinjskog porijekla. Hitozan se dobiva od elemenata hitinskog egzoskeleta člankonožaca (jastoga, rakova itd.) i morskog otpada. Neki od proizvođača hitozana su "Poli-Farm" tvrtka, sa proizvodom "BIOCHIKOL" te proizvodi tvrtke "Chitosanlab", "Ez-gro" i "KitoGreen". Chitosanlab je, primjerice, tvrtka posvećena tržištu hitina, hitozana i njihovih derivata na globalnom tržištu. Sjedište je u Kini i Tajlandu, gdje se navedeni biopolimeri ekstrahiraju iz ljuštura rakova, lignji i gljiva, a potom se dalje koriste u proizvodnji farmaceutskih proizvoda, hitozana za biostimulatore (slika 5.1.) i glukozamina.



Slika 5.1.: Biostimulator na bazi hitozana.

Izvor: Chitosanlab, 2022. <https://chitosanlab.com/en/> - pristup 25.08.2022.

Proizvodi koji sadrže korisne mikroorganizme, prije dolaska na tržište prolaze kompleksan proces proizvodnje. Razvoj mikrobnih inokulanata nije striktno definiran, ali općenito uključuje sljedeće korake: izolaciju bakterija iz korijena ili drugih biljnih tkiva; laboratorijsku i kontroliranu provjeru okoline rasta; pregled na terenu za niz usjeva, geografskih lokacija, datume sadnje i vrste tla; procjenu mogućih kombinacija sojeva; razmatranje praksi upravljanja (npr. agrokemijska uporaba i plodored); usavršavanje proizvoda; pokusi koji potvrđuju nepostojanje ekotoksikoloških učinaka; formulacija za isporuku proizvoda – npr. treset, granulati, tekući ili mokri prah; registracija i regulatorno odobrenje proizvoda; plasiranje proizvoda na tržište (Backer i sur. 2018.). Primjer komercijalnog biostimulatora na bazi mikroba je "Trianum-P" (Koppert B.V., Nizozemska). Proizvod sadrži *Trichoderma harzianum* Rifai, soj T-22. Dolazi u obliku granula koje su topivi u vodi. Ovaj biostimulator sadrži 10<sup>9</sup> CFU spore *T. harzianum* g-1 proizvoda, koje su sposobne klijati i rasti u različitim tlima i različitim pH vrijednostima (4–8,5) (Andreotti i sur. 2022.). Ova vrsta *Trichoderma* poznata je po svojim sposobnostima proizvodnje antibiotičkih tvari, jačanju rasta korijena i stimuliranju obrambenih sustava biljaka, a slični preparati na bazi *T. harzianum* komercijalno su dostupni kao fungicidi u Češkoj (Supresivit), SAD-u (T-Gro), Australiji (Rootshield WP) i Novom Zelandu (Trichodex) (Woo i sur. 2014., prema Andreotti i sur. 2022.).

Biostimulatori na bazi huminskih i fulvinskih kiselina te drugih humusnih tvari se sastoje od mnogih korisnih organizama poput bakterija ili gljivica te organske tvari nastale tijekom procesa humifikacije. Zbog svojih svojstava (aktivni mikroorganizmi i složeni kemijski spojevi) često se prodaje kao tekućina pripremljena za razrjeđivanje. Pretežno se primjenjuju u razrijeđenom stanju, izravno u tlo u blizini korijena biljaka. Neki komercijalni biostimulatori koji se koriste na ovaj način su: Humus UP (Ekodarpol, Poljska), Wspomag (BIOHUMUSECO, Poljska), HUMVITEKO UNIWERSALNY (BIOHUMUSECO, Poljska), TOTALHUMUS (THE, Poljska), BIO-HUMUS EKSTRAKT "RASKILA" (LLC EKO ZEME, Latvija) (Andreotti i sur. 2022.).

Globalna proizvodnja ili sakupljanje morskih algi je u posljednjem desetljeću zabilježila veliki porast. Razlog tome su nova saznanja o mogućnostima upotrebe algi ne samo u poljoprivrednoj, već u prehrambenoj, farmaceutskoj, tekstilnoj, energetske i dr. industriji. Pojedine tvrtke se bave visokotehnološkom proizvodnjom algi u specijaliziranim pogonima, dok manje tvrtke sakupljaju i prerađuju alge iz mora. Većina ekstrakata morskih algi potječe iz *Ascophyllum nodosum*, *Fucus* spp., *Laminaria* spp., *Sargassum* spp. i *Turbinaria* spp.

"Algaenergy" je primjer tvrtke koja se bavi visokotehnološkom proizvodnjom algi za poljoprivredne i druge svrhe. Sa proizvodnjom biostimulatora na bazi morskih algi započeli su prvi u svijetu, 2009. godine, a AgriAlgae® zaštitni je znak tvrtke pod kojom prodaje svoj asortiman poljoprivrednih biostimulatora na bazi mikroalgi u Europi. Postoji nekoliko faza u proizvodnim protokolima: početak cijelog procesa odvija se u laboratoriju, gdje se sojevi i inokulum stvaraju i održavaju u malim količinama. Cilj je stvaranje mladih stanica iz sojeva koji su odabrani ovisno o primjeni. Cilj je imati visokokvalitetne količine kulture, s optimalnom gustoćom stanica i dovoljnim volumenom za pokretanje kultura na industrijskoj razini. Sljedeći korak je intenzivan razvoj kontrolirane kulture mikroalgi koji se razvija u fotobioreaktorima, sustavima koji dopuštaju prolaz svjetlosti tako da može doći do fotosinteze. U protokolima se kontroliraju svi kritični parametre, kao što su pH, temperatura, hranjive tvari, otopljeni kisik, i CO<sub>2</sub>. Posljednji korak je sakupljanje stvorene biomase mikroalgi. Nakon što je usjev spreman, dio se koncentrira, stanice mikroalgi se uklanjaju, a voda i hranjive tvari se vraćaju u sustav. S obzirom na visoku produktivnost mikroalgi, žetva se može obavljati i svakodnevno. Rezultirajuća biomasa se stabilizira i može se podvrgnuti daljnjim procesima za proizvodnju konačnog proizvoda, ovisno o sektoru. Proizvedeni biostimulatori ove tvrtke dostupni su u cijeloj Europi, Americi, Africi i Aziji. Tvrtka surađuje sa Europskim vijećem Industrije Biostimulatora (EBIC) te često sudjeluje na konferencijama i sastancima vezanim za inovacije u održivoj poljoprivredi te je nagrađena sa mnogim nagradama, uključujući i nagradu "Best Biostimulant Product in BioAg Asia" (AlgaEnergy, 2022). AgriAlgae® biostimulatori (slika 5.2.) su pogodni za primjenu u organskom voćarstvu te se mogu primjenjivati folijarno i u tlo. Proizvodi su certificirani od strane ovlaštenog subjekta CAAE (španjolsko certifikacijsko tijelo za organsku poljoprivredu) za

korištenje u organskim usjevima prema europskim standardima. Proizvod AgriAlgae® Organic Original sadrži 4,1% slobodnih L-aminokiselina (41 g/l), fitohormone, vitamine, minerale, pigmente, peptide, višestruko nezasićene masne kiseline i polisaharide.



Slika 5.2.: Biostimulatori na bazi mikroalgi za upotrebu u poljoprivredi.

Izvor: AlgaEnergy, 2022. <https://www.algaenergy.com/> - pristup 25.08.2022.

Tvrtka “Algea” već 80 godina sakuplja i prerađuje alge *Ascophyllum nodosum* za izradu ekstrakata morskih algi za upotrebu u poljoprivredi. Berba se obavlja u Norveškoj, u arktičkom moru, u jednom od najčišćih i nezagađenih staništa na svijetu. Tvrtka ima 3 glavna tvornička centra u Norveškoj, distributere u Italiji, Španjolskoj, Francuskoj, Tajlandu i Tajvanu, a proizvodi su dostupni na cijelom svijetu. Proizvodi ove tvrtke posjeduju certifikate OMRI (Organic Material Review Institute), ECOCERT (European organic certification) i DEBIO (Norwegian organic certification). Europska tvrtka “Jisa” koja se bavi distribucijom više biostimulatora (ekstrakt morskih algi, aminokiseline, mikrobn biostimulatori, humusne tvari i korisni kemijski elementi) surađuje sa međunarodno prepoznatima brendovima i proizvođačima biostimulatora: FULVIN®, ASCOFILLUM®, HUMILIG®, JISAQUEL®, LIBAMIN®, JISAMAR®, TARSSAN®,

CRISTALJISA®, GLYBET®, ENGORMAX®, JISAFOL®, NUTRIOLIVO®, TOP-K®, FURDOS®, VEGETAMIN®, ALGADUL®, KITASAL®, CUAJEMAX®, CUPRO-ACTIV®, MOLEX® i RAICI®.

Proizvodi biostimulatora se često proizvode u kombiniranim formulacijama te se na tržištu mogu pronaći komercijalni proizvodi koji sadrže npr. aminokiseline zajedno sa humusnim tvarima ili mikrobnim biostimulatorima, kombinaciju ekstrakta morskih algi i humusnih tvari i sl. U tablici 5.1. navedeni su neki od biostimulatora na bazi aminokiselina koji su dostupni u Hrvatskoj, zajedno sa preporučenim dozama primjene.

Tablica 5.1. Doze primjene pojedinih biostimulatora dostupnih na tržištu Hrvatske

<b>Trgovački naziv biostimulatora</b>	<b>Koncentracija slobodnih aminokiselina</b>	<b>Doza primjene</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>DELPHAN PLUS</b>	24% slobodnih aminokiselina	1,0 L ha <sup>-1</sup>	Tradecorp, Španjolska
<b>DRIN</b>	15% slobodnih aminokiselina	1,2 – 2,0 L ha <sup>-1</sup>	GreenHass, Italija
<b>ALBAMIN</b>	-	2,0 – 3,0 L ha <sup>-1</sup>	Alba Milagro, Italija
<b>ISABION</b>	10,3% slobodnih aminokiselina	2,0 – 3,0 L ha <sup>-1</sup>	Syngenta, Švicarska
<b>POLYAMIN</b>	-	1,5 – 2,5 L ha <sup>-1</sup>	Haifa, Izrael

Izvor: Glasnik zaštite bilja, 2005, 28 (1), prema Gluhić, 2020. <https://doi.org/10.31727/gzb.43.3.5> - pristup: 25.08.2022.



## 6. Pravni okvir biostimulatora

Biostimulatori se smatraju relativno novom kategorijom poljoprivrednih proizvoda, zbog čega se još uvijek usavršava pravna regulacija i zakonodavstvo. Godine 2014. izdan je Pravni okvir za biljne biostimulatore i aditive poljoprivrednim gnojivima u EU, u obliku Izvješća za Europsku Komisiju, od strane Uprave za poduzetništvo i industriju. Izvješće je pisano kao doprinos prijedlogu Komisije za pravni okvir EU za stavljanje na tržište biljnih biostimulatora i aditiva za poljoprivredna gnojiva, a ciljevi Izvješća bili su analizirati postojeće regulatorne sustave za biljne biostimulatore i aditive gnojivima u EU, državama članicama i trećim zemljama te razviti prijedlog za najprikladniji regulatorni okvir koji bi se trebao uspostaviti u kontekstu revidirane Uredbe o gnojivima. Odnosno, cilj je bio razraditi relevantne zahtjeve za podacima i upravljanje postupkom registracije za biostimulatore i aditive (Traon i sur. 2014.).

U drugom odjeljku Izvješća opisan je opći pregled politike biostimulatora i aditiva, gdje se raspravlja o tadašnjim nacionalnim i međunarodnim regulativama za druge proizvode slične biostimulatorima i aditivima te se opisuje postojeći EU regulatorni okvir za sigurnost hrane i kemikalija. Biostimulatori se u tom odjeljku definiraju kao “materijali koji sadrže tvar(i) i/ili mikroorganizme čija je funkcija, kada se primijene na biljke ili u rizosferu, stimulirati prirodne procese za poboljšanje unosa hranjivih tvari, učinkovitosti hranjivih tvari, tolerancije na abiotički stres i/ili kvalitete usjeva, neovisno o sadržaju hranjivih tvari” (Traon i sur. 2014.). Dalje se navodi kako je cilj donošenja zakona koji će regulirati stavljanje biostimulatora (i aditiva) na tržište, odnosno isporuku proizvoda za distribuciju, potrošnju ili uporabu na tržištu. U izvješću se spominju i provedena istraživanja vezana za tržište biostimulatora - većina studija je zaključila da tržište biljnih biostimulatora ubrzano raste, što je potaknuto raznim gospodarskim i društveno-političkim čimbenicima. Nakon analize tržišta, usporedbe biostimulatora sa drugim sličnim poljoprivrednim proizvodima i analize dotadašnjih pravnih okvira, u trećem odjeljku Izvješća se navode zahtjevi za podacima za buduće zakone koji se odnose na stavljanje biostimulatora na tržište i taj odjeljak predstavlja regulatorni postupak koji je potrebno primijeniti. Detaljno su opisani procesi aplikacije proizvođača, analize proizvoda, definicije i dozvoljene doze sastavnih tvari i kontaminanata, procesi odobrenja i registracije, postupci nakon registracije i troškovi provedbe (Traon i sur. 2014.). Navedeno Izvješće je jedan od opširnijih i detaljnijih dokumenata o pravnom okviru biostimulatora.

Nakon 2014. godine, o biostimulatorima se još raspravljalo u svrhu pravnog uređenja istih i svrstavanja u posebnu kategoriju koja ne podrazumijeva gnojiva, biopesticide, aditive i sl. proizvode. Statistika poljoprivrednih inputa i outputa (SAIO), na proljeće 2022. godine izvijestila je o tvrdnjama Europskog konzorcija industrije organskih gnojiva (ECOFI) i Europskog vijeća industrije biostimulatora (EBIC): statistike o svim gnojivima i sličnim proizvodima trebaju biti

uključene u novi europski sustav poljoprivredne statistike (EASS) u skladu sa kategorijama proizvoda Uredbe EU o gnojidbenim proizvodima. Naime, Europska komisija je u okviru Green Deal predložila novu Uredbu o statistici poljoprivrednih inputa i outputa, namijenjenu integraciji podataka o poljoprivrednoj proizvodnji (uključujući organsku poljoprivredu), poljoprivrednim cijenama, sredstvima za zaštitu bilja i hranjivim tvarima. EBIC i ECOFI su tražili da statistika pokriva sve „proizvode za gnojidbu“, a ne samo anorganska i organska gnojiva te da se EU-ov sustav ekonomske i carinske statistike (NACE) ažurira kako bi obuhvatio sve proizvode (uključujući i biostimulatore) i da statistika prati gnojiva odobrena za organsku poljoprivredu. Ukratko, EBIC i ECOFI pozvali su na uključivanje podataka o svim proizvodima u Uredbu o statistici poljoprivrednih inputa i outputa (SAIO) u skladu s ciljevima europskog Zelenog plana. Europski parlament i Vijeće su na proljeće 2022. raspravljali o predloženoj Uredbi (European Sustainable Phosphorus Platform 2022.).

Slijedom svega navedenog, EBIC je također izvještavao da biostimulatori moraju biti u skladu s novom Uredbom o gnojidbenim proizvodima (FPR) prije nego što se mogu uopće staviti na unutarnje tržište EU-a te se provode radnje kako bi se uz ostale, i mikrobn biostimulatori, fosfiti i biostimulatori na bazi životinjskih nusproizvoda obuhvatili FPR-om. Konačno, 16. srpnja 2022. godine izvijestili su da FPR od tog dana sve biostimulatore formalno priznaje zakonom te da se u Uredbi pojavljuju kao zasebna kategorija, što je omogućilo pristup jedinstvenom tržištu biostimulatora. Prehrambene tvrtke i poljoprivrednici u Europi tako danas imaju korist od takvog dodavanja biostimulatora u zakonodavstvo EU-a, što biostimulatore čini dostupnim diljem Europe.

## 7. Zaključak

Organska proizvodnja voća se, kao i drugi sektori poljoprivrede, suočava sa posljedicama klimatskih promjena i antropogenih djelatnosti, što se posebno odnosi na čestu i nepredvidljivu pojavu abiotskog i biotskog stresa. Suša, zaslanjenost tla, nedostupnost nutrijenata u tlu, degradacija tla, introdukcija rezistentnih štetnika i temperaturni stres samo su neki od problema s kojim se suočavaju voćari i koji uzrokuju velike gubitke prinosa i kvalitete u voćarskoj proizvodnji. Organsko voćarstvo, sljedeći propise i pravila organske poljoprivrede, ograničeno je glede poljoprivrednih inputa i borbe protiv navedenih problema. Stoga primjena pripravaka kao što su biostimulatori može predstavljati ključno sredstvo za unaprjeđenje proizvodnje. Iako su se neki biostimulativni pripravci koristili u poljoprivredi još prije razvoja sintetskih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja, u posljednjih 10 godina razvoj biostimulatora kao poljoprivrednih preparata se unaprijedio te tako postao nova i obećavajuća tehnologija u organskoj poljoprivredi. Brojna istraživanja ustanovila su da biostimulatori predstavljaju alat kojim se može poboljšati učinkovitost proizvodnje, kvaliteta i sigurnost proizvoda. Tretiranje voćnih kultura sa huminskim i fulvinskim kiselinama, hidrolizatima proteina, aminokiselinama, hitozanom, korisnim kemijskim elementima, ekstraktom morskih algi i mikrobnim biostimulatorima može značajno povećati učinkovitost korištenja drugih agronomskih inputa, poput vode za navodnjavanje ili gnojiva. Osim toga, kao najveća dobrobit primjene biostimulatora navodi se promicanje otpornosti nasada na različiti abiotski stres i poboljšanje konačne kvalitete proizvoda. Mehanizmi djelovanja većine biostimulatora su jasni i opisani, dok neki tek trebaju postati. Mnogi preparati sadrže visoke koncentracije organskih tvari poput enzima, proteina, vitamina, biljnih hormona, ugljikohidrata, pigmenta, fenolnih spojeva i antimikrobnih spojeva, koji na uzgajane voćke djeluje izravno, poboljšavajući mehanizme prirodne obrambene reakcije, biljni metabolizam, regulaciju gena, rast i prinose, te neizravno u tlu, stvarajući organske kiseline, poboljšavajući mikrobnu aktivnost i količinu organske tvari, što posljedično utječe na smanjenje posljedica nepovoljnih uvjeta i povećanje otpornosti biljke. Primjena biostimulatora posebno se pokazala učinkovitom i poželjnom u uzgoju kultura koje su često izložene temperaturnom stresu, stresu suše i soli.

Općenito, potencijal biostimulatora je prepoznat u sektoru organskog voćarstva, ali zahtijevaju se dodatna istraživanja učinkovitosti primjene u uvjetima sustava uzgoja na otvorenom, u specifičnim agroekološkim uvjetima te u višegodišnjem uzgoju. Isto tako, u svrhu unaprjeđenja i populariziranja biostimulatora, potrebno je provesti istraživanja u vezi utjecaja biostimulatora na pojedine vrste i sorte koje nisu dosada istraživane te u vezi optimalnog roka primjene. Uz dostupna saznanja svakako se može zaključiti da biostimulatori predstavljaju ekološki prihvatljiv potencijal za integraciju u upravljanju modernim organskim voćnjacima, povećavajući održivost proizvodnje i učinkovitost u korištenju resursa.

## 8. Popis literature

1. Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., Meftah, Kadmiri I. (2021). Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability. *Front. Microbiol.* 12:628379.
2. Afonso, S., Oliveira, I., Meyer, A.S., Gonçalves, B. (2022). Biostimulants to Improved Tree Physiology and Fruit Quality: A Review with Special Focus on Sweet Cherry. *Agronomy.* 12, 659.
3. Aghaeifard, F., Babalar, M., Fallahi, E., Ahmadi A. (2016) Influence of humic acid and salicylic acid on yield, fruit quality, and leaf mineral elements of strawberry (*Fragaria × Ananassa* duch.) cv. Camarosa, *Journal of Plant Nutrition.* 39:13, 1821-1829.
4. Ali, O., Ramsubhag, A., Jayaraman, J. (2021). Biostimulant Properties of Seaweed Extracts in Plants: Implications towards Sustainable Crop Production. *Plants.* 10, 531.
5. Ali, T.J.M., Araji, A.L. (2021). Effect of seaweed extract and cytokinin (cpgu) spraying on growth of lemon (*Citrus limon* L.) Seedling budded on sour orange. *Plant Archiv.* 20:1099–104.
6. Aminifard, M.H., Aroiee, H., Nemati, H., Azizi, M., Jaafar, H.Z.E. (2012). Fulvic acid affects pepper antioxidant activity and fruit quality. *Afr J Biotechnol* 11:13179–13185.
7. Andre, F.C., Takaaki, I. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungal spores host bacteria that nutrient biodynamics and biocontrol of soil-borne plant pathogens, *Biology Open* 2012 1: 52-57.
8. Andreotti, C., Roupael, Y., Colla, G., Basile, B. (2022). Rate and Timing of Application of Biostimulant Substances to Enhance Fruit Tree Tolerance toward Environmental Stresses and Fruit Quality. *Agronomy.* 12, 603.
9. Antoun, H., Prévost, D. (2006). Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (eds) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* Springer, Dordrecht. 10.1007/1-4020-4152-7\_1.
10. Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a Mini-Review of the Little-Known Plant Growth-Promoting Properties of Bt. *Curr Microbiol* 76, 1379–1385.
11. Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1473.
12. Basile, B., Roupael, Y., Colla, G., Soppelsa, S., Andreotti, C. (2020). Appraisal of emerging crop management opportunities in fruit trees, grapevines and berry crops facilitated by the application of biostimulants. *Scientia Horticulturae*, 267, 109330.

13. Barbara, R.L.L., García, A.C. (2014). Humic substances and plant defense metabolism. In: Ahmad, P., Wani, M.R. (eds) *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: volume 1*. Springer Science+Business Media, New York, pp 297–319.
14. Bocanegra, M.P., Lobartini, J.C., Orioli, G.A. (2006). Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights. *Commun Soil Sci Plant Anal* 37:1–2.
15. Buechel T., Bloodnick E. (2016.): *Mycorrhizae: Description of Types, Benefits and Uses*. Great American Meda Services & Greenhouse Product News. <https://gpnmag.com/article/mycorrhizae-description-of-types-benefits-and-uses/> - pristup 15.06.2022.
16. Bugarčić, S. (2015). Tlo i mikorizne gljive. Dostupno na: <http://www.zdravasrbija.com/lat/Zemlja/Povrtarstvo/2041-Tlo-i-mikorizne-gljive.php> - pristup 16.06.2022.
17. Calvo, P., Nelson, L. & Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*. 383, 3–41.
18. Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P., Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture, *Scientia Horticulturae*, Volume 196.
19. Casadesús, A., Polo, J., Munné-Bosch, S. (2019). Hormonal Effects of an Enzymatically Hydrolyzed Animal Protein-Based Biostimulant (Pepton) in Water-Stressed Tomato Plants. *Front. Plant Sci.* 10:758.
20. Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M.C., Rouphael, Y. (2018). Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Front. Plant Sci.* 9:1782.
21. Cimprić, A. (2017). 'Značaj mikoriznih asocijacija u voćarskoj proizvodnji', Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, citirano: 17.06.2022., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:547879>
22. Čolić, S. (2013). Nevjerojatno otkriće – biljni svijet komunicira preko vlastite podzemne mreže. Dostupno na: <https://alternativa-zavas.com/index.php/clanak/article/mikoriza> - pristup 16.06.2022.
23. Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., Rouphael, Y. (2017). Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Front. Plant Sci.* 8:2202.
24. Deng, Q., Xia, H., Lin, L., Jin, W., Lu, Y., Kangning, L., Jinrong, Z., Xiulan, L., Dong, L. (2019). SUNRED, a natural extract-based biostimulant, application stimulates anthocyanin production in the skins of grapes. *Sci Rep* 9, 2590.

25. Draguzet, A. (2015). Mikoriza od pustinja stvara plodne oaze. Dostupno na: <http://www.agroklub.com/sumarstvo/mikoriza-od-pustinja-stvara-plodne-oaze/16472/> - pristup 16.06.2022.
26. El Boukhari, M.E.M., Barakate, M., Bouhia, Y., Lyamlouli, K. (2020). Trends in Seaweed Extract Based Biostimulants: Manufacturing Process and Beneficial Effect on Soil-Plant Systems. *Plants*. 9, 359.
27. Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J Plant Nutri Soil Sci*. 172:237–244.
28. Gluhic, D. (2014). Važnost silicija (Si) u gnojidbi poljoprivrednih kultura. *Glasnik Zaštite Bilja*. 37 (6), 26-30.
29. Gluhic, D. (2017). Humusne tvari i primjena huminske kiseline u poljoprivredi. *Glasnik zaštite bilja*. 40. 64-72. 10.31727/gzb.40.3.7.
30. Gluhic, D. (2020). Primjena biostimulatora na bazi aminokiselina u poljoprivrednoj proizvodnji. *Glasnik Zaštite Bilja*, 43. (3.), 38-46.
31. Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation, *Sci. Hortic*. 196, 3-14.
32. Jurčić, B. (2019). Učinak biostimulatora rasta na morfološke pokazatelje i kemijski sastav koprive. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, citirano: 15.03.2022., <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:645393>
33. Kauffman, G. L. III., Kneivel, D. P., Watschke, T. L. (2007). Effects of biostimulants on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci*. 47, 261–267.
34. Khalil, H.A., El-Ansary, D.O. (2020). Morphological, physiological and anatomical responses of two olive cultivars to deficit irrigation and mycorrhizal inoculation. *European Journal of Horticultural Science*. 85. 51-62.
35. Khan, A.S., Ahmad, B., Jaskani, M.J., Ahmad, R., Malik, A.U. (2012). Foliar application of mixture of amino acids and seaweed (*Ascophyllum nodosum*) extract improve growth and physicochemical properties of grapes. *Int. J. Agric. Biol*. 14, 383–388.
36. Khan, W., Rayirath, U.P., Subramanian, S., Jithesh, M.N., Rayorath, P., Hodges, M.D., Critchley, A.T., Craigie, J.S., Norrie, J., Prithviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J Plant Growth Regul*. 28, 386–399.
37. Koc, A. (2015.) Effect of plant growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on lipid peroxidation and total phenolics of strawberry (*Fragaria × ananassa* 'San Andreas') under salt stress. *Turk J Agric For*. 39: 992-998.

38. Lucy, M., Reed, E., Glick, R. B. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 1–25.
39. Malerba, M., Cerana, R. (2018). Recent Advances of Chitosan Applications in Plants. *Polymers*. 10(2):118.
40. Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., Briand, X. (2006). Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Advances in Horticultural Science*. 20. 156-161.
41. Mattner, S.W., Milinkovic, M., Arioli, T. (2018). Increased growth response of strawberry roots to a commercial extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* 30, 2943–2951.
42. Mohamed, S.A., Ahmed, H.S. (2019). Study effect of chitosan and gibberellic acid on growth, flowering, fruit set, yield and fruit quality of Washington navel orange trees. *Mid East J.* 8:255–67.
43. Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism - A Review. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 73 (1).
44. Nargesi, M.M., Sedaghatoor, S., Hashemabadi, D. (2022). Effect of foliar application of amino acid, humic acid and fulvic acid on the oil content and quality of olive. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Volume 29, Issue 5.
45. Neeru, J., Shaliesh, C., Vaishali, T., Purav, S., Manoharlal, R. (2019). Role of Orthosilicic Acid (OSA) Based Formulation in Improving Plant Growth and Development. *Silicon*. 11. 10.1007/s12633-015-9380-x.
46. Parađiković, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M., Špoljarević, M. (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food Energy Secur.* 2019;8: e00162.
47. Parrado, J., Bautista, J., Romero, E.F., Garcia-Martinez, A.M., Friaza, V., Tejada, M. (2008). Production of a carob enzymatic extract: Potential use as a biofertilizer. *Bioresour Technol.* 99:2312–2318.
48. Pichyangkura, R., Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*. Volume 196, ISSN 0304-4238.
49. Polo, J., Mata, P. (2018). Evaluation of a Biostimulant (Pepton) Based in Enzymatic Hydrolyzed Animal Protein in Comparison to Seaweed Extracts on Root Development, Vegetative Growth, Flowering, and Yield of Gold Cherry Tomatoes Grown under Low Stress Ambient Field Conditions. *Front. Plant Sci.* 8:2261.
50. Posmyk, M.M., Szafranska, K. (2016). Biostimulators: A New Trend towards Solving an Old Problem. *Front. Plant Sci.* 7:748.

51. Poveda, J., González-Andrés, F. (2021). Bacillus as a source of phytohormones for use in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 8629–8645.
52. Priya B. N. V., Mahavishnan K., Gurumurthy D. S., Bindumadhava H., Ambika, P. Upadhyay, Navin, K. Sharma. (2014). Fulvic Acid (FA) for Enhanced Nutrient Uptake and Growth: Insights from Biochemical and Genomic Studies, *Journal of Crop Improvement*, 28:6, 740-757.
53. Pylak, M., Oszust, K., Frac, M. (2019). Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 18:597-616.
54. Rahim, A., W., El-Naggar, M., Afifi, A., El-Shawadfy, M. (2020). Response of olive trees (cv. Koroneiki) to algae extract sprays and its impact on growth and productivity under saline conditions. *Middle East Journal of Agriculture Research*. Volume: 07, Issue: 01.
55. Rana, V.S., Sharma, S., Rana, N., Sharma, U. (2022). Sustainable production through biostimulants under fruit orchards. *CABI Agric Biosci* 3, 38.
56. Ravnjak, B. (2015). Primjena mikoriznih gljiva u poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, citirano: 27.07.2022.: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:235461>
57. Renaut, S., Masse, J., Norrie, J.P., Blal, B., Hijri, M. A. (2019). Commercial Seaweed Extract Structured Microbial Communities Associated with Tomato and Pepper Roots and Significantly Increased Crop Yield. *Microb. Biotechnol.* 12(6):1346-1358.
58. Rodrigues, M., Corte Baptistella, J.L., Horz, D.C., Bortolato Minatel, L., Mazzafera, P. (2020). Organic Plant Biostimulants and Fruit Quality – A Review. *Agronomy*. 10(7):988.
59. Rouphael, Y. i Colla, G. (2018). Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front. Plant Sci.* 9:1655.
60. Salah, I.B., Aghrouss, S., Douira, A., Aissam, S., El Alaoui-Talibi, Z., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C. (2018). Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against verticillium wilt of olive. *Journal of Plant Interactions*. 13:1, 248-255.
61. Sánchez-Sánchez, A., Sánchez-Andreu, J., Juárez, M., Jordá, J., Bermúdez, D. (2002). Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees. *J Plant Nutr.* 25:2433–2442.
62. Schiavon, M., Ertani, A., and Nardi, S. (2008). Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of TCA cycle and N metabolism in *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11800–11808.
63. Shahrajabian, M.H., Chaski, C., Polyzos, N., Tzortzakis, N., Petropoulos, S.A. (2021). Sustainable Agriculture Systems in Vegetable Production Using Chitin and Chitosan as Plant Biostimulants. *Biomolecules*. 11(6):819.



64. Slankis, V. (1973). Hormonal relationship in mycorrhizal development In *Ectomycorrhizae: their ecology and physiology*, pp. 232–298, edited by G C Marks and T T Kozłowski New York: Academic Press. pp. 444.
65. Slezak, R. (2013). Bio-budućnost. Mikoriza za masline. Cjepivo MYKOFLOOR, ektomikoriza – živi mikorizni micelij.  
Dostupno na: <http://www.bio-buducnost.com/mikorizamasline.pdf> - pristup: 27.07.2022.
66. Soppelsa, S., Kelderer, M., Casera, C., Bassi, M., Robatscher, P., Andreotti, C. (2018). Use of Biostimulants for Organic Apple Production: Effects on Tree Growth, Yield, and Fruit Quality at Harvest and During Storage. *Front. Plant Sci.* 9:1342.
67. Soppelsa, S., Kelderer, M., Casera, C., Bassi, M., Robatscher, P., Matteazzi, A., Andreotti, C. (2019). Foliar applications of biostimulants promote growth, yield and fruit quality of strawberry plants grown under nutrient limitation. *Agronomy*. 9(9), 483.
68. Soppelsa, S., Kelderer, M., Testolin, R., Zanotelli, D., Andreotti, C. (2020). Effect of Biostimulants on Apple Quality at Harvest and After Storage. *Agronomy*. 10(8):1214.
69. Stirk, W. A., Rengasamy, K. R. R., Kulkarni, M. G., & Staden, J. (2020). Plant Biostimulants from Seaweed. *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, 31–55.
70. Swift, R.S. Book Editor(s): D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston, M.E. (1996). *Organic Matter Characterization*. Book Series: SSSA Book Series. Chapter 32., page 1018.
71. Šepuť, J. (2017). Utjecaj mikoriznih gljiva na rast i razvoj voćarskih kultura, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, citirano: 10.07.2022., <https://www.bib.irb.hr/904556>
72. Tarantino, A., Francesco, F., Disciglio, G., Lopriore, G. (2018). Effects of plant biostimulants on fruit set, growth, yield and fruit quality attributes of 'Orange rubis®' apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivar in two consecutive years. *Scientia Horticulturae*. 239. 26-34.
73. Traon, D., Laurence, A., Ferdinand, Z., Du Jardin, P. (2014). A Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU. Report for the European Commission, Enterprise & Industry Directorate – General. Contract n°255/PP/ENT/IMA/13/1112420. [http://publications.europa.eu/resource/cellar/dbeffd43-98a5-4e39-a930-7dfa21816f8c.0001.02/DOC\\_1](http://publications.europa.eu/resource/cellar/dbeffd43-98a5-4e39-a930-7dfa21816f8c.0001.02/DOC_1) - pristup 20.03.2022.
74. Upreti K.K., Bhatt R.M., Panneerselvam P., Varalakshmi L.R. (2015). MorphoPhysiological Responses of Grape Rootstock 'Dogridge' to Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation Under Salinity Stress. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FRUIT SCIENCE* 2016, VOL. 16, NO. 2.

75. Uredba (EU) 2019/1009 Europskog parlamenta i Vijeća od 5. lipnja 2019. o utvrđivanju pravila o stavljanju gnojidbenih proizvoda EU-a na raspolaganje na tržištu te o izmjenama uredba (EZ) br. 1069/2009 i (EZ) br. 1107/2009 i stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 2003/2003 (SL L 170, 25.6.2019.  
<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R1009&from=EN> – pristup 05.03.2022.
76. Verma, P., Thakur, S., Kaur, M. (2016). Antagonism of *Pseudomonas putida* Against *Dematophora necatrix* A Major Apple Plant Pathogen and Its Potential Use as a Biostimulant. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 10. 2717-2726. 10.22207/JPAM.10.4.30.
77. Willer, H., Trávníček, J., Meier, C., Schlatter, B. (Eds.) (2022). *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2022*. Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick, and IFOAM – Organics International, Bonn.
78. Wilson, H.T., Amirkhani, M., Taylor, A.G. (2018). Evaluation of Gelatin as a Biostimulant Seed Treatment to Improve Plant Performance. *Front. Plant Sci*. 9:1006.
79. Xu, L., Geelen, D. (2018). Developing Biostimulants From Agro-Food and Industrial By-Products. *Front. Plant Sci*. 9:1567.
80. Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A., Brown, P.H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci*. 7:2049.
81. Zou Y., Wu Q. (2011). Efficiencies of five arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating salt stress of trifoliolate orange. *Int. J. Agric. Biol*. 13: 991–995.

### Popis korištenih izvora – poveznica

European Commission. [https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/organic-farming\\_en](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/organic-farming_en) - pristup 04.03.2022.

Europsko vijeće industrije biostimulatora, EBIC. <http://www.biostimulants.eu> - pristup 20.07.2022.

Provedbena Uredba Komisije (EU) br. 354/2014 o izmjeni i ispravku Uredbe (EZ) br. 889/2008 o detaljnim pravilima za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 834/2007 o ekološkoj proizvodnji i označavanju ekoloških proizvoda s obzirom na ekološku proizvodnju, označivanje i kontrolu.  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0354&from=EN> - pristup 18.3.2022.

Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za stručnu podršku razvoju poljoprivrede. <https://www.savjetodavna.hr/2020/12/28/neprskano-i-negnojeno/> - pristup 01.08.2022.

Citosanlab. <https://chitosanlab.com/en/> - pristup 25.08.2022.

Algea. <https://www.algea.com/> - pristup 25.08.2022.

AlgaEnergy. <https://www.algaenergy.com/> - pristup - 25.08.2022.

European Sustainable Phosphorus Platform (ESPP) - Newsletter about nutrient stewardship. [https://www.phosphorusplatform.eu/scope-in-print/enews/2201-espp-enews-no-68-july-2022#\\_Toc108595814](https://www.phosphorusplatform.eu/scope-in-print/enews/2201-espp-enews-no-68-july-2022#_Toc108595814) - pristup 27.08.2022.

#### Izvor slika:

Sirbu, C., Cioroianu, T., Rotaru, P. (2010). About the humic acids and thermal behaviour of some humic acids. *Annals of the University of Craiova, Physics*. 20. [https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-humic-acids\\_fig1\\_266458005](https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-humic-acids_fig1_266458005) - pristup: 10.03.2022.

Goñi, O., Quille, P., O'Connell, S. (2016). Production of chitosan oligosaccharides for inclusion in a plant biostimulant. *Pure and Applied Chemistry*, vol. 88, no. 9, pp. 881-889. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0701> - pristup: 20.03.2022.

Chakraborty, M., Hasanuzzaman, M., Rahman, M., Khan, M.A.R., Bhowmik, P., Mahmud, N.U., Tanveer, M., Islam, T. (2020). Mechanism of Plant Growth Promotion and Disease Suppression by Chitosan Biopolymer. *Agriculture*. 10(12):624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624> - pristup: 25.03.2022.

Agriculture XPRT. Dostupno na: <https://www.agriculture-xprt.com/products/algeafert-solid-k-ascophyllum-nodosum-seaweed-extract-507464> - pristup: 25.07.2022.

Vukadinović, V. (2020). Budućnost i perspektiva ishrane bilja. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek. [http://tlo-i-biljka.eu/Tekstovi/Buducnost\\_IB.pdf](http://tlo-i-biljka.eu/Tekstovi/Buducnost_IB.pdf) - pristup: 01.07.2022.

Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za stručnu podršku poljoprivrede, 2015. <https://www.savjetodavna.hr/2015/11/26/mikoriza-nova-tehnologija-u-poljoprivredi/> - pristup: 01.07.2022.

Ojasvini, A., Poonam, C. S., Ranjana, B. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*. Volume 5, 100032, ISSN 2666-9161. <https://doi.org/10.1016/j.resenv.2021.100032> - pristup: 20.07.2022.

El Boukhari, M.E.M., Barakate, M., Bouhia, Y., Lyamlouli, K. (2020). Trends in Seaweed Extract Based Biostimulants: Manufacturing Process and Beneficial Effect on Soil-Plant Systems. *Plants*. 9, 359.

Afonso, S., Oliveira, I., Meyer, A.S., Gonçalves, B. (2022). Biostimulants to Improved Tree Physiology and Fruit Quality: A Review with Special Focus on Sweet Cherry. *Agronomy*. 12, 659. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030659> - pristup: 17.08.2022.

**Izvor tablica:**

Jimmy, J., (2020): "What's the difference between plant growth regulators and biostimulants?" Article, LinkedIn. [https://www.linkedin.com/pulse/whats-difference-between-plant-growth-regulators-jimmy-ji-?trk=read\\_related\\_article-card\\_title](https://www.linkedin.com/pulse/whats-difference-between-plant-growth-regulators-jimmy-ji-?trk=read_related_article-card_title) – pristup: 01.09.2022.

Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation, Sci. Hortic. 196, 3-14

Ali, O., Ramsabhag, A., Jayaraman, J. (2021). Biostimulant Properties of Seaweed Extracts in Plants: Implications towards Sustainable Crop Production. Plants, 10, 531

Gluhić, D. (2020). Primjena biostimulatora na bazi aminokiselina u poljoprivrednoj proizvodnji. Glasnik Zaštite Bilja, 43. (3.), 38-46. <https://doi.org/10.31727/gzb.43.3.5> - pristup: 25.08.2022.

## Životopis

Tiana Friganović rođena je 24. studenog 1996. godine u Dubrovniku. 2011. godine upisuje srednju Turističku i ugostiteljsku školu u Dubrovniku, koju pohađa do 2015. godine. Maturirala je na temu: „Turizam i ekologija“. Nakon završetka srednje škole radi u turizmu te joj to iskustvo pomaže da stekne bolje komunikacijske i interpersonalne vještine i aktivno koristi jezike koje je učila tijekom školovanja (B2: engleski; B1: talijanski i španjolski). 2017. godine upisuje preddiplomski studij Ekološka poljoprivreda na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, kojeg završava obranom završnog rada na temu: “Mogućnosti primjene mikorize u ekološkoj poljoprivredi”. Godine 2020. upisuje diplomski studij Ekološka poljoprivreda i agroturizam. Tijekom studiranja aktivno sudjeluje i vodi studentsku inicijativu “Studentski vrt”, u kojoj zajedno sa kolegama i kolegicama održava ekološki vrt, sudjeluje na brojnim radionicama i surađuje sa drugim studentskim i građanskim udrugama. Na prvoj godini diplomskog studija pohađa izvannastavnu aktivnost Vrtlarska grupa. Godine 2021. sudjeluje na edukativno-volonterskom kampu u sklopu projekta “Dinara back to LIFE”, gdje dva tjedna uči o restauraciji travnjaka, zaštiti okoliša i održivim poljoprivrednim praksama. Sudjeluje i na ERASMUS+ razmjeni mladih na Siciliji, gdje oči o permakulturi, održivosti i regeneraciji ekosustava. Članica je neformalnog udruženja mladih dubrovačkog područja “Sjeme promjene – centar za edukaciju i očuvanje bioraznolikosti”. Tijekom studiranja razvija interese za alternativne oblike ekološke poljoprivrede, biodinamiku, regenerativnu poljoprivredu i permakulturu, kao i za tematiku unaprijeđenja života u zapuštenim ruralnim krajevima.