

Inhibicija rasta fitopatogene gljive *Penicillium digitatum* aplikacijom autohtonih izolata bakterija roda *Pseudomonas*

Kavain, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:204:008522>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE GLJIVE *PENICILLIUM*
DIGITATUM APLIKACIJOM AUTOHTONIH IZOLATA
BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS***

ZAVRŠNI RAD

Iva Kavain

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Preddiplomski studij:
Fitomedicina

**INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE GLJIVE *PENICILLIUM*
DIGITATUM APLIKACIJOM AUTOHTONIH IZOLATA
BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS***

ZAVRŠNI RAD

Iva Kavain

Mentor: Dr. sc. Irina Tanuwidjaja

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Iva Kavain**, JMBAG 0178128431, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio završni rad pod naslovom:

**INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE GLJIVE *PENICILLIUM DIGITATUM* APLIKACIJOM
AUTOHTONIH IZOLATA BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS***

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga završnog 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 završni 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 završnog 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

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI ZAVRŠNOG RADA

Završni rad studenta/ice **Iva Kavain**, JMBAG 0178128431, naslova

INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE GLJIVE *PENICILLIUM DIGITATUM* APLIKACIJOM

AUTOHTONIH IZOLATA BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS*

mentor je ocijenio ocjenom _____.

Završni rad obranjen je dana _____ pred povjerenstvom koje je prezentaciju

ocijenilo ocjenom _____, te je student/ica postigao/la ukupnu ocjenu

_____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Dr. sc. Irina Tanuwidjaja mentor

2. _____ član

3. _____ član

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja.....	1
2. Pregled literature	3
2.1. Proizvodnja agruma u svijetu i Republici Hrvatskoj	3
2.2. Zelena plijesan.....	5
2.2.1 Općenito o bolesti	5
2.2.2 Uzročnik zelene plijesni (<i>P. digitatum</i>).....	5
2.2.3 Konvencionalni načini suzbijanja zelene plijesni.....	6
2.3. Biokontrola	6
2.4. <i>Pseudomonas</i> sp.....	11
3. Materijali i metode.....	12
3.1. Laboratorijski uređaji	12
3.2. Hranjive podloge	12
3.3. Bakterijski sojevi i fitopatogena gljiva	12
3.4. Određivanje antifungalnog djelovanja odabranih sojeva <i>Pseudomonas</i> sp.	13
4. Rezultati.....	15
4.1. Antifungalno djelovanje sojeva <i>Pseudomonas</i> sp.....	15
5. Zaključak.....	17
6. Popis literature	18
Životopis	22

Sažetak

Završnog rada studentice **Ive Kavain**, naslova

INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE GLJIVE *PENICILLIUM DIGITATUM* APLIKACIJOM AUTOHTONIH IZOLATA BAKTERIJA RODA *PSEUDOMONAS*

Proizvođači agruma trpe značajne gubitke uzrokovane posliježetvenim bolestima među kojima se posebno ističe zelena plijesan čiji je uzročnik fitopatogena gljiva *Penicillium digitatum*. Intenzivna primjena sintetskih fungicida uzrokovala je pojavu rezistentnih fitopatogena i potencijalno negativne posljedice na okoliš. U nastojanju da se njihova primjena svede na minimum bez umanjenja kvalitete i kvantitete prinosa agruma, proizvođači se sve više potiču na alternativne pristupe i integrirani sustav suzbijanja posliježetvenih bolesti. Bakterije roda *Pseudomonas* pokazuju veliki potencijal u biološkoj zaštiti poljoprivrednih proizvoda od fitopatogena. Obzirom da dokazano suzbijaju neke, ekonomski važne patogene, određene vrste i sojevi *Pseudomonas* sp. komercijano su dostupni kao mikrobiološki preparati. Cilj ovog istraživanja je ispitati antifungalno djelovanje petnaest autohtonih sojeva *Pseudomonas* sp. izoliranih iz spilje i rizosfere zelene salate, metodom dualnih testova, na najvažnijeg posliježetvenog patogena agruma, *Penicillium digitatum*. Ukupno 46,7 % autohtonih sojeva *Pseudomonas* sp. potpuno (26,7 %) ili izraženo (20,0 %) inhibira rast gljive *P. digitatum* gdje se raspon inhibicije radijalnog rasta kretao od $47,4 \pm 0,0$ % do $100,0 \pm 0,0$. Nadalje, 40,0 % sojeva pokazuje slabu inhibiciju (inhibicija radijalnog rasta od $2,9 \pm 4,2$ % do $32,6 \pm 3,7$ %), dok 13,3 % sojeva uopće ne djeluje na rast gljive *P. digitatum*. Sojevi 2020_W2-8, 2022_01_SL2-11, 2022_01_SL2-17 i 2022_01_SMS-16 izolirani iz spilje su u potpunosti inhibirali fungalni rast, odnosno pokazali su se kao najučinkovitiji te su najbolji potencijalni kandidati za primjenu u obliku bioloških preparata za kontrolu i suzbijanje fitopatogene gljive *P. digitatum*.

Ključne riječi: *Penicillium digitatum*, posliježetvene bolesti, autohtoni sojevi *Pseudomonas* sp., antifungalno djelovanje, biološka zaštita

Summary

Of the final work - student **Iva Kavain**, entitled

GROWTH INHIBITION OF THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *PENICILLIUM DIGITATUM* BY APPLICATION OF AUTOCHTHONOUS ISOLATES OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*

Citrus producers suffer significant losses caused by postharvest diseases, among which green mold, caused by the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*, is particularly prominent. The intensive use of synthetic fungicides has led to the emergence of resistant phytopathogens and potentially negative consequences for the environment. In an effort to minimize their use without compromising the quality and quantity of citrus yields, producers are increasingly encouraged to adopt alternative approaches and integrated systems for controlling postharvest diseases. Bacteria of the genus *Pseudomonas* exhibit great potential for biological protection of agricultural products against phytopathogens. Given their proven effectiveness in suppressing some economically important pathogens, certain species and strains of *Pseudomonas* sp. are commercially available as microbiological formulations. The aim of this study is to examine the antifungal activity of fifteen autochthonous strains of *Pseudomonas* sp. isolated from a cave and a rhizosphere of lettuce using dual culture method against the most important postharvest pathogen of citrus fruits, *Penicillium digitatum*. Overall, 46.7% of the autochthonous *Pseudomonas* sp. strains show complete (26.7%) or pronounced (20.0%) inhibition of the *P. digitatum* growth, with radial growth inhibition ranging from $47.4 \pm 0.0\%$ to $100.0 \pm 0.0\%$. Furthermore, 40.0% of the strains exhibited weak inhibition (radial growth inhibition from $2.9 \pm 4.2\%$ to $32.6 \pm 3.7\%$), while 13.3% of the strains had no effect at all on the growth of *P. digitatum*. The strains 2020_W2-8, 2022_01_SL2-11, 2022_01_SL2-17, and 2022_01_SMS-16 isolated from a cave completely inhibited fungal growth and proved to be the most effective, making them excellent potential candidates for use in biological formulations for the control and suppression of the phytopathogenic fungus *P. digitatum*.

Key words: *Penicillium digitatum*, postharvest diseases, autochthonous strains of *Pseudomonas* sp., antifungal activity, biological control

1. Uvod

Prije izuma pesticida, čovječanstvo je trpjelo velike gubitke uzrokovane fitopatogenim mikroorganizmima, korovima i štetnicima. Uvođenjem sredstava za zaštitu bilja omogućena je stabilnija i dostatnija proizvodnja hrane, no unatoč tome pojavili su se određeni problemi vezani uz primjenu istih. Intenzivnom i često neodgovornom primjenom kemijskih sredstava u borbi protiv štetnih organizama, došlo je do pojave i razvoja rezistentnosti kod mikroorganizama i nakupljanja rezidua pesticida u okolišu, što za sobom donosi potencijalne opasnosti po ljudsko zdravlje, okoliš i bioraznolikost.

Iako su sintetski fungicidi još uvijek, prvi izbor u suzbijanju uzročnika biljnih bolesti kako za vrijeme proizvodnje, tako i u posliježetvenom razdoblju, javlja se potreba za racionalizacijom primjene konvencionalnih sredstava za zaštitu bilja i usmjeravanjem konvencionalne poljoprivredne proizvodnje prema integriranoj i/ili ekološkoj proizvodnji koje daju prednost ostalim metodama zaštite bilja (npr. biološke mjere) nad kemijskim mjerama. Primjena antagonističkih mikroorganizama predstavlja alternativu sintetskim fungicidima, iz razloga što mikroorganizmi, promatrani kao djelatna tvar imaju više mehanizama djelovanja istovremeno, čime se opasnost od pojave rezistentnosti svodi na minimum. Nadalje, obzirom da se radi o živim organizmima sa svojim mjestom u ekosustavu, nema ni rizika od njihove akumulacije u okolišu.

Konkretno, za bakterije roda *Pseudomonas* već je dokazano da mogu inhibirati rast gljive *Botrytis cinerea*, uzročnika ekonomski važne bolesti siva plijesan (Wang i sur. 2021.; Gao i sur. 2018.; Byrk i sur. 2004.). U svrhu boljeg razumijevanja, ali i proširenja spektra djelovanja kako potencijalnih tako i postojećih biofungicida na osnovi sojeva bakterija roda *Pseudomonas*, potrebno je obaviti dodatna istraživanja kojima bi se utvrdio antifungalni učinak i na druge ekonomski važne uzročnike biljnih bolesti. Primjerice, u proizvodnji agruma, veliki gubici u posliježetvenom razdoblju i smanjenje tržišne vrijednosti poljoprivrednih proizvoda pripisani su gljivi *Penicillium digitatum*, uzročniku bolesti zelena plijesan. Do sada su već provedena istraživanja koja upućuju na mogućnost primjene bakterija roda *Pseudomonas* za suzbijanje zelene plijesni (Wang i sur. 2018.; Zamani i sur. 2008.; Smilanick i Denis-Arrue 1992.). Međutim, malo se zna o antifungalnom djelovanju autohtonih sojeva *Pseudomonas* sp. izoliranih na području Republike Hrvatske prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum*. Stoga, cilj ovog istraživanja je ispitati antifungalni učinak autohtonih sojeva roda *Pseudomonas* izoliranih iz različitih ekosustava (spiljski sedimenti i voda, rizosferno tlo zelene salate) s područja Republike Hrvatske te utvrditi koji soj ili sojevi najučinkovitije inhibiraju rast zelene plijesni.

1.1. Cilj istraživanja

Opći cilj ovog istraživanja je utvrditi antifungalno djelovanje autohtonih sojeva *Pseudomonas* sp. izoliranih iz sedimenata i vode prikupljenih u krškoj spilji u Šibensko-kninskoj županiji i rizosfernog tla prikupljenog na obiteljsko poljoprivrednom gospodarstvu u Istarskoj županiji (n = 15) prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum*.

Specifični ciljevi istraživanja:

- Ispitati djelovanje sojeva *Pseudomonas* sp. prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum* (DSM 2732)
- Identificirati najučinkovitiji soj ili sojeve za kontrolu i suzbijanje rasta gljive *P. digitatum*

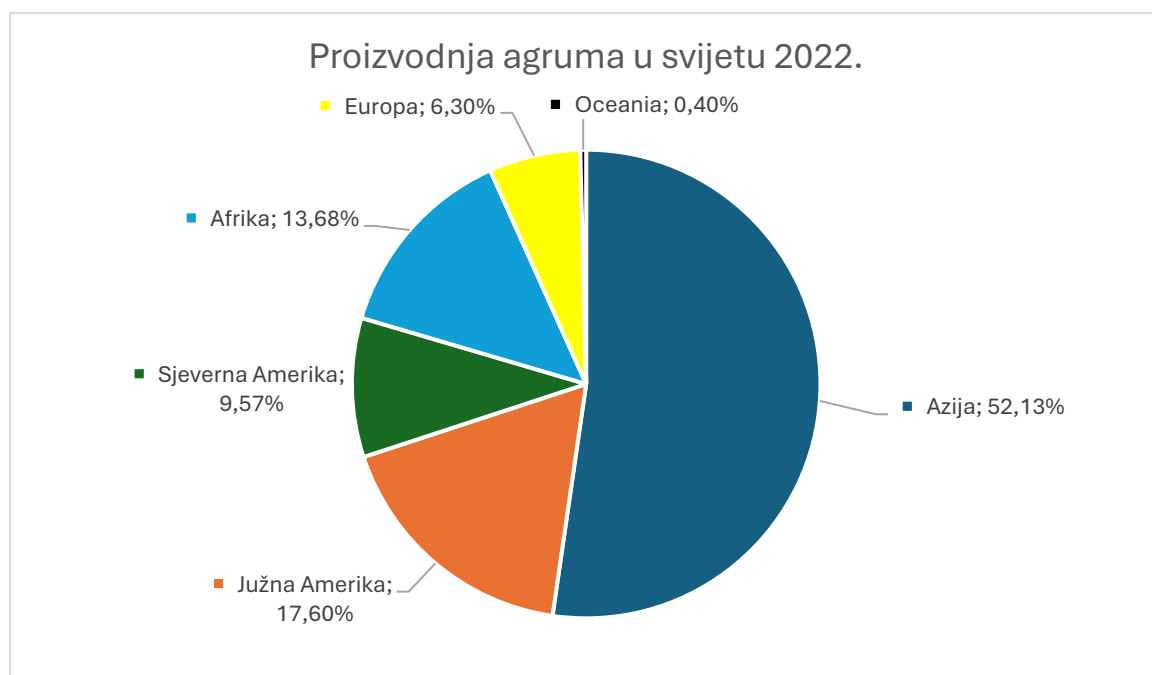
2. Pregled literature

2.1. Proizvodnja agruma u svijetu i Republici Hrvatskoj

Agrumi su višegodišnje biljne vrste iz porodice *Rutaceae* koja se dijeli na tri roda: rod *Citrus* sa vrstama: limun (*Citrus x limon*), gorka naranča (*Citrus x aurantium*), naranča (*Citrus x sinensis*), limeta (*Citrus x aurantifolia*), mandarina (*Citrus reticulata*), grejp (*Citrus x paradisi*) i citron (*Citrus medica*), rod *Fortunella* sa vrstama kumkvat (*Citrus japonica*), bilva (*Aegle marmelos*) i japanski papar (*Zanthoxylum piperitum*) i rod *Poncirus* sa vrstom trolisna naranča (*Poncirus trifoliata*) koja ima ukrasnu vrijednost, a koristi se i kao cijepna podloga (Britannica 2016.). Obzirom da se u svijetu uzgajaju vrste iz sva tri roda, prikladnije je koristiti naziv agrumi nego naziv citrusi koji se odnosi samo na vrste iz roda *Citrus*.

Agrumi se uzgajaju unazad 4000 godina, a vjeruje se da su porijeklom sa područja jugoistočne Azije odakle su se proširili po cijelom svijetu razvojem trgovine i seobom naroda (El-Otmani i sur. 2011.). Zahvaljujući svom povoljnom nutritivnom sastavu i atraktivnosti za konzumaciju kako u svježem, tako i u prerađenom obliku u vidu raznih sokova, agrumi predstavljaju atraktivnu skupinu voća za poljoprivrednu industriju, a time i za tržište te se uzgajaju na 10,2 milijuna ha diljem svijeta (Pereira Gonzatto i Scherer Santos 2023.).

Prema podacima FAOSTAT-a u 2022. godini u svijetu je sveukupno proizvedeno 166 303 421,2 t agruma pri čemu su najveći proizvođači bili Kina s 29,33% svjetske proizvodnje (48 772 905,89 t agruma), Brazil s 11,87% svjetske proizvodnje (19 732 041,89 t agruma), Indija s 8,87% svjetske proizvodnje (14 756 000 t agruma), Meksiko s 5,60% svjetske proizvodnje (9 317 400,52 t agruma) i Španjolska s 3,34% (5 558 090 t agruma) svjetske proizvodnje agruma (grafikon 2.2.1).



Grafikon 2.1.1: Prikaz udjela svjetskih regija u ukupnoj proizvodnji agruma za 2022. godinu (FAOSTAT 2022.)

U Republici Hrvatskoj, proizvodnja agruma ograničena je, zbog niza nepovoljnih abiotičkih uvjeta, na područje od Trogira do Konavala te na otoke. Obzirom da je ovo jedno od najsjevernijih područja uzgoja agruma na svijetu, najveći ograničavajući čimbenik u RH za uzgoj su niske zimske temperature (Gugić i Cukrov 2011.). U Hrvatskoj se od agruma proizvode naranča, limun i mandarina pri čemu mandarina prednjači u površinama i prinosu nad limunom i narančom iz razloga što je znatno otpornija na nepovoljne uvjete. Prema podacima sa službene stranice Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i ribarstva za 2022. godinu, poljoprivredna površina pod intenzivnim nasadima agruma u Hrvatskoj iznosila je 2135 ha, od čega 43 ha otpada na naranče, 48 ha je pod nasadima limuna te 2044 ha poljoprivrednog zemljišta je pod nasadom mandarine. Najveća samodostatnost, odnosno pokrivenost potražnje u RH domaćom proizvodnjom, među sve tri vrste agruma koje se uzgajaju u RH je postignuta kod mandarina gdje je iznosila 98,83%, dok je samodostatnost kod svih agruma ukupno iznosila 32,74%. U tablici 2.1.1 vidljiv je porast proizvodnje limuna i naranče kao i visoki prinosi mandarine zabilježeni u zadnjih pet godina.

Tablica 2.1.1: Proizvodnja agruma u tonama u Republici Hrvatskoj po godinama i vrstama

Vrsta	Proizvodnja u 2018. (t)	Proizvodnja u 2019. (t)	Proizvodnja u 2020. (t)	Proizvodnja u 2021. (t)	Proizvodnja u 2022. (t)
limun	297	325	375	262	476
naranča	474	593	465	603	753
mandarina	47 676	52 226	39 626	40 580	42 036
Ukupno:	48 447	53 144	40 466	41 445	43 265

Izvor: Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i ribarstva (2022.)

Agrumi su podložni čitavom nizu bolesti uzrokovanih kako biotskim, tako i abiotičkim čimbenicima, a koji uzrokuju značajne gubitke u posliježetvenom razdoblju. Procjenjuje se da je oko 70 % proizvedenih agruma na svijetu namijenjeno za konzumaciju u svježem stanju, pa je iz tog razloga bolesti na agrumima potrebno promotriti i kroz prizmu atraktivnosti plodova za tržište. Navedene bolesti mogu uzrokovati određene organoleptičke promjene na plodovima, kao i morfološke promjene zbog kojih plodovi, u percepciji potrošača, izgledom odstupaju od standarda. Nadalje, spore gljiva koje se mogu nalaziti na uskladištenom voću mogu uzrokovati zdravstvene smetnje u vidu alergija kod ljudi. Sve navedeno bitno umanjuje tržišnu vrijednost poljoprivrednih proizvoda.

Uzročnici biotskih bolesti su prvenstveno fitopatogene gljive i bakterije te se, obzirom na vrijeme infekcije mogu podijeliti u dvije skupine. Jedan dio uzročnika inficira plodove dok se još nalaze u voćnjaku, dok drugi dio uzročnika bolesti inficira plodove u vrijeme berbe te u posliježetvenom razdoblju (Strano i sur. 2022.) Najvažniji „priježetveni“ patogeni agruma su *Alternaria citri*, *Glomerella cingulata*, *Guignardia citricarpa* i *Phytophthora* spp. Navedeni patogeni, nakon ostvarenja infekcije u voćnjaku, ulaze u latentno stanje te prolaze neopaženi do trenutka kada nastave sa rastom i razvojem na plodovima u skladištu te je tada najčešće prekasno za njihovo suzbijanje, pa je mjere zaštite potrebno primjenjivati prije berbe. Mjere

biljne higijene uključuju uklanjanje i uništavanje otpalih plodova, suzbijanje vektora, tretiranje tla oko voćki fungicidima i dr. Najvažniji posliježetveni patogeni na agrumima su gljive *Trichoderma viridae*, *Geotrichum candidum*, te *Penicillium digitatum* koji uzrokuje zelenu plijesan i *Penicillium italicum* koji uzrokuje plavu plijesan. Obzirom da se radi o fitopatogenim gljivama koje imaju isti spektar domaćina, plodovi istovremeno mogu biti inficirani sa više patogena te pri takvoj višestrukoj infekciji gubici mogu biti intenzivniji zbog sinergizma među uzročnicima (Lamichhane i Venturi 2015.). Iako su agrumi, zbog kisele pH vrijednosti plodova, u pravilu, podložniji napadu fungalnim uzročnicima bolesti (Talibi i sur. 2014.), opaženi su i bakterijski uzročnici bolesti, poput vrsta *Xanthomonas campestris* pv. *citri* i *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Luo i sur. 2020.; Mougou i Boughalleb-M'hamdi 2018.).

2.2. Zelena plijesan

2.2.1 Općenito o bolesti

Zelena plijesan je posliježetvena bolest agruma uzrokovana fitopatogenom gljivom *Penicillium digitatum*. Ovoj se bolesti pripisuje 60 do 90 % gubitaka pri skladištenju te je iz tog razloga prepoznata kao ekonomski izrazito važna bolest u proizvodnji agruma (Strano i sur. 2022.; Cheng i sur. 2020.). Intenzitet zaraze u skladištu određen je s više čimbenika, a najvažniji su uvjeti rasta i razvoja, agrotehničke mjere, tehnologija berbe, rukovanje te sami uvjeti skladištenja. Infekcija se ostvaruje isključivo putem rana i oštećenja koja mogu nastati prilikom berbe i rukovanja plodovima. Također, određeni štetnici koji rade rupe u plodovima kao što je na primjer mediteranska voćna muha (*Ceratitis capitata*) mogu otvoriti put infekciji dok su plodovi još na voćkama. Takva se infekcija često slabo uočava te može uzrokovati devastirajuće gubitke za vrijeme skladištenja. Patogeneza je prvenstveno uvjetovana načinom skladištenja, a među najvažnijim čimbenicima ističe se temperatura, pa je tako pri optimalnim temperaturama prve simptome bolesti moguće uočiti već dva do tri dana nakon infekcije te se ispoljavaju kroz pojavu truleži na mjestu oštećenja ploda gdje tkivo postaje blago udubljeno i poprima tzv. „vodenasti” izgled (Snowdon 1990.). Daljnjim razvojem bolesti dolazi do rasta bijelog, a kasnije zelenog okruglog micelija. Pri završetku patogeneze, plod se u potpunosti suši i propada (Smith i sur. 1988.).

2.2.2 Uzročnik zelene plijesni (*P. digitatum*)

Fitopatogena vrsta *Penicillium digitatum* pripada koljenu Ascomycota, redu Eurotiales, porodici *Aspergillaceae* te rodu *Penicillium* (Palou 2014.).

Rod *Penicillium* je vrlo raznolik i obuhvaća više od 300 različitih vrsta. Smatra se ubikvintarnim, tj. široko je rasprostranjen diljem svijeta te ga nalazimo u različitim habitatima, uključujući biljke, tlo, namirnice i ekstremne ekosustave (Visagie i sur. 2014.). Sama vrsta *P. digitatum* je mezofilna, odnosno minimalna temperatura pri kojoj može rasti kreće se od 6 °C do 7 °C, dok maksimalna temperatura pri kojoj može rasti iznosi 37 °C. Optimalno raste pri 24 °C (Smith i sur. 1988.).

Spektar domaćina ove fitopatogene gljive ograničen je na biljke iz porodice *Rutaceae*, prvenstveno iz rodova *Citrus* i *Fortunella*. Okrugli micelij sastavljen je od septiranih filamentoznih haploidnih hifa bijele boje, a razmnožava se isključivo nespolnim putem pomoću konidija (Peberdy 2013.). Konidije nastaju enteroblastično iz konidiogenih stanica fialida koje se nalaze na zračnim ograncima hifa, odnosno na konidioforima. Spore su na konidioforima bazipetalno poredane što znači da se najmlađa spora nalazi na bazi niza konidija, uz fialidu (Peberdy 2013.) Konidiofori su nježne strukture i asimetričnog oblika te svojim izgledom podsjećaju na kist, pa je zbog toga rod *Penicillium* dobio naziv prema latinskoj riječi za kist – *penicillio* (Saccardo 1881.). Nakon dozrijevanja, konidije se odvajaju od konidiofora te se uglavnom šire anemohorno te inficiraju oštećene plodove (Pereira Gonzatto i Scherer Santos 2023.).

2.2.3 Konvencionalni načini suzbijanja zelene plijesni

Suzbijanje *P. digitatum* započinje već u voćnjaku te ono uključuje niz metoda koje su usmjerene na prevenciju i kontrolu infekcije tijekom uzgoja, berbe, skladištenja i transporta. Obzirom da štetnici agruma svojom ishranom na plodovima mogu otvoriti put infekciji, suzbijanje istih značajno smanjuje intenzitet zaraze zelenom plijesni. *P. digitatum* ima ograničen spektar domaćina te se može reći da je specifičan patogen agruma. S obzirom na to da se agrumi uzgajaju u monokulturi, infektivni inokulum zelene plijesni je stalno prisutan u voćnjaku, stoga je ključno održavati biljnu higijenu kako bi se smanjila količina inokuluma u i oko trajnog nasada. U tom kontekstu, uklanjanje i uništavanje otpalih plodova iz voćnjaka, koji mogu biti potencijalni izvor zaraze, igra ključnu ulogu. Budući da *P. digitatum* infekciju ostvaruje putem rana i oštećenja, ne preporuča se obavljati berbu netom nakon kišovito vremena iz razloga što su plodovi pri takvim uvjetima turgescetni te lakše pucaju. Iz istog razloga, važno je prilagoditi tehnologiju berbe i rukovanje plodovima. Fungicide za ovu namjenu moguće je primijeniti prije i poslije berbe pri čemu je potrebno voditi računa da se pri višestrukoj primjeni izmjenjuju fungicidi sa različitim mehanizmom djelovanja. Najčešće se suzbija sljedećim fungicidima: imizalil, tiabendazol, pirimetanil i fludioksonil (Zacarias i sur. 2020.). Učestala primjena fungicida istog mehanizma djelovanja dovela je do razvoja rezistentnih sojeva *P. digitatum* (Ferreira i sur. 2023.), a taj problem pogoršava činjenica da ova vrsta obilno sporulira te se rezistentni sojevi mogu lako održati zahvaljujući visokim populacijama (Kazempour i Kodehi 2007.). Zbog svega navedenog sve više se istražuju i potiču alternativni i ekološki prihvatljiviji načini kontrole i suzbijanja fitopatogena, a, koji uključuju i biološke mjere.

2.3. Biokontrola

Integrirana zaštita bilja predstavlja sustav kontrole biljnih štetočinja čija je svrha ograničiti primjenu pesticida, odnosno fungicida, zoocida i herbicida na situacije u kojima se javlja iznimna ekonomski opravdana potreba za primjenom istih. Ovakav pristup ima za cilj uzgajanje poljoprivrednih kultura uz minimalno oštećenje agroekosustava te sprječavanje

potencijalnih negativnih posljedica po ljudsko zdravlje i organizme prisutne u nekoj biocenozi (European Commission 2024.).

U okviru ovakvog sustava zaštite bilja, prednost se daje nekemijskim mjerama, kao što su agrotehničke, biotehničke i biološke metode te prema tome, biokontrola predstavlja važan segment integrirane zaštite bilja. Ona predstavlja suzbijanje biljnih štetočinja uz pomoć živih organizama, odnosno prirodnih neprijatelja štetnih organizama. To mogu biti predatori, paraziti, parazitoidi, antagonisti, kompetitori te neki fitopatogeni za suzbijanje korova (Waage i Greathead 1988.). Navedeni organizmi jednom se riječju nazivaju biopesticidi. Njihov mehanizam djelovanja uglavnom se temelji na lučenju kemijskih spojeva sa antibiotskim učinkom na ciljane organizme, odnosno na antibiozi, mikoparazitizmu, poticanju sistemske otpornosti napadnute biljke i na kompeticiji. Budući da se radi o biološkim sredstvima, jedan te isti preparat istovremeno ima više različitih mehanizama djelovanja čime se bitno smanjuje opasnost od pojave rezistentnosti (Ram i sur. 2018.). Ukoliko je bakterija „djelatna tvar“ nekog biološkog pripravka namijenjenog za suzbijanje fungalnih uzročnika biljnih bolesti onda se takav biopesticid naziva bakteriofungicid, a ukoliko je „djelatna tvar“ gljiva, tada je riječ o mikofungicidu.

U biokontroli biljnih patogena moguća su dva pristupa: prvi pristup uključuje održavanje prisutne populacije organizama, dok se drugi pristup odnosi na introdukciju selektivnih antagonista (Ram i sur. 2018.). U vidu upotrebe prirodno prisutnih antagnoističkih mikroorganizama, posliježetvene bolesti agruma mogu se suzbiti epifitskim mikroorganizmima s površine plodova. Učinkovitost ovakvoga pristupa potvrđena je istraživanjem koje su proveli Chaultz i Wilson (1990.) u kojemu je utvrđeno da oprani i osušeni uskladišteni plodovi agruma bivaju puno češće i puno jače inficirani nego neoprani plodovi. Dodatna prednost ovakvog pristupa biokontroli leži u tome što je bolje prihvaćena od strane opće javnosti nego li je slučaj kod umjetne introdukcije selektivnih antagonista (Talibi i sur. 2014.).

Točan broj registriranih biopesticida u svijetu teško je procijeniti obzirom da se stalno otkrivaju nove vrste od interesa za biokontrolu, a time se i broj registriranih biopesticida neprestano povećava. Vrste roda *Pseudomonas*, zbog svojih karakteristika, posebno su relevantne kao potencijalni biopesticidi. Bakteriofungicid na bazi *Pseudomonas fluorescens* pod nazivom BlightBan A506 komercijalno je dostupan za suzbijanje bakterijske paleži jabuke i kruške. Uz navedeno, ova je vrsta interesantna kao mogući bakteriofungicid za suzbijanje posliježetvenih bolesti agruma, posebice zelene plijesni. Prema istraživanju Wang i sur. (2018.), zabilježeni su dobri rezultati *in vivo* i *in vitro* te se navodi da je kompeticija za hranjivim tvarima i prostorom moguće jedna od glavnih mehanizama djelovanja bakterije *P. fluorescens* na fitopatogenu gljivu *P. digitatum*, odnosno, pretpostavlja se da *P. fluorescens* brže koristi hranjive tvari koje se otpuštaju iz napadnutog, inficiranog tkiva limuna nego *P. digitatum* te na taj način sprečava negativni učinak ove fitopatogene gljive. Nadalje, značajni rezultati u suzbijanju posliježetvenih bolesti na voću postignute su sa vrstama *Pseudomonas syringae* i *Pseudomonas cepacia*, a dosad je komercijalizirana *P. syringae* kao aktivna tvar u pripravcima pod nazivom BioSave 10 LP i BioSave 11 LP. Razlog ovako malom broju komercijalno dostupnih

bioloških pripravaka na bazi *Pseudomonas* spp. je prvenstveno nepoznat mehanizam djelovanja brojnih vrsta roda *Pseudomonas* na ciljane organizme. Naime, plasiranje određenog pesticida na tržište zahtjeva puno vremena, truda i znanja, a cijeli proces dodatno komplicira kompleksna interakcija između antagonista, biljnog patogena, domaćina i ostalih potencijalno prisutnih mikroorganizama na domaćinu (Talibi i sur. 2014.). U tablici 2.3.1 su prikazani ostali značajni, komercijalno dostupni biopesticidi.

Tablica 2.3.1: Prikaz registriranih biopesticida u svijetu prema različitim izvorima

Glavni mehanizmi djelovanja	Djelatni organizam	Ciljani organizmi	Naziv bolesti	Naziv pripravka	Izvor
Kompeticija, antibioza	<i>Agrobacterium radiobacter</i> K1026	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tumor vrata korijena	NOGALL	Ram i sur. (2018.), ARBICO Organics (2024.)
Kompeticija, inducirana sistemska otpornost	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> F727	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Antraknoza, bakterijska pjegavost rajčice, siva plijesan	ARBER	Ram i sur. (2018.), ARBICO Organics (2024.)
Kompeticija, antibioza	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria</i> spp., <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Siva plijesan, alternarioza, plamenjača krumpira, bijela noga	CEASE	Ram i sur. (2018.), ARBICO Organics (2024.)
Kompeticija, mikoparazitizam, antibioza, inducirana sistemska rezistentnost	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Ralstonia solanacearum</i>	Siva plijesan, fuzarioza, smeđa trulež gomolja krumpira	ASPERELLO T34	Ram i sur. (2018.), ARBICO Organics (2024.)
Kompeticija	<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Monilinia</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Plasmodiophora brassicae</i> , <i>Taphrina deformans</i>	Zelena plijesan, monilioza, siva plijesan, kupusna kila, kovrčavost lista breskve	ACTINOVATE AG	Ram i sur. (2018.), ARBICO Organics (2024.)

Tablica 2.3.1 (nastavak): Prikaz registriranih biopesticida u svijetu prema različitim izvorima

Glavni mehanizmi djelovanja	Djelatni organizam	Ciljani organizmi	Naziv bolesti	Naziv pripravka	Izvor
Mikoparazitizam kompeticija, antibioza	<i>Clonostachys rosea</i> syn. <i>Gliocladium</i> <i>catenulatum</i> J1446	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i>	Zelena plijesan, siva plijesan, antraknoza, bijela noga	LAL STOP G46 WG, PRESTOP WG	Ram i sur. (2018.), ARBICO Organics (2024.), Funck Jensen i sur. (2022.)
Kompeticija	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-10	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp. <i>Helminthosporium solani</i>	Zelena plijesan, plava plijesan, siva plijesan, fuzarioza, srebrnolikost gomolja krumpira	BioSave 10 LP	Stockwell i Stack (2007.), Lallemand Plant Care (2024.)
Kompeticija	<i>Pseudomonas syringae</i> ESC-11	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Helminthosporium solani</i>	Zelena plijesan, Plava plijesan agruma, plava plijesan koštičavog voća, siva plijesan, fuzarioza	BioSave 11 LP	Stockwell i Stack, (2007.), Pomerix (2024.)

2.4. *Pseudomonas* sp.

Rod *Pseudomonas* pripada porodici *Pseudomonaceae* unutar razreda Gammaproteobacteria i broji preko 220 vrsta, a nove se vrste još uvijek otkrivaju. Zahvaljujući svojim jednostavnim potrebama za hranjivim tvarima, vrste roda *Pseudomonas* prisutne su ubikvitarno u raznim staništima te obitavaju u širokom rasponu ekoloških niša. Također, nerijetko su dio saprofitske mikrobiote ljudi, biljaka i životinja, a uz to, neke vrste mogu biti uzročnici kvarenja hrane ili mogu biti ljudski i životinjski patogeni (Höfte 2021.).

Navedene bakterije su Gram negativne, aerobne, ne podnose pH vrijednost nižu od 4,5 i nemaju sposobnost sporulacije. Štapićastog su oblika i najčešće su raspoređene pojedinačno, a neke vrste mogu biti grupirane u parove ili u kratke lance. Imaju sposobnost kemotaksije i pokreću se pomoću razvijenih bičeva (lat. *flagellum*) koji se u većine vrsta ovoga roda nalaze pojedinačno na polovima stanice (amfitrih), iako postoje i monotrihne vrste (Moore i sur. 2006.).

Pojedine vrste unutar roda *Pseudomonas* kao što su na primjer *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis* i *Pseudomonas aureofaciens* posjeduju određene karakteristike zbog kojih imaju sposobnost kontrole biljnih bolesti i stimulacije rasta biljaka koje koloniziraju te su kao takve svrstane u promotore rasta, odnosno PGPR (eng. *plant growth promoting rhizobacteria*) (Mercado-Blanco i Bakker 2007.). Ova skupina bakterija, tzv. rizobakterije, prirodno se nalaze u rizosferi gdje mogu kolonizirati biljno korijenje. Produkti njihovog metabolizma pozitivno utječu na zdravstveno stanje „biljke domaćina” i stimuliraju biljni rast. Prvi su ih definirali Kloepper i Schroth 1978. godine.

Ubrzo nakon toga prepoznata je vrijednost PGPR-a u poljoprivrednoj proizvodnji zbog mogućnosti primjene u suzbijanju biljnih bolesti, ekološke prihvatljivosti i ostalih poželjnih učinaka na kulturno bilje. Pozitivni učinci na biljku očituju se kroz poboljšanje učinkovitosti usvajanja biljnih hranjiva, poticanje rasta i razvoja korijenja uslijed utjecaja na lučenje biljnih hormona te kroz povećanje otpornosti na stresne uvjete uzrokovane abiotičkim čimbenicima. U pogledu kontrole biljnih bolesti, najznačajniji mehanizmi djelovanja ovih bakterija na fitopatogene mikroorganizme su: kompeticija za prostor i hranjive tvari, antibioza i poticanje sistemske otpornosti. Dodatni mehanizam djelovanja *Pseudomonas* spp. na fitopatogene uključuje sintezu sekundarnih metabolita sa antimikrobnim učinkom, kao što su na primjer pirolnitrin, cijanovodična kiselina, 2,4-diacetilfluoroglucinol, fenazin i pioluteroin (Höfte, 2021.). Bakterije roda *Pseudomonas* pokazuju značajan potencijal za primjenu u biokontroli biljnih bolesti, što se očituje kroz dokazanu antimikrobnu aktivnost protiv različitih uzročnika biljnih bolesti. Organizmi prema kojima vrste roda *Pseudomonas* dokazano pokazuju antimikrobnu aktivnost su: *Phythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Erwinia amylovora* (Stockwell i Stack 2007.), *Penicillium expansum* te *Botrytis cinerea* (Byrk i sur. 2004.).

3. Materijali i metode

3.1. Laboratorijski uređaji

- Autoklav, CertoClav Multicontrol 2 (CertoClav Sterilizer GmbH, Austrija)
- Inkubator, Sanyo MIR-53 (Sanyo Electronic CO. Ltd., Japan)
- Sigurnosni biološki kabinet klase II, BIO130-II (Alpina, Poljska)
- Laboratorijska vaga, Sartorius TE 31025 (Sartorius AG, Njemačka)
- Vorteks mješalica, Vortex V-1 Plus (Biosan, Latvija)

3.2. Hranjive podloge

- Kruta BHI podloga (eng. *Brain Heart Infusion*, BioLife, Italija)
Kruta BHI podloga pripremljena je otapanjem 37 g dehidrirane podloge i 15 g tehničkog agara (BioLife, Italija) u 1000 ml destilirane vode te je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije, podloga (po 20 ml) je izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Navedena podloga korištena je za oživljavanje sojeva *Pseudomonas* sp. korištenih za ispitivanje njihove antifungalne aktivnosti prema fitopatogenoj gljivi *Penicillium digitatum*.
- Tekuća BHI podloga (eng. *Brain Heart Infusion*, BioLife, Italija)
Tekuća BHI podloga pripremljena je otapanjem 37 g dehidrirane podloge u 1000 ml destilirane vode te je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C/15 min. Podloga je korištena za uzgoj preonoćnih kultura *Pseudomonas* sp.
- Kruta MEP podloga (eng. *Malt Extract Peptone*, BioLife, Italija)
Kruta MEP podloga pripremljena je otapanjem 20 g dehidrirane podloge i 15 g tehničkog agara (BioLife, Italija) u 1000 ml destilirane vode te je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C/15 min. Nakon sterilizacije podloga (po 20 ml) je izlivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da polimerizira na sobnoj temperaturi. Podloga je korištena je za uzgoj fitopatogene gljive *Penicillium digitatum* i ispitivanje antifungalnog učinka sojeva *Pseudomonas* sp. prema gljivi *P. digitatum*.

3.3. Bakterijski sojevi i fitopatogena gljiva

Bakterijski sojevi *Pseudomonas* sp. (n=15) korišteni u ovom ispitivanju prethodno su izolirani iz sedimenata i vode prikupljenih u spilji na području Šibensko-kninske županije i rizosfernog tla zelene salate (kristalka) prikupljenog na obiteljsko poljoprivrednom gospodarstvu na području Istarske županije. Navedeni sojevi su identificirani i detaljno okarakterizirani u prethodnim istraživanjima (Sobota 2023; Bačani 2024.). Popis korištenih sojeva prikazan je u tablici 3.3.1.

Tablica 3.3.1: Sojevi *Pseudomonas* sp. korišteni u ovom istraživanju

Porijeklo soja	Soj	Vrsta
Spilja (voda)	2020_W1-9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
Spilja (voda)	2020_W2-1	<i>Pseudomonas jessenii</i>
Spilja (voda)	2020_W2-4	<i>Pseudomonas</i> sp.
Spilja (voda)	2020_W2-8	<i>Pseudomonas</i> sp.
Spilja (sediment)	2022_01_SD2-2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
Spilja (sediment)	2022_01_SD2-14	<i>Pseudomonas</i> sp.
Spilja (sediment)	2022_01_SL2-11	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
Spilja (sediment)	2022_01_SL2-17	<i>Pseudomonas corrugata</i>
Spilja (sediment)	2022_01_SMS-16	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
Spilja (voda)	2022_02_W1-11	<i>Pseudomonas</i> sp.
Rizosfera (kristalka)	KB02_K1-2	<i>Pseudomonas</i> sp.
Rizosfera (kristalka)	KB02_K1-3	<i>Pseudomonas</i> sp.
Rizosfera (kristalka)	KB02_K1-6	<i>Pseudomonas mendocina</i>
Rizosfera (kristalka)	KB02_K1-9	<i>Pseudomonas putida</i>
Rizosfera (kristalka)	KB02_K2_2	<i>Pseudomonas putida</i>

U ovom istraživanju, uz gore navedene sojeve, korištena je i komercijalno dostupna fitopatogena gljiva *P. digitatum* (DSM 2732) koja je kupljena od DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

3.4. Određivanje antifungalnog djelovanja odabranih sojeva *Pseudomonas* sp.

Antifungalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* sp. prema gljivi *P. digitatum* ispitano je metodom dvojnih kultura (Ali i sur. 2020; Tanapichatsakul i sur. 2020). Prvo, pripremljeni su micelijskih diskovi gljive *P. digitatum* naciepljivanjem navedene gljive na krutu MEP podlogu. Nakon naciepljivanja gljiva je inkubirana na 25 °C/7 dana.

Prije postavljanja pokusa, svi sojevi *Pseudomonas* sp. sterilno su inokulirani u 3 ml tekuće BHI podloge i inkubirani na 30 °C/200 rpm/24 – 48 h (ovisno o soju) u aerobnim uvjetima. Nakon inkubacije, na zasebne krute MEP podloge su aplicirani svi sojevi *Pseudomonas* sp. sterilnom mikrobiološkom ezom, povlačeći crte udaljene 1,5 cm od ruba Petrijeve zdjelice. Svi izolati naciepljeni su u dva ponavljanja. Ovako pripremljene MEP ploče su inkubirane na 30 °C/24 sata.

Nakon što su sojevi *Pseudomonas* sp. izrasli na krutim MEP pločama, tri centimetra od soja *Pseudomonas* sp. je nanešen micelijski disk promjera 8 mm i starosti 7 dana gljive *Penicillium digitatum*.

Istovremeno su pripremljene i kontrolne ploče gdje je na sredinu krute MEP podloge nanešen samo micelijski disk gljive *Penicillium digitatum*. Sve ploče su inkubirane na 25 °C/7 dana.

Nakon inkubacije, izmjeren je radijalni rast gljive *P. digitatum* te radijalni rast kontrole. Inhibicija fungalnog rasta izračunata je pomoću formule:

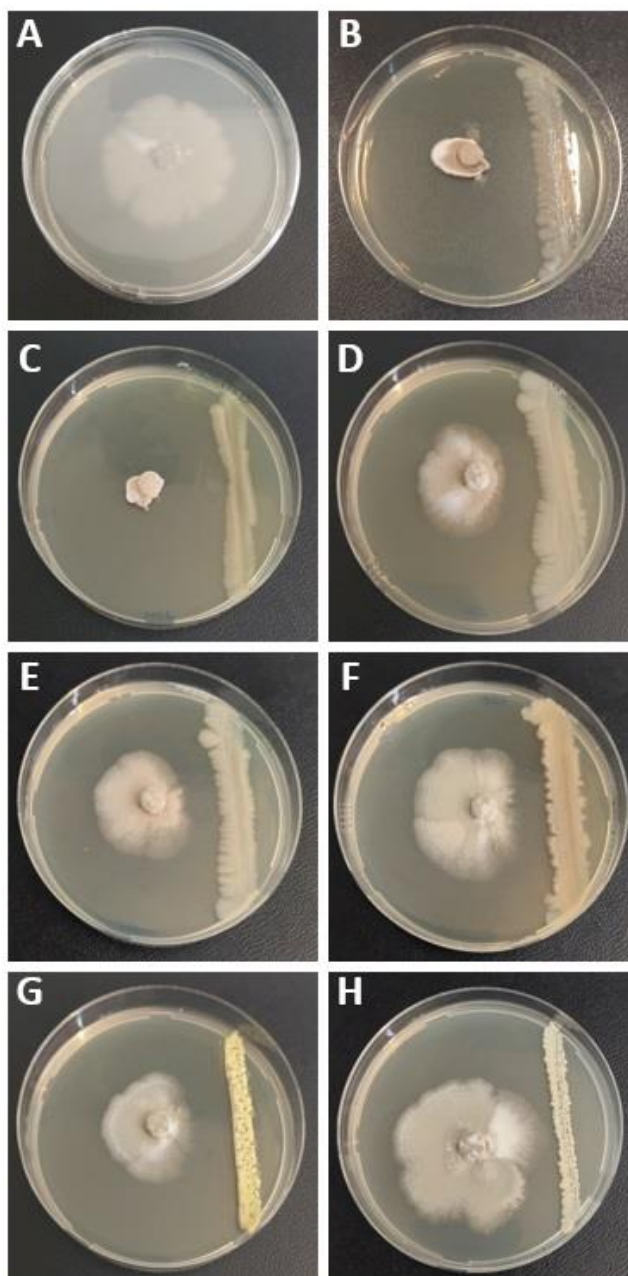
$$\text{Inhibicija rasta [\%]} = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{radijalni rast tretmana}}{\text{radijalni rast kontrole}} \right) \right]$$

Inhibicija je izražena kao srednja vrijednost s pripadajućim standardnim devijacijama i prikazana u postotcima (%).

4. Rezultati

4.1. Antifungalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* sp.

Antifungalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* sp. prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum* (DSM 2732) određeno je metodom dvojnih kultura te je vidljivo kao smanjenje radijalnog rasta gljive u usporedbi s kontrolom (Slika 4.1.1).



Slika 4.1.1: Antifungalno djelovanje odabranih sojeva *Pseudomonas* sp. prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum*. (A) kontrola, *P. digitatum* (DSM 2732); potpuna inhibicija: (B) 2020_W2-8, (C) 2022_01_SMS-16; izražena inhibicija: (D) 2020_W1-9, (E) 2020_W2-1, (F) 2020_W2-4; slaba inhibicija: (G) 2022_01_SD2-14; nema inhibicije: (H) 2022_01_SD2-2

Dio sojeva *Pseudomonas* sp. se pokazao efikasnim u suzbijanju rasta gljive *P. digitatum*. Sedam sojeva (46,7 %) efikasno inhibira radijalni rast gljive *P. digitatum*, gdje su četiri soja (26,7 %) dovela do potpune inhibicije, a tri soja (20,0 %) su izraženo inhibirala njezin rast. Sojevi 2020_W2-8, 2022_01_SL2-11, 2022_01_SL2-17 i 2022_01_SMS-16 su potpuno inhibirali rast te su se pokazali kao najefikasniji u kontroli rasta gljive *P. digitatum*. U sojeve koji izraženo inhibiraju radijalni rast spadaju: 2022_W2-4 (redukcija radijalnog rasta od $55,5 \pm 1,4$ %), 2020_W2-1 (redukcija radijalnog rasta od $52,8 \pm 7,3$ %) i 2020_W1-9 (redukcija radijalnog rasta od $47,4 \pm 0,0$ %).

Preostali sojevi (53,3 %) slabo ili uopće ne utječu na rast *P. digitatum*. Od toga šest soja (40,0 %) su slabo inhibirali radijalni rast gljive, gdje se redukcija radijalnog rasta gljive kretala u rasponu od $2,9 \pm 4,2$ % do $32,6 \pm 3,7$ %. Konačno, dva soja (13,3 %) uopće nisu utjecala na rast gljive *P. digitatum* (tablica 4.1.1).

Tablica 4.1.1: Antifugalno djelovanje sojeva *Pseudomonas* sp. prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum* (DSM 2732). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti redukcije radijalnog rasta

Soj	Vrsta	Inhibicija radijalnog rasta (%)	Inhibicija
2020_W1-9	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	$47,4 \pm 0,0$	++
2020_W2-1	<i>Pseudomonas jessenii</i>	$52,8 \pm 7,3$	++
2020_W2-4	<i>Pseudomonas</i> sp.	$55,5 \pm 1,4$	++
2020_W2-8	<i>Pseudomonas</i> sp.	$100,0 \pm 0,0$	p.i.
2022_01_SD2-2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	$0,0 \pm 0,0$	n.i.
2022_01_SD2-14	<i>Pseudomonas</i> sp.	$31,6 \pm 0,0$	+
2022_01_SL2-11	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	$100,0 \pm 0,0$	p.i.
2022_01_SL2-17	<i>Pseudomonas corrugata</i>	$100,0 \pm 0,0$	p.i.
2022_01_SMS-16	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	$100,0 \pm 0,0$	p.i.
2022_02_W1-11	<i>Pseudomonas</i> sp.	$32,6 \pm 3,7$	+
KB02_K1-2	<i>Pseudomonas</i> sp.	$5,1 \pm 0,2$	+
KB02_K1-3	<i>Pseudomonas</i> sp.	$0,0 \pm 0,0$	n.i.
KB02_K1-6	<i>Pseudomonas mendocina</i>	$8,5 \pm 3,7$	+
KB02_K1-9	<i>Pseudomonas putida</i>	$5,7 \pm 0,2$	+
KB02_K2_2	<i>Pseudomonas putida</i>	$2,9 \pm 4,2$	+

p.i. = potpuna inhibicija (100 %); +++ = vrlo jaka inhibicija (70 do < 100 %); ++ = izražena inhibicija (40 do < 70 %); + = slaba inhibicija (>0 do < 40 %); n.i. = nema inhibicije (0 %)

5. Zaključak

U ovom istraživanju ispitano je antifungalno djelovanje autohtonih sojeva *Pseudomonas* sp. izoliranih iz različitih ekosustava prema fitopatogenoj gljivi *P. digitatum* koja inficira agrume i posljedično, uzrokuje značajne gubitke u posliježetvenom razdoblju i smanjenje njihove tržišne vrijednosti.

Ovim pristupom procijenjen je njihov potencijal kao alternativnog i ekološki prihvatljivog biološkog preparata za kontrolu rasta i suzbijanje fitopatogene gljive te je utvrđeno:

- općenito, autohtoni sojevi *Pseudomonas* sp. (46,7 %) pokazali su se efikasni u kontroli rasta i suzbijanju gljive *P. digitatum*
- dio sojeva *Pseudomonas* sp. (26,7 %) potpuno je suzbio tj. potpuno inhibirao rast gljive *P. digitatum*, dok je dio izraženo inhibirao (20,0%) fungalni rast
- značajan udio sojeva *Pseudomonas* sp. (40,0 %) je slabo inhibirao rast gljive *P. digitatum*, gdje se redukcija rasta gljive kretala u rasponu od $2,9 \pm 4,2$ % do $32,6 \pm 3,7$ %
- svega 13,3 % sojeva *Pseudomonas* sp. uopće nisu djelovao na rast gljive *P. digitatum*
- u pravilu, sojevi *Pseudomonas* sp. izolirani iz spilje su efikasniji u kontroli rasta i suzbijanju gljive *P. digitatum* u usporedbi sa sojevima izoliranim iz rizosfere zelene salate
- sojevi 2020_W2-8, 2022_01_SL2-11, 2022_01_SL2-17 i 2022_01_SMS-16 su u potpunosti suzbili fungalni rast i kao takvi su se pokazali kao najbolji kandidati za primjenu u obliku bioloških preparata
- dodatne analize, kao što su određivanje antimikrobnog djelovanja ispitanih sojeva *Pseudomonas* sp. na druge fitopatogene od ekonomskog značaja, analiza preživljavanja u različitim ekofiziološkim uvjetima, *in vivo* ispitivanje utjecaja autohtone mikrobiote na preživljavanje sojeva apliciranih u obliku bioloških preparata, nužan su preduvjet za potpunu evaluaciju njihove potencijalne primjene

6. Popis literature

1. Ali S., Hameed S., Shahid M., Iqbal M., Lazarovits G., Imran A. (2020). Functional characterization of potential PGPR exhibiting broad-spectrum antifungal activity. *Microbiological Research*. 232: 126389. doi:10.1016/j.micres.2019.126389
2. ARBICO Organics (2024). Biopesticides. <https://www.arbico-organics.com/> (pristupljeno 17. srpnja 2024.)
3. Bačani M., Odorčić V., Mrkonjić Fuka M., Tanuwidjaja I. (2024). Zastupljenost enterobakterija u rizosferi ekološki uzgojene salate. *Glasnik zaštite bilja*. 47(4): 14-21.
4. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. (2016). *Rutaceae*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/Rutaceae> (pristupljeno 5. srpnja 2024.)
5. Bryk H., Dyki B., Sobiczewski P. (2004). Inhibitory effect of *Pseudomonas* spp. on the development of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Plant Protection Science*. 40(4): 128-134. doi:10.17221/467-PPS
6. Chalutz E., Wilson C.L. (1990). Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*. 74(2): 134-137. doi:10.1094/PD-74-0134
7. Cheng Y., Lin Y., Cao H., Li Z. (2020). Citrus Postharvest Green Mold: Recent Advances in Fungal Pathogenicity and Fruit Resistance. *Microorganisms*. 8(3): 449. doi:10.3390/microorganisms8030449
8. Cole A.L.J., Wood R.K.S. (1970). The infection of oranges by *Trichoderma viride* and mixed infection by *Trichoderma viride* and *Penicillium digitatum*. *Annals of Applied Biology*. 66(1): 75-82. doi:10.1111/j.1744-7348.1970.tb04604.x
9. El-Otmani M., Ait-Oubahou A., Zacarías L. (2011). 21 - Citrus spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime. U: *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits Volume 2: Açai to citrus* (Yahia E.M., ur.), Woodhead Publishing, 437-516e. doi:10.1533/9780857092762.437
10. European Commission (2024). Integrated Pest Management (IPM). Food, plants and pesticides. https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/integrated-pest-management-ipm_en (pristupljeno 7. srpnja 2024.)
11. FAOSTAT (2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize/> (pristupljeno 8. srpnja 2024.)
12. Ferreira F.V., Bello F., Rivadeneira M. F., Vázquez D., Musumeci M.A. (2023). Biological control - Biocontrol of *Penicillium digitatum* by native *Bacillus* and *Pseudomonas* strains isolated from orange peel. *Biological Control*. 186: 105340. doi:10.1016/j.biocontrol.2023.105340
13. Funck Jensen D., Dubey M., Jensen B., Karlsson M. (2022). *Clonostachys rosea* to control plant diseases. U: *Microbial bioprotectants for plant disease management* (Köhl J., Ravensberg W.J., ur.), Burleigh Dodds Science Publishing, 1-43. doi:10.19103/AS.2021.0093.14

14. Gao P., Qin J., Li D., Zhou S. (2018). Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. PLoS ONE. 13(1): e0190932. doi:10.1371/journal.pone.0190932
15. Gugić J., Cukrov L. (2011). Pregled stanja i perspektiva razvoja hrvatskoga agrumarstva. Pomologia Croatica. 17(3-4): 115-134.
16. Höfte M. (2021). The use of *Pseudomonas* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant disease. U: Microbial bioprotectants for plant disease management. (Köhl J., Ravensberg W.J., ur.), Burleigh Dodds Science Publishing, 1-74. doi:10.19103/AS.2021.0093.11.
17. Kazempour M.N., Kodehi H.J. (2007). Biological control of *Penicillium digitatum* on citrus with antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Biology and Biotechnology. 4(4): 383-309.
18. Kloepper J.W., Schroth M.N. (1978): Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. U: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Volume II. Angers, 879 – 882.
19. Lallemand Plant Care (2024). Products. <https://www.lallemandplantcare.com/en/usa/products/product-details/bio-save-10-lp/> (pristupljeno 17. srpnja 2024.)
20. Lamichhane J.R., Venturi V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. Frontiers in Plant Science. 6: 385. doi:10.3389/fpls.2015.00385
21. Luo W., Posny D., Kriss A.B., Graham J.H, Poole G.H., Taylor E.L., McCollum G., Gottwald T.R., Bock C.H. (2020). Seasonal and post-harvest population dynamics of the Asiatic citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on grapefruit in Florida. Crop Protection. 137: 105227. doi:10.1016/j.cropro.2020.105227
22. Mercado-Blanco J., Bakker P.A.H.M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie Van Leeuwenhoek. 92: 367-389. doi: 10.1007/s10482-007-9167-1
23. Ministarstvo poljoprivrede šumarstva i ribarstva. (2022). Godišnje izvješće o stanju poljoprivrede u 2022. godini (Zeleno izvješće za 2022.). Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za poljoprivrednu politiku, EU i međunarodnu suradnju, Zagreb. Preuzeto sa: <https://poljoprivreda.gov.hr/istaknute-teme/poljoprivreda-173/poljoprivredna-politika/agroekonomske-analize/zeleno-izvjesce/189> (pristupljeno 10. srpnja 2024.)
24. Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V.A.P., Pieper D.H., Ramos J.L., Palleroni N.J. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. Prokaryotes. 6: 646-703. doi:10.1007/0-387-30746-x_21
25. Mougou I., Boughalleb-M'hamdi N. (2018). Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 28: 60. doi:10.1186/s41938-018-0061-0

26. Palou L. (2014). *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green mold, Blue mold). U: Postharvest decay. Control Strategies. (Bautista-Baños S., ur.), Academic Press, Elsevier Inc., London, 45-102. doi:10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8
27. Peberdy J.F., ur. (2013). *Penicillium* and *Acremonium*. Biotechnology Handbooks Volume 1. Springer, New York. doi:10.1007/978-1-4899-1986-1
28. Pereira Gonzatto M., Scherer Santos J. (2023). Citrus Research - Horticultural and Human Health Aspects. IntechOpen Limited, London. doi: 10.5772/intechopen.100891
29. Pomerix (2024). Pesticide database. <https://www.pomerix.com/> (pristupljeno 17. srpnja 2024.)
30. Ram R.M., Keswani C., Bisen K., Tripathi R., Singh S.P., Singh H.B. (2018). Biocontrol technology: Eco-Friendly Approaches for Sustainable Agriculture. U: Omics Technologies and Bio-Engineering Volume 2: Towards Improving Quality of Life (Barh D., Azevedo V., ur.), Academic Press, 177-190. doi:10.1016/B978-0-12-815870-8.00010-3
31. Saccardo P.A. (1881). Fungi Italici Autographice Delineati (additis nonnullis extra-Italicis, asterisco notates). Fascs 17-28. Tabs 641–1120.
32. Smilanick J.L., Denis-Arrue R. (1992). Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. Plant Disease. 76(5): 481-485 ref. 47. doi:10.1094/PD-76-0481
33. Smith I.M., Dunez J., Phillips D.H., Lelliott R.A., Archer, S.A. (1988). European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications, Oxford
34. Snowdon A.L. (1990). Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables: Volume 1: General Introduction and Fruits. CRC Press, London. doi:10.1201/b18214
35. Sobota M. (2023). Potencijal vrsta roda *Pseudomonas* izoliranih iz spilje u inhibiciji patogene mikrobiote. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb
36. Stockwell V.O., Stack J.P. (2007). Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. Phytopathology. 97(2): 244-249. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0244
37. Strano M.C., Altieri G., Allegra M., Di Renzo G.C., Paterna G., Matera A., Genovese F. (2022). Postharvest Technologies of Fresh Citrus Fruit: Advances and Recent Developments for the Loss Reduction during Handling and Storage. Horticulturae. 8(7): 612. doi:10.3390/horticulturae8070612
38. Talibi I., Boubaker H., Boudyach E.H., Ait Ben Aoumar A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. Journal of Applied Microbiology. 117(1): 1-17. doi: 10.1111/jam.12495
39. Tanapichatsakul C., Pansanit A., Monggoot S., Brooks S., Prachya S., Kittakoop P., Panuwet P., Pripdeevech P. (2020). Antifungal activity of 8-methoxynaphthalen-1-ol isolated from the endophytic fungus *Diatrype palmicola* MFLUCC 17-0313 against the plant pathogenic fungus *Athelia rolfsii* on tomatoes. PeerJ. 8: e9103. doi:10.7717/peerj.9103

40. Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.-B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T., Samson R.A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 78(1): 343-371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001
41. Waage J.K., Greathead D.J. (1988). Biological control: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*. 318(1189): 111-128. doi:10.1098/rstb.1988.0001
42. Wang X., Zhou X., Cai Z., Guo L., Chen X., Chen X., Liu J., Feng M., Qiu Y., Zhang Y., Wang A. (2021). A Biocontrol Strain of *Pseudomonas aeruginosa* CQ-40 Promote Growth and Control *Botrytis cinerea* in Tomato. *Pathogens*. 10(1): 22. doi:10.3390/pathogens10010022
43. Wang Z., Jiang M., Chen K., Wang K., Du M., Zalán Z., Hegyi F., Kan J. (2018). Biocontrol of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus fruits by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Food Quality*. 2018(1): 2910481. doi:10.1155/2018/2910481
44. Zacarias L., Cronje P.J.R., Palou L. (2020). Postharvest technology of citrus fruits. U: *The Genus Citrus*. (Talon M., Caruso M., Gmitter F.G., ur.), Woodhead Publishing, 421-446. doi:10.1016/B978-0-12-812163-4.00021-8
45. Zamani M., Tehrani A.S., Ahmadzadeh M., Behboodi K., Hosseiniaveh V. (2008). Biological control of *Penicillium digitatum* on oranges using *Pseudomonas* spp. either alone or in combination with hot sodium bicarbonate dipping. *Australasian Plant Pathology*. 37: 605-608. doi:10.1071/AP08065

Životopis

Iva Kavain rođena je 15.2.2003. godine u Zadru. Osnovnu školu pohađala je u Osnovnoj školi „Šimuna Kožičića Benje” u Zadru od 2009. do 2017. Godine nakon čega upisuje Poljoprivrednu, prehrambenu i veterinarsku srednju školu Stanka Ožanića, smjer tehničar nutricionist, također u Zadru. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjeluje u izvannastavnoj aktivnosti „Folklor”, a tijekom osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja stekla je B2 razinu engleskog jezika te poznavanje rada na računalu. Završetkom srednjoškolskog obrazovanja, 2021. godine upisuje prijediplomski sveučilišni studij Fitomedicina na Agronomskom fakultetu u Zagrebu kojeg završava 2024. godine. Sudjeluje u izvannastavnoj aktivnosti „Entomološka grupa”, a tijekom akademske godine 2023./24. odradila je stručnu praksu na Zavodu za herbologiju, Zavodu za fitopatologiju te na Zavodu za poljoprivrednu zoologiju gdje je stekla praktična znanja iz područja agronomske struke.