

Utjecaj biološkog preparata na zarazu klijanaca pšenice s *Fusarium graminearum*

Sažetak

Dosadašnji načini kontrole uzročnika bolesti koji, među ostalim, podrazumijevaju uporabu fungicida prema novim zakonodavnim okvirima i novim strategijama u biljnom zdravlju nailaze na sve veće restrikcije. Pronalaženje nekemijskih sredstava za zaštitu usjeva od bolesti je od velikog interesa za poljoprivrednu proizvodnju, stoga je u našem istraživanju ispitan učinak novog biološkog preparata (BP) za kontrolu gljive *Fusarium graminearum* na klijancima pšenice. Biološki preparat primijenjen je na tri različita načina: inokulacijom zrna pšenice, zalijevanjem, te inokulacijom zrna i zalijevanjem. Utvrđeno je kako se intenzitet bolesti primjenom BP smanjuje, a najbolji rezultati dobiveni su inokulacijom zrna prije sjetve dok je zalijevanje površine BP polučilo slabije rezultate. Također, ukoliko je zrno već tretirano biološkim preparatom dodatna aplikacija zalijevanjem nije bila opravdana ni s ekološkog ni s ekonomskog aspekta.

Ključne riječi: biološki preparat, *Fusarium graminearum*, pšenica, zrno

Uvod

Kako proizvesti što više hrane vodeći računa o očuvanju okoliša i zdravlju ljudi predstavlja jedan od glavnih izazova suvremene poljoprivrede. Znanstvenici kontinuirano pronalaze nove metode u cilju smanjenja prekomjerne upotrebe kemijskih sredstava za zaštitu bilja i mineralnih gnojiva. Jednu od metoda čini uporaba prirodnih prirodnih bioloških preparata/biostimulatora biljaka (Colla i Rouphael, 2015). Sastavni dio biostimulatora su tvari organskog podrijetla i/ili mikroorganizmi koji primjenom povoljno djeluju na kvalitetu usjeva budući da poboljšavaju rast i razvoj biljke, usvajanje hranjivih tvari te smanjuju stres. Biološki aktivne tvari biostimulatora su huminske i fulvinske kiseline, proteinski hidrolizati, hitozan i drugi biopolimeri, anorganski spojevi, ekstrakti morskih algi, botanički pripravci, spojevi koji sadrže dušik te korisne gljive i bakterije (du Jardin, 2015; Rouphael i Colla, 2020). U 60 % slučajeva BP se primjenjuju folijarno, zatim primjenom na tlo, na korijenje ili u hidroponski medij te najmanje na sjeme (oko 10 % slučajeva) (Wozniak i sur., 2020). Brojne studije pokazale su pozitivno djelovanje različitih BP na rast, prinos i kvalitetu zrna pšenice (Al Majathoub, 2004; Khalid i sur., 2004; Shah i sur., 2013; Orzali i sur., 2014; Khan i sur., 2017). Kako se poboljšava vigor biljaka i one bivaju vitalnije tako se i mogućnost zaraze smanjuje pa takvi preparati mogu poslužiti i kao određena zaštita od uzročnika bolesti (Chalfoun i sur., 2018; Kumaraswamy i sur., 2018) bez negativnog utjecaja na kemijska i biološka svojstva tla (Patkowska, 2021). Jedan od najvažnijih patogena pšenice jest *Fusarium graminearum* koja uzrokuje različite tipove bolesti, a izvor zaraze je zaraženo zrno ili tlo. Ukoliko gljive iz roda *Fusarium* inficiraju biljku u početnim fazama rasta simptomi su trulež i propadanje sjemena te palež klice i korjenčića (Čosić i Vrandečić, 2003). Prema Gunupuru i sur., (2019) biološki preparat pripremljen od smeđih morskih algi *Ascophyllum nodosum* uz dodatak hitozana pokazao je inhibitorno djelovanje prema *Fusarium graminearum* te smanjio razinu mikotoksina. Slijedom navedenog cilj našeg rada bio je utvrditi utjecaj novog biološkog preparata koji je u fazi laboratorijskog ispitivanja na supresiju pojave fuzarijske paleži klijanaca pšenice nakon umjetne infekcije s *F. graminearum*.

¹ Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga, 1, 31000 Osijek, Hrvatska
Autor za korespondenciju: kvrandecic@fazos.hr

Materijali i metode

U laboratorijskom pokusu je korišten biološki preparat (BP) na bazi ekstrakta kapsaicina koji je dokazan kao prirodni fungicid (El-Desouky i Hussain, 2022).

Pokus je postavljen u 6 tretmana i 4 kontrolne varijante kako slijedi:

T1 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice inokuliranih s biološkim preparatom BP

T2 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice inokuliranih s BP i zalijevanje s BP jednokratno nakon sjetve

T3 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice potopljenih u destiliranu vodu i zalijevanje s BP jednokratno nakon sjetve

T4 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* i dodatno zaliven inokulumom *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice inokuliranih s BP

T5 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* i dodatno zaliven inokulumom *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice inokuliranih s BP i zalijevanje s BP jednokratno nakon sjetve

T6 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* i dodatno zaliven inokulumom *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice potopljenih u destiliranu vodu i zalijevanje s BP jednokratno nakon sjetve

K1 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice potopljenih u destiliranu vodu

K3 - Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* i dodatno zaliven inokulumom *F. graminearum* + sjetva zrna pšenice potopljenih u destiliranu vodu

K5 - sjetva zrna pšenice potopljenih u destiliranu vodu u sterilni pijesak

K6 - sjetva zrna pšenice inokuliranih s BP u sterilni pijesak

Za inokulaciju supstrata (sterilni pijesak) korišten je izolat *F. graminearum*. Supstrat je zaražen na dva načina (zaraženim zrnima pšenice i zalijevanjem suspenzijom micelija u sterilnoj destiliranoj vodi).

Sterilni supstrat kontaminiran zrnima pšenice zaraženim s *F. graminearum* je pripremljen na način da su u sterilni pijesak stavljena zaražena zrna s *F. graminearum*. Supstrat je navlažen i posudice su držane u termostatu na 22 °C 48 h prije sjetve. Zaražena zrna koja su korištena za kontaminaciju supstrata su pripremljena prema metodi Snijders i Eeuwijk (1991.). Zrna pšenice namočena su u vodi preko noći. Sljedećeg dana višak vode je dekantiran i zrna su autoklavirana i inokulirana izolatom *F. graminearum*. Inokulirana zrna inkubirana su tri tjedna na 25 °C, zaštićena od sunčeve svjetlosti. Zaražena zrna su stavljena u posudice s pijeskom (10 zrna/ posudici).

U tretmanima s dodatnim zalijevanjem suspenzijom micelija u sterilnoj destiliranoj vodi za pripremu suspenzije korištene su 7 dana stare kulture *F. graminearum*. U 40 ml destilirane vode dodan je micelij iz jedne Petrijeve zdjelice (promjer 9 cm). Micelij je sastrugan sterilnim skalpelom te je miksanjem homogeniziran. Svaki red zrna koja su zasijana je zaliven s 5 ml inokuluma *F. graminearum*.

Za sjetvu je korištena pšenica sorte Žitarka. Zrna za sjetvu su dezinficirana na način da su prvo isprana pod mlazom tekuće vode, nakon toga 1 min. su držana u otopini 70 % etanola i potom su isprana dva puta po jednu minutu destiliranom vodom i posušena na sterilnom filter papiru. Dezinficirana zrna su potopljena u otopinu biološkog preparata (BP) u trajanju od 2 sata (5 ml BP/200 zrna). Kontrolna zrna su držana u destiliranoj vodi. Za sjetvu je korišteno 20 zrna po posudici. U tretmanima zalijevanja s BP jednokratno nakon sjetve, nakon sjetve posijana su zrna zalivena s 5 ml biološkog preparata po redu. Za zalijevanje je korišten razrijeđeni biološki preparat u omjeru 1:3.

Posudice u kojima je postavljen pokus su držane u klima komori na temperaturi 22 °C i svjetlosnom režimu 12 sati dan/12 sati noć. Pokus je redovito zalijevan s destiliranom vodom. Nakon dvadeset dana klijanci su izvađeni iz posudica, intenzitet zaraze je ocijenjen ocjenama od 0 do 5 te je izračunat indeks bolesti prema McKinney (1923).

$$I = (\sum(n \times k)) / (N \times K) \times 100$$

n – broj biljaka po kategorijama

k – broj pojedine kategorije

N – broj svih ispitanih biljaka

K – broj usvojenih kategorija

Rezultati i rasprava

Preliminarnim istraživanjem utjecaja novog biološkog preparata na razvoj paleži klijanaca pšenice pri umjetnoj infekciji s *F. graminearum* utvrđeno je antifungalno djelovanje na *F. graminearum*. Istraživanje je uključivalo 6 tretmana i 4 kontrole u različitim kombinacijama upotrebe BP kako bi se utvrdio najbolji način primjene istoga. Stupanj zaraze s *F. graminearum* (Slika 1.) je varirao ovisno o tretmanu, a najbolji učinak utvrđen je u tretmanu T1 gdje je zrno tretirano s BP posijano u supstrat u kojemu su se već nalazila zrna pšenice zaražena s *F. graminearum*. Indeks bolesti iznosio je 11,7 (Tablica 1.). Tretman T2 razlikovao se od T1 po tome što se BP primjenjivao na površinu (zalijevanjem) kontaminiranog supstrata i utvrđena je manja učinkovitost na razvoj bolesti (indeks bolesti je bio 20, Slika 2.). U tretmanima gdje je zaraza dodatno osigurana zalijevanjem s *F. graminearum*, samo tretiranje zrna biološkim preparatom T4 (indeks bolesti 23,3) pokazalo je bolje djelovanje nego li ono u kojemu je BP primijenjen samo zalijevanjem po površini T6 (indeks bolesti 34,6).



Slika 1. Stupnjevi zaraženosti klijanaca pšenice s *F. graminearum*
Picture 1. *F. graminearum* infection degrees on wheat seedlings

Izvor/source: Vlastiti izvor/Own source



Slika 2. Primjena BP natapanjem zrna (T1) i zalijevanjem po površini supstrata (T3)

Picture 2. Application of BP by soaking grains (T1) and watering the surface of the substrate (T3)

Izvor/source: Vlastiti izvor/Own source

Tablica 1. Utjecaj tretmana na intenzitet bolesti

Table 1. Influence of treatments on disease intensity

Tretman		Indeks bolesti
T1	zaraženo zrno/zrna s BP	11,7
T2	zaraženo zrno/zrno s BP/zalijevanje BP	20,0
T3	zaraženo zrno/zalijevanje BP	20,0
T4	zaraženo zrno/zrno s BP/zalijevanje <i>Fusarium</i>	23,3
T5	zaraženo zrno/zrno s BP/zalijevanje <i>Fusarium</i> /zalijevanje BP	25,8
T6	zaraženo zrno/zalijevanje <i>Fusarium</i> /zalijevanje BP	34,6
K1	zaraženo zrno/voda	38,3
K3	zaraženo zrno/zalijevanje <i>Fusarium</i> /voda	47,5
K5	zrno s vodom u sterilni pijesak	10,0
K6	zrno s BP u sterilni pijesak	0,0

U posljednje vrijeme različiti BP upotrebljavaju se za tretiranje sjemena te se zbog sve većeg interesa provode različita istraživanja kako bi se utvrdio učinak tih tretmana (Colla i sur., 2017). Prema Gaidau i sur. (2013) ukoliko se provodi tretiranje sjemena BP potrebno je da preparat koji se primjenjuje dezinficira i štiti sjeme od uzročnika bolesti i štetnika u tlu, ne zagađuje ekosustav, ne sadrži štetne ostatke, da je biorazgradiv te da je jednostavan za upotrebu i transport. Biološki preparati razlikuju se po sastavu aktivnih tvari pa su i odgovori biljka i sjemenskog materijala na učinkovitost takvih preparata različiti (Colla i sur., 2015). Jedan od vrlo učinkovitih načina upotrebe bio preparata jest oblaganje sjemena u svrhu zaštite biljaka od bolesti (Sarkar i sur., 2018, Ferreira i sur., 2021). Orzali i sur. (2014) tretirali su sjeme pšenice BP te time smanjili oboljenje gljivom *F. graminearum* i poboljšali prinos, dok su Gaidau i sur. (2013) zaključili kako primjena fungicida s hidrolizatima na bazi kolagena, kao i mješavina

fungicid-insekticida s hidrolizatima na bazi kolagena djeluje na znatno smanjenje potrebe za kemijskim sredstvima za zaštitu bilja na sjeme žitarica. Schmitt i sur. (2009) ističu kako tretirani sjemena zahtijevaju znatno manje količine aktivnih sastojaka po hektaru u odnosu na folijarne tretmane, povećavaju klijavost i rast biljaka za razliku od netretiranog sjemena. Indeks bolesti u našem preliminarnom istraživanju je u kontrolnoj varijanti bio od 38,3 (K1) do 47,5 (K3), a u varijantama gdje je primijenjen BP za oblaganje zrna indeks bolesti je bio znatno manji. Također je utvrđeno da su ti klijanci bujnijeg rasta (Slika 3.).



Slika 3. Kontrola sa zaraženim zrnima pšenice (K1) i kontrola sa zrnima tretiranim biološkim preparatom (K6)

Picture 3. Control of infected wheat grains (K1) and control of grains treated with biological preparation (K6)

Izvor/source: Vlastiti izvor/Own source

Zaključak

Primjena biološkog preparata utjecala je na smanjenje intenziteta bolesti uzrokovane gljivom *F. graminearum*. Za najbolje rezultate preporuča se BP aplicirati na zrno pšenice prije sjetve što predstavlja vrlo jednostavan i ekonomičan način upotrebe za poljoprivrednike. Zbog sve veće rezistentnosti patogena na fungicide i opterećenje ekosustava upotrebom kemikalija vrlo je važno da poljoprivredni proizvođači u Republici Hrvatskoj prepoznaju potencijal ovakve vrste proizvoda za zaštitu sjemena ratarskih kultura. Također, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdio spektar djelovanja biološkog preparata.

Literatura

- Al Majathoub, M. (2004) Effect of biostimulants on production of wheat (*Triticum aestivum* L.). U: Cantero-Martínez, C. and Gabiña, D. (ur.) Mediterranean Rainfed Agriculture: Strategies for Sustainability, CIHEAM, Zaragoza, 147-150.
- 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. *Frontiers in Plant Science*, 8. DOI: 10.3389/fpls.2017.02202.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., Rouphael, Y. (2015) Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.08.037.
- Colla, G. and Rouphael, Y. (2015) Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 1-2. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.10.044.
- Chalfoun, N.R., Durman, S.B., González-Montaner, J., Reznikov, S., De Lisi, V., González, V., Moretti, E.R., Devani, M.R., Ploper, L.D., Castagnaro, A.P., Welin, B. (2018) Elicitor-Based Biostimulant PSP1 Protects Soybean Against Late Season Diseases in

- Field Trials. *Frontiers in Plant Science*, 9, 763. DOI: 10.3389/fpls.2018.00763.
- Čosić, J., Vrandečić, K. (2003) Fuzarijske bolesti pšenice. *Glasilo biljne zaštite*, 5, 284-288.
- du Jardin, P. (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- El-Desouky, T., i Hussain, H. B. (2022). Influence of natural capsaicin on aflatoxins produced by *Aspergillus aflatoxiformans* in grains. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(1), 98-108. DOI: 10.1080/03235408.2021.1999749
- Ferreira, A., Melkonyan, L., Carapinha, S., Ribeiro, B., Figueiredo, D., Avetisova, G., Gouveia, L. (2021) *Biostimulant and biopesticide potential of microalgae growing in piggery wastewater. Environmental Advances*, 4, 100062. DOI: 10.1016/j.envadv.2021.100062
- Gaidau, C., Niculescu, M., Stepan, E., Epure, D.-G., Gidea, M. (2013) New mixes based on collagen extracts with bioactive properties, for treatment of seeds in sustainable agriculture. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(9), 792-801.
- Gunupuru, L.R., Patel, J.S., Sumarah, M.W., Renaud, J.B., Mantin, E.G., Prithiviraj, B. (2019) A plant biostimulant made from the marine brown algae *Ascophyllum nodosum* and chitosan reduce *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination in wheat. *PLoS ONE*, 14(9), e0220562. DOI: 10.1371/journal.pone.0220562.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A. (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 473-480. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02161.x.
- Khan, S., Basra, S. M. A., Afzal, I., Wahid, A. (2017) Screening of moringa landraces for leaf extract as biostimulant in wheat. *International Journal of Agriculture & Biology*, 19, 999-1006. DOI: 10.17957/IJAB/15.0372.
- Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Choudhary, R. C., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., Saharan, V. (2018) Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: A sustainable biostimulant for plant. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 59-69. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.20.
- Mckinney, H.H. (1923) A new system of grading plant diseases. *Journal of Agricultural Research*, 26, 195–218.
- Orzali, L., Forni, C., Riccioni, L. (2014) Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Science and Technology*, 42(2), 132–149. DOI: 10.15258/sst.2014.42.2.03
- Patkowska, E. (2021) Biostimulants Managed Fungal Phytopathogens and Enhanced Activity of Beneficial Microorganisms in Rhizosphere of *Scorzonera* (*Scorzonera hispanica* L.). *Agriculture*, 11(4), 347. DOI:10.3390/agriculture11040347
- Rouphael, Y., and Colla, G. (2020) Biostimulants in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 40. DOI: 10.3389/fpls.2020.00040
- Sarkar, G., Jatar, N., Goswami, P., Cyriac, R., Suthindhiran, K., Jayasri, M. A. (2018) Combination of different marine algal extracts as biostimulant and biofungicide. *Journal of Plant Nutrition*, 41(9), 1163–1171. DOI: 10.1080/01904167.2018.1434201.
- Schmitt, A., Koch, E., Stephan, D., Kromphardt, C., Jahn, M., Krauthausen, H.-J., Forsberg, B., Werner, S., Amein, T., Wright, S.A.I., Tinivella, F., Wolf, J.M. van der Groot, S.P.C. (2009) Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Phoma valerianellae* on lamb's lettuce seeds. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(5), 200–207. DOI: 10.1007/BF03356311.
- Shah, M. T., Zodape, S. T., Chaudhary, D. R., Eswaran, K., Chikara, J. (2013) Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 36(2), 192–200. DOI:10.1080/01904167.2012.737886.
- Snijders, C. H. A., and Van Eeuwig, F. A. (1991) Genotype x strain interactions for resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(2), 239–244. DOI: 10.1007/bf00215729.
- Wozniak, E., Blaszczak, A., Wiatrak, P., Canady, M. (2020) Biostimulant Mode of Action: Impact of Biostimulant on Whole Plant Level. U: Geelen, D., Xu, L. (ur.) *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, 205–227. DOI: 10.1002/9781119357254.ch8.

Prispjelo/Received: 8.3.2021.

Prihvaćeno/Accepted: 21.3.2022.

Professional paper

Influence of biological preparation on wheat seedlings infection with *Fusarium graminearum*

Abstract

Current methods of controlling pathogens, which include the use of fungicides under the new legislative framework and new strategies in plant health are facing increasing restrictions. For this reason, finding non-chemical products to protect crops from diseases is of great interest. Our study examined the effect of a new biological preparation (BP) for the control of *Fusarium graminearum* on wheat seedlings. The biological preparation was applied by wheat grain inoculation, watering, grain inoculation and watering. It was found that the disease intensity is reduced by the use of BP and the best results were obtained by inoculation of grains before sowing. Watering the BP on the surface achieved poorer results. Also, if the grain has already been treated with a biological preparation, additional application by watering was not justified from either an ecological or economic point of view.

Key words: biological preparation, *Fusarium graminearum*, wheat, grain