

Biološka kontrola biljnog parazita *Fusarium graminearum* pomoću sinergističkog odnosa *Bacillus subtilis* i ekstrakta *Pellia endiviifolia*

Kosmopolitski rasprostranjena gljiva *Fusarium graminearum* jedna je od najznačajnijih biljnih patogena, jer izaziva propadanje poljoprivredno važnih biljnih kultura kao što su kukuruz, pšenica i ječam. Prethodnim istraživanjima je pokazano da *Bacillus subtilis* proizvodi antifunglane metabolite, kao što su proteaze i iturin A (Baysal et al. 2008; Chen et al. 2008), zbog čega bi mogao naći primenu kao fungicid za zaštitu poljoprivrednih kultura. Takođe, za mahovinu *Pellia endiviifolia* iz klase *Marchantiopsida* je pokazano da inhibitorno deluje na rast *F. latericium* (Jevtić 2002). Zbog navedenih činjenica pretpostavljeno je da bi ekstrakt *P. endiviifolia* mogao inhibitorno da deluje na *F. graminearum* i da bi moglo postojati sinergističko dejstvo između fungicidnih efekata *P. endiviifolia* i *B. subtilis*. U cilju uspostavljanja biološke kontrole biljnog parazita *F. graminearum*, ispitano je sinergističko dejstvo petrolearskog ekstrakta *P. endiviifolia* sa bakterijom *B. subtilis* i inhibitorno dejstvo malih metabolita izolovanih iz fermentacione tečnosti *B. subtilis*. Prisustvom zone inhibicije nakon kokultivacije, potvrđeno je inhibitorno dejstvo *B. subtilis* na rast *F. graminearum*. Takođe, uočeno je sprečavanje formiranja kolonije *F. graminearum* na podlozi na kojoj je prethodno zasejan *B. subtilis*. Utvrđeno je da ekstrakt *P. endiviifolia* inhibira rast *B. subtilis*, kao i da izolovani mali metaboliti *B. subtilis* ne deluju inhibitorno na rast *F. graminearum*.

Uvod

Gljive roda *Fusarium* su kosmopolitski rasprostranjene. Čovek je u svakodnevnom kontaktu sa njihovim konidijama. Proizvode različite grupe metabolita, hormona, mikotoksina, zbog čega su poznate kao biljni patogeni. Na PDA podlozi kolonija *Fusarium graminearum* obrazuje gustu, pamučastu miceliju žute do ružičaste boje sa belom do karmin crvenom ivicom. Pigment u podlozi je karmin crven sa smeđom nijansom. Sporodohije su žute, narandžaste ili crvenosmeđe u starijim kulturama (Ristić 2012). *F. graminearum* jedan je od najznačajnijih biljnih patogena, poznat po tome što izaziva propadanje poljoprivredno važnih biljnih kultura kao što su kukuruz, pšenica i ječam. Fuzariona plesnivost klasova dovodi do značajog smanjenja prinosa i tehnološkog kvaliteta zrna (Bourdages et al. 2010).

Bacillus subtilis je Gram-pozitivna bakterijska vrsta, sveprisutna i široko prilagođena rastu u različitim sredinama unutar biosfere. Može se izolovati iz zemljišta i digestivnog trakta ljudi i životinja. Ekstremne uslove preživljava formirajući izuzetno čvrstu endosporu (Earl et al. 2008). Proizvodi antifunglane metabolite, kao što su proteaze i iturini (Baysal et al. 2008; Chen et al. 2008). Prethodnim istraživanjima je pokazano da *B. subtilis* inhibira rast određenih gljiva, zbog čega bi mogao naći primenu kao fungicid za zaštitu poljoprivrednih kultura (Morikawa 2006).

Biljana Banić (2000), Apatin, Blok 112 S-6
zapad II/10, učenica 2. razreda Gimnazije
„Nikola Tesla” u Apatinu

MENTORI:

Anđelika Kalezić, master student Molekularne biologije, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Zorica Sofilj, student druge godine osnovnih studija Biologije, modul Molekularna biologija, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Mahovine su posle cvetnica druga najveća grupa biljaka. Dejstva njihovih metabolita su nedovoljno proučena, jer ih je teško determinisati i sakupiti dovoljnu količinu materijala za biohemijska istraživanja. Dele se u tri klase: Anthocerotopsida, Marchantiopsida (jetrenjače) i Bryopsida (prave mahovine). Odlikuje ih antibakterijska, antifungalna, citotoksična, antitumorska aktivnost. *Pellia endiviifolia* pripada klasi Marchantiopsida. Za sada je utvrđeno da pokazuje antibakterijsku i piscicidalnu aktivnost. Dokazano je inhibitorno dejstvo petroletarskog ekstrakta *P. endiviifolia* na rast *F. latericum*. Nije utvrđeno koja izolovana jedinjenja deluju antifungalno (Jevtić 2002).

Poštujući principe proizvodnje hrane na organski način, tretiranje biljaka klasičnim fungicidima zamenjuje se biološkom kontrolom parazita, radi povećanja i unapređenja poljoprivredne proizvodnje visokokvalitetne hrane, koja je bezbedna po ljudsko zdravlje. Takođe, time se dugoročno održava i povećava plodnost zemljišta.

Zbog navedenih činjenica pretpostavljeno je da bi ekstrakt *P. endiviifolia* mogao inhibitorno da deluje na *F. graminearum* i da bi moglo postojati sinergističko dejstvo između fungicidnih efekata *P. endiviifolia* i *B. subtilis*. Cilj ovog rada bio je uspostavljanje biološke kontrole biljnog parazita *F. graminearum* pomoću sinergističkog dejstva *B. subtilis* i ekstrakta *P. endiviifolia*. Takođe, ispitivano je inhibitorno dejstvo malih metabolita izolovanih iz fermentacione tečnosti *B. subtilis*.

Materijal i metode

Dobijanje petroletarskog ekstrakta. Biljni material mahovine *P. endiviifolia* sakupljen je u okolini Istraživačke stanice Petnica. Pročišćen je, osušen, maceriran i prosejan kroz sito, da bi se odstranio višak zemlje, neposredno pred analizu. Materijal je ekstrahovan petroletrom (odnos droge i rastvarača 1 : 20). Ekstrakcija je vršena u toku 48 h na sobnoj temperaturi uz često mućkanje. Petroletarski ekstrakt je profiltriran Bihnerovim levkom i uparen na vakuum uparivaču. Zatim je suvi ekstrakt rastvoren u 7 mL petroletra i centrifugiran 20 min. na 2000 rpm, da bi se uklonile krupne nerastvorene nečistoće. Super-

natant je izručen na sahatno staklo, odakle je uparen petroletar. Suvi ostatak je rastvoren u 200 µL DMSO. Ekstrakt je postavljen u ultrazvučno kupatilo na 20 min.

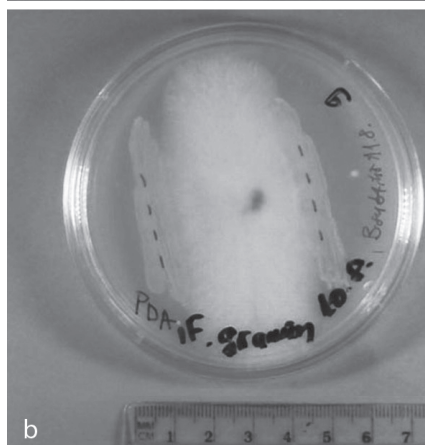
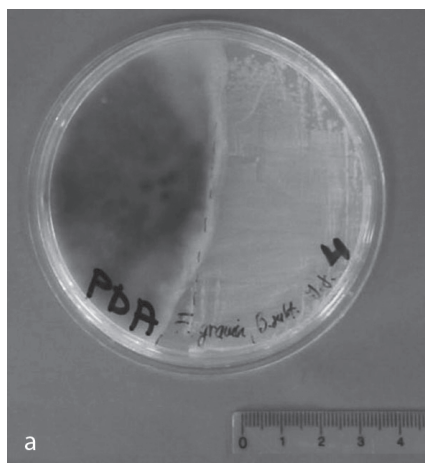
Izolacija iturina. Postavljen je bioreaktor *B. subtilis* dodajući 200 µL bakterijske suspenzije u LB medijum. Nakon dva dana bioreaktor *B. subtilis* je centrifugiran 40 min. na 3000 rpm. Vrednost pH supernatanta je podešena na 2 dodajući 6 M HCl. Supernatant je odložen u frižider preko noći na 4°C. Zatim je centrifugiran 20 min. na 10 000 rpm. Supernatant je dekantovan, a talog rastvoren u 30 mL metanola i ostavljen da se ekstrahuje 6-8 h. Nakon ekstrakcije, centrifugiran je 20 min. na 10000 rpm. Metanol je dekantovan. Talog proteina je osušen na vazduhu, a potom resuspendovan u 200 µL PBS-a čija je vrednost pH 7.3.

Izolacija proteaza. Bioreaktor je centrifugiran na 4000 rpm 30 minuta. Supernatant je dekantovan i stavljen u led. Usledila je precipitacija proteina amonijum sulfatom do 50% zasićenja. Usitnjeno je 147.2 g amonijum sulfata. U supernatant na magnetnoj mešalici je postepeno dodavan amonijum sulfat. Zatim su ćelije centrifugirane na 3000 rpm 1 h. Talog je resuspendovan u 20 µL 20 mM TRIS pufera čija je vrednost pH 8 i rastvor je presipan u crevo za dijalizu, koje je preko noći stajalo uronjeno u 1 L TRIS-a. Preračunat je i napravljen pufer za lizu. Čelijski talog je rastvoren sa puferom za lizu. Čelijski talog je unet u ultrazvučno kupatilo na 10 min, a zatim postavljen na klackalicu oko 1 h. Čelije su resuspendovane u 2 mL vode. Dodato je 2 mg/mL lizozima i ostavljeno 30 min. na hladnom, a zatim je iscentrifugirano na 5000 rpm 10 min.

Zasejavanje kokultura. Inhibitorno dejstvo *B. subtilis* i sinergističko dejstvo *B. subtilis* i ekstrakta *P. endiviifolia* na inhibiciju *F. graminearum*, kao i inhibitorno dejstvo malih metabolita ispitivano je zasejavanjem kokultura na PDA podlogu. Podloge su čuvane na 25°C.

Rezultati

Konfluentno zasejana kultura *B. subtilis* sprečava rast *F. graminearum*, koji se razvija samo na delu podloge gde nije zasejan *B. subtilis* (slika 1a). U kokulturi *B. subtilis* i *F. graminearum*



Slika 1. Antagonistička aktivnost *Bacillus subtilis* na fitopatogen *Fusarium graminearum*, in vitro:

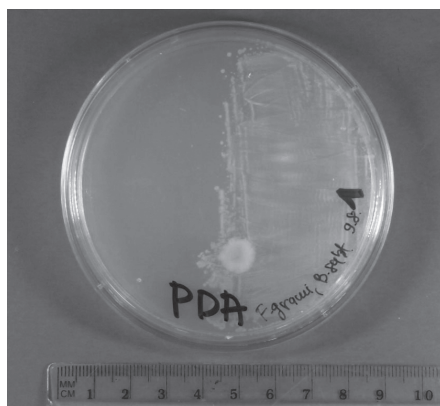
a) *B. subtilis* je konfluentno zasejana na jednoj polovini petri kutije, dok je *F. graminearum* zasejan na drugoj polovini. Rast *F. graminearum* je inhibiran od strane *B. subtilis*.

b) Na PDA medijumu je zasejana *B. subtilis* u obliku dve linije, a u sredini je zasejan *F. graminearum*. Na mestima gde je zasejan *B. subtilis*, rast *F. graminearum* je inhibiran.

Figure 1. In vitro antagonistic activity of *Bacillus subtilis* to the phytopathogen *Fusarium graminearum*:

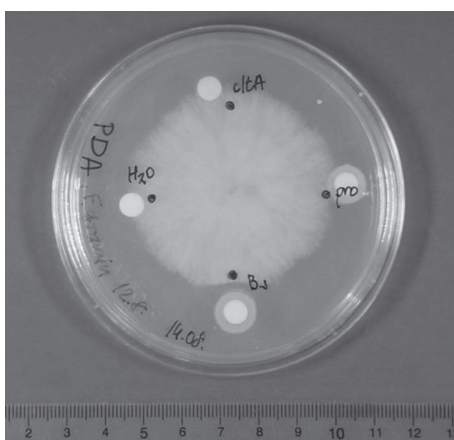
a) *B. subtilis* is sown confluent on one half of the petri dish, whereas *F. graminearum* is sown on the second half. The growth of *F. graminearum* is inhibited by *B. subtilis*.

b) On PDA medium *B. subtilis* is sown as two lines and in the middle *F. graminearum* is sown. The growth of *F. graminearum* is inhibited by *B. subtilis* in places where *B. subtilis* is sown.



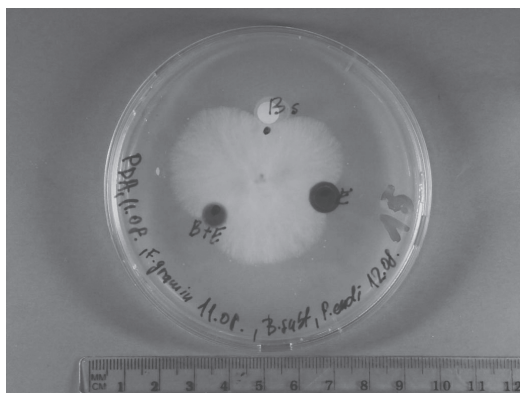
Slika 2. *B. subtilis* je konfluentno zasejana na PDA medijumu. *F. graminearum* je zasejan na mestu gde je prethodno već zasejana kolonija *B. subtilis*. Na taj način je sprečeno formiranje kolonije *F. graminearum*.

Figure 2. *B. subtilis* is sown confluent on PDA medium. *F. graminearum* is sown directly on the already sown colony of *B. subtilis*. In that way, the formation of a *F. graminearum* colony is prevented by *B. subtilis*.



Slika 3. *F. graminearum* je zasejan na sredini petri kutije. Oko njega su postavljeni antibiogram diskovi na kojima su naneti mali metaboliti izolovani iz *B. subtilis* i destilovana voda, kao kontrola. Izolovani mali metaboliti ne pokazuju inhibitorna svojstva na *F. graminearum*.

Figure 3. *F. graminearum* is sown in the middle of a petri dish. Around it are situated antibiogram disks with small metabolites of *B. subtilis* and distilled water, as a control. The isolated small metabolites from *B. subtilis* do not act inhibitory on *F. graminearum*.



Slika 4. Ekstrakt *P. endiviifolia* inhibira rast *B. subtilis*, što ukazuje da ne postoji sinergija među njima

Figure 4. The extract of *P. endiviifolia* inhibits the growth of *B. subtilis*, so there is no synergy between them

došlo je do inhibicije rasta *F. graminearum* (slika 1b). Na konfluentno zasejan *B. subtilis* zasejan je *F. graminearum*. Evidentno je sprečavanje formiranja kolonije *F. graminearum* (slika 2). Zona inhibicije se ne uočava oko predela na koji je postavljen antibiogram disk sa izolovanim malim metabolitima iz fermentacione tečnosti *B. subtilis*, dok zonu inhibicije uočavamo oko mesta na kom je zasejan *B. subtilis* (slika 3). *F. graminearum* prerasta antibiogram disk na koji je nanet ekstrakt *P. endiviifolia* i *B. subtilis*, dok uvidamo zonu inhibicije oko *B. subtilis* (slika 4).

Tabela 1. Inhibitorno dejstvo *B. subtilis* na rast *F. graminearum* (izraženo u procentima u odnosu na kontrolu), koje je procenjeno merenjem prečnika kolonije *F. graminearum* po danima.

Dan	Koncentracija <i>B. Subtilis</i>	
	15 µL	20 µL
1. dan	29.2	/
2. dan	29.4	32.8
3. dan	37.7	8.6

Kao dodatni statistički podatak u tabeli 1 je procentualno izraženo inhibitorno dejstvo *B.*

subtilis na rast *F. graminearum*. Prečnik rasta *F. graminearum* meren je svakog dana i primećeno je da je njegov rast kontrolisan bakterijom *B. subtilis*.

Diskusija

Bacillus subtilis bi se mogao koristiti kao fungicid za zaštitu poljoprivrednih kultura, jer je dokazano da inhibitorno deluje na rast *Fusarium graminearum*. Želeći da otkrijemo mehanizam pomoću koga *B. subtilis* inhibira rast *F. graminearum*, izolovani su mali metaboliti iz fermentacione tečnosti *B. subtilis*, za koje je poznato da poseduju antifungalnu aktivnost. Međutim, utvrđeno je da izolovani metaboliti ne poseduju inhibitorno dejstvo. Smatra se da je uzrok takvih rezultata nedovoljna lokalna koncentracija malih metabolita u ekstraktu. Da bi se dobila veća koncentracija iturina u uzorku u budućim eksperimentima, pretpostavlja se da bi uzorak trebao vremenski duže da se centrifugira i da se preciznije vrši dekantovanje.

Sinergizam između *B. subtilis* i ekstrakta *P. endiviifolia* nije utvrđen. Pretpostavlja se da je uzrok ovakvog rezultata antimikrobna aktivnost određenih jedinjenja iz ekstrakta.

Rezultati pokazuju da treba optimizovati koncentraciju *B. subtilis* koja se koristi u cilju inhibicije rasta *F. graminearum*, jer je pokazano da različite koncentracije imaju različita inhibitorna dejstva.

Zaključak

Prisustvom zone inhibicije nakon kokultivacije, potvrđeno je inhibitorno dejstvo *B. subtilis* na rast *F. graminearum*. Takođe, uočeno je sprečavanje formiranja kolonije *F. graminearum* na podlozi na kojoj je prethodno zasejan *B. subtilis*. Utvrđeno je da ekstrakt *P. endiviifolia* inhibira rast *B. subtilis*, kao i da izolovani mali metaboliti *B. subtilis* ne deluju inhibitorno na rast *F. Graminearum*.

Daljim istraživanjima trebalo bi utvrditi koji metaboliti iz *B. subtilis* poseduju fungicidno dejstvo, kao i koja jedinjenja iz ekstrakta *P. endiviifolia* poseduju fungicidnu ali ne i antimikrobnu aktivnost.

Literatura

- Baysal Ö., Çalışkan M., Yeşilova Ö. 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73** (1-3): 25.
- Bourdages J. V., Marchand S., Bekzile F. J., Rioux S. 2010. Diversity and prevalence of *Fusarium* species from Quebec barley fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **28** (3): 419.
- Chen H., Wang L., Su C., Gong G., Wang P., Yu Z. 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, **47** (3): 180.
- Earl A., Losick R., Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, **16** (6): 269.
- Jevtić D. 2002. Ispitivanje antifungalne aktivnosti petrolearskih i metanolnih ekstrakata mahovina *Hypnum cupressiforme* Hedw. i *Pellia endiviifolia* (Dicks.) Dumort. *Petičke sveske*, 54: 100.
- Morikawa M. 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101** (1): 1-8.
- Ristić D. 2012. Karakterizacija vrsta roda *Fusarium* patogena sirka [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] u Srbiji i utvrđivanje osetljivosti genotipova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun

Biljana Banić

Biological Control of the Plant Parasite *Fusarium graminearum* by Synergy Between *Bacillus subtilis* and *Pellia endiviifolia* Extract

Fungi from the genus *Fusarium* are cosmopolites and they are common plant pathogens. *Fusarium graminearum* is one of the most important plant pathogens, as it causes the root, stem, and corn piston to rot (Ristić 2012). With respect to the principles of organic food production, plant treatment with classical fungicides is replaced by a biological control of the parasite itself. Research has shown that *Bacillus subtilis* inhibits the growth of certain fungi due to the production of antifungal metabolites, such as proteases and iturin A (Baysal *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008), thus it could be used as a fungicide for protection of crops (Morikawa 2006). It has also been shown that the moss *Pellia endiviifolia*, from the class Marchantiopsida, has inhibitory effects on *F. latericium* (Jevtić 2002). Considering the above mentioned facts, it can be assumed that the extract from *P. endiviifolia* could inhibit the growth of *F. graminearum*, and that *P. endiviifolia* and *B. subtilis* might exhibit a positive synergy. *P. endiviifolia* extract was obtained by means of petroleum ether extraction. The synergistic effect of the extract and the bacterium *B. subtilis* was examined with the purpose of establishing biological control of the plant parasite *F. graminearum*. Furthermore, inhibitory effects of protease and iturin A, isolated from the supernatant of *B. subtilis* were investigated. The appearance of inhibition zones after cocultivating on PDA medium confirmed the inhibitory effects of *B. subtilis* on the growth of *F. graminearum*. *P. endiviifolia* extract inhibits *B. subtilis* growth, but the small metabolites that were isolated from *B. subtilis* did not inhibit the growth of *F. graminearum*. Further research should be done in order to determine which *B. subtilis* metabolites act as fungicides, and which compounds found in *P. endiviifolia* extract exhibit a fungicidal, but not an antimicrobial effect. 