

# Utjecaj fungicida i biopesticida na morfološke promjene na malini (*Rubus ideaus* L. „POLKA“) inficiranoj bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*

The Influence of Pesticides and Biopesticides on Morphological Changes in Raspberry (*Rubus ideaus* L. „POLKA“) Infected with the Bacterium *Agrobacterium tumefaciens*

**Pilić S., Bešta-Gajević R., Dahija S., Grahić J.**

**Poljoprivreda / Agriculture**

ISSN: 1848-8080 (Online)

ISSN: 1330-7142 (Print)

<https://doi.org/10.18047/poljo.29.1.2>



**Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Poljoprivredni institut Osijek**

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Agricultural Institute Osijek

# UTJECAJ FUNGICIDA I BIOPESTICIDA NA MORFOLOŠKE PROMJENE NA MALINI (*Rubus idaeus* L. „POLKA“) INFICIRANOJ BAKTERIJOM *Agrobacterium tumefaciens*

Pilić S.<sup>(1)</sup>, Bešta-Gajević R.<sup>(1)</sup>, Dahija S.<sup>(1)</sup>, Grahić J.<sup>(2)</sup>

Izvorni znanstveni članak  
Original scientific paper

## SAŽETAK

Proizvodnja maline (*Rubus idaeus* L.), kao jedna od najperspektivnijih grana voćarstva u Bosni i Hercegovini, mogla bi biti trajno ugrožena zbog sve češćega pojavljivanja bolesti bakterijskog tumora korijena, čiji je uzročnik *Agrobacterium tumefaciens*. Cilj ovoga rada bio je ispitati morfološke promjene na sadnicama maline izazvane bakterijom *A. tumefaciens*, kao i veličinu i brojnost tumora u zavisnosti od primijenjenoga biološkog ili kemijskog tretmana. U radu je korišten referentni soj *Agrobacterium tumefaciens* MTCC 431 (ATCC 15955). Morfometrijski parametri na sadnicama maline izmjereni su uz pomoć programa ImageJ 1.48v. Za mjerenje dijametara guka korišteno je binokularno povećalo pri uvećanju od 20x. Statistička analiza rezultata podrazumijevala je analizu glavnih komponenata na osnovi korelacijske matrice u računalnome programu R v. 3.4.0. Sadnice maline koje su inokulirane bakterijom *A. tumefaciens* imale su niži potencijal rasta u odnosu na kontrolnu skupinu. Soj K1026 *Rhizobium rhizogenes* kao aktivna tvar biopesticida pozitivno je utjecao na rast zaraženih biljaka maline suzbijajući infekciju. Primijenjeno kemijsko sredstvo na bazi bakrova (II) oksida pokazalo je nešto manji učinak na intenzitet promjena uzrokovanih *A. tumefaciens* u odnosu na biološko sredstvo. U ovome je radu zabilježen i niži intenzitet promjena kod istodobne primjene biopesticida i fungicida u odnosu na pojedinačne tretmane.

**Ključne riječi:** *Rubus idaeus* L., *Agrobacterium tumefaciens*, bakterijski tumor korijena maline, morfološke promjene, učinkovitost sredstva za zaštitu bilja

## UVOD

Bosna i Hercegovina (BiH) posljednjih godina postaje sve prepoznatljivija po uzgoju maline, koji bilježi obimnu ekspanziju na cjelokupnome području. Proizvodnja maline donosi relativno brz povrat uloženi sredstava i daje mogućnost zapošljavanja ruralnoga stanovništva, kod kojega je evidentan interes za ovu vrstu poljoprivredne proizvodnje (Kurtović i sur., 2016.). Na području BiH u masovnu je proizvodnju 2008. godine uvedena nova sorta maline pod imenom „Polka“. Nije se radilo samo o novoj sorti, već i o novome tipu maline, s apsolutno različitom tehnologijom uzgoja u usporedbi s tradicionalnim sortimentom, koji podrazumijeva dvogodišnji tip maline „Willamette“ (Šiljković, 2001.). Zbog niza pozitivnih karakteristika, ova sorta brzo je probudila interes stručnjaka i uzgajivača u BiH.

Uzgajivači maline u BiH sve se češće susreću s pojavom bolesti uzrokovane bakterijom *A. tumefaciens*, a koja se očituje pojavom gomoljastih izraslina (tumora) na korijenu maline, što rapidno smanjuje prihode i ugrožava proizvodnju. Uslijed ove bolesti dolazi do velikih gospodarskih šteta naročito u rasadničarskoj proizvodnji, u kojoj gubitci mogu iznositi i više od 80 %. Ukoliko se za sadnju koriste zaražene biljke, u kasnijim fazama razvoja može doći do usporenoga porasta i smanjenja prinosa, pa čak i do izumiranja biljaka (Poncet i sur., 1996.; Kuzmanović i sur., 2011.; Păcurar i sur., 2011.; Jailani i sur., 2022.).

(1) Prof. dr. sc. Selma Pilić (selmam\_@hotmail.com; selma.pilic@pmf.unsa.ba), doc. dr. sc. Sabina Dahija, prof. dr. sc. Renata Bešta-Gajević – Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Odsjek za biologiju, Zmaja od Bosne 33-35, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina, (2) Prof. dr. sc. Jasmin Grahić – Univerzitet u Sarajevu, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Zmaja od Bosne 8, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Prema tome, za suzbijanje ove bolesti najučinkovitije su preventivne mjere, koje se sastoje od izbora zdravoga sadnog materijala i nezaraženoga tla za podizanje novih nasada maline. *A. tumefaciens* inficira podzemne dijelove biljke, odnosno korijenov sustav i lažni korijenov vrat izdanka maline izazivajući velike štete u nasadima ove voćarske kulture. Bolest je karakterizirana brзом proliferacijom stanica u korijenskome ovratniku ili kruni, uslijed čega nastaju brojne gomoljaste izrasline u podzemnome dijelu biljke unutar kojih se nalaze bakterije (Pulawska, 2010.; Subramoni i sur., 2014.; Vinogradova i sur., 2015.). Tumori remete funkciju korijena, ometajući protok vode i mineralnih tvari. Na zdrave biljke zaraza se prenosi preko ozljeda i oštećenja koja nastaju prilikom obrade tla, rezidbe i vektorima, a u nasade se unosi zaraženim sadnim materijalom (Božić, 2013.). Ako je biljka u blizini bakterije oštećena, bakterija dolazi do mjesta oštećenja kemotaksijom, privučena kemoatraktorima (amino-kiselinama, šećerima, organskim kiselinama i fenolima) koje luče oštećene biljne stanice. Bakterija inficira biljku ulazeći u korijen ili stablo na mjestu ozljede i dolazi do intrastaničnoga razmnožavanja i širenja bakterija u biljnome tkivu. Stanice biljnoga tkiva zahvaćene infekcijom rapidno se umnožavaju i rastu formirajući tumore, a virulentnost i sposobnost stvaranja tumora zavisi od prisustva Ti plazmida u bakteriji. Tumorske, odnosno transformirane biljne stanice oslobađaju posebne spojeve - opine. Bakterije s površine tumora mogu ponovo dospjeti u tlo (McLaughlin, 1991.; Agrios, 1997.; Vinogradova i sur., 2015.; Guo, 2019.).

Proučavanje utjecaja bakterije *A. tumefaciens* na različite vrste biljaka uglavnom je išlo u smjeru pronalaznja načina kontrole ove bolesti primjenom različitih baktericida, a u novije vrijeme i primjene različitih bioaktivnih spojeva i bakterija (Khmel i sur., 1998.; Veselov i sur., 2003.; Islam i sur., 2010.; Vinogradova i sur., 2015.; Lee i sur., 2020.; Ahmed i sur., 2022.). Kao mehanizme kontrole i suzbijanja širenja zaraze u nasadima uzgajivači primjenjuju komercijalno dostupna sredstva za zaštitu bilja (SZB) širokoga spektra djelovanja. Na tržištu BiH dostupan je *Nordox 75 WG*, površinski fungicid širokoga spektra djelovanja na bazi bakra iz bakrenog oksida. Suzbija širok spektar gljivičnih bolesti. Također, koristi se i u suzbijanju bakterijskih bolesti na raznome bilju.

U literaturi se kao jedan od mehanizama suzbijanja bolesti uzrokovane *A. tumefaciens* navodi primjena biološkoga agensa, to jest bakterije *Rhizobium rhizogenes* (ranije *Agrobacterium radiobacter*), koja sintetizira i izlučuje agrocin 84 (Bouzar i sur., 1991.; Vicedo i sur., 1993.; Kim, 2006; Ellis i sur., 2017.). Spomenuti produkt blokira sposobnost *A. tumefaciens* da replicira svoju DNK, čime se smanjuje njezin štetan učinak na zaražene biljke (Kim, 2006.). Komercijalno dostupan biološki preparat *Nogall* sadrži čistu kulturu nepatogene bakterije tla *R. rhizogenes* soja K1026, suspendiranu u prethodno steriliziranome, fino usitnjenom tresetnom mediju. Stanice soja K1026 mogu kolonizirati oštećeno biljno tkivo i blokirati infekciju dominantnim patogenim agrobakterijama koje uzrokuju tumore korijena i mladica mnogih hortikulturnih biljaka.

Cilj je ovoga rada bio ispitati učinak kemijskoga sredstva na bazi bakra iz bakrenoga oksida i biološkoga sredstva na bazi *R. rhizogenes* soja K1026, kao i njihova kombiniranoga djelovanja na morfološke promjene, veli-

činu i brojnost tumora izazvanih *Agrobacterium tumefaciens* na zaraženim sadnicama *Rubus idaeus* L. „Polka“.

## MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno 2020. godine u Laboratoriju za biljnu virologiju i mikrobiologiju Odsjeka za biologiju Prirodno-matematičkoga fakulteta Univerziteta u Sarajevu. Biljni materijal korišten u ovome istraživanju bile su sadnice maline (*Rubus idaeus* L.) „Polka“ iz rasadnika „Citadela“. Mlade, kontejnerske sadnice maline dopremljene su do Laboratorija za biljnu virologiju i presađene u lonce promjera 9 cm, koji su napunjeni sterilnim supstratom (mješavina crnoga i bijelog treseta). Biljke su držane u kontroliranim laboratorijskim uvjetima osvjetljenja (18 sati umjetnoga osvjetljenja dnevno) i temperature (23°C). U radu je korišten referentni soj *Agrobacterium tumefaciens* MTCC 431 (ATCC 15955) pribavljen iz kolekcije mikrobiološke zbirke iz Indije (engl. *Microbial Type Culture Collection*, Chandigarh, India).

Za ispitivanje učinaka biološkoga agensa *R. rhizogenes* soja K1026 na infekciju korijena maline bakterijom *A. tumefaciens* korišten je biopesticid *Nogall* (BASF Australia) u obliku otopine za potapanje korijena, pripremljen prema proizvođačevoj uputi ( $2.6 \times 10^7$  CFU/ml). Za ispitivanje učinaka fungicida na bazi bakra na razvoj tumora korijena maline primjenjen je *Nordox* (NORDOX INDUSTRIER A.S., Norveška) u obliku otopine koncentracije 0.15% (15 g u 10 l vode).

Istraživanje je obuhvatilo 100 zdravih sadnica maline, koje su bile podijeljene u pet skupina od po dvadeset sadnica, od kojih je jedna predstavljala kontrolnu skupinu. Mehanička inokulacija bakterijom *A. tumefaciens* na aklimatizirane sadnice maline obavljala se u aseptičnim laboratorijskim uvjetima, uz uporabu sterilnoga pribora. Za inokulaciju *A. tumefaciens* u biljno tkivo bilo je potrebno sterilnom oštricom raniti biljke u predjelu korijenova vrata. Potom je *A. tumefaciens* iz kulture sterilnom ezom nanošen na oštećeni dio biljke. Prva skupina zdravih, neinokuliranih sadnica maline predstavljala je kontrolnu varijantu. U drugoj skupini sadnice maline mehanički su inokulirane kulturom *A. tumefaciens*. Na treću je skupinu biljaka nakon inokulacije *A. tumefaciens* primjenjen biološki tretman, za koji je korišten *R. rhizogenes* soja K1026 pripremljen u obliku otopine za potapanje korijena. Korijen četvrte skupine biljaka sedam dana nakon inokulacije *A. tumefaciens* tretiran je otopinom bakrova (I) oksida. Za ispitivanje učinaka kombiniranoga djelovanja biološkoga i kemijskoga agensa peta je skupina sadnica nakon inokulacije *A. tumefaciens* tretirana *R. rhizogenes* sojem K1026, a sedam dana nakon toga otopinom bakrova (I) oksida.

Analiza odabranih morfometrijskih parametara biljaka iz različitih skupina provedena je 28 dana nakon postavljanja pokusa. Visina sadnica maline mjerena je metrom. Morfometrijski parametri koji uključuju duljinu lista s peteljkom, duljinu i širinu listića te duljinu i širinu korijena s korijenskim dlačicama mjereni su uz pomoć milimetarskoga papira. Za mjerenje duljine i širine korijenskih dlačica korišten je program *ImageJ* 1.48v. Za određivanje ukupnoga broja i dijametra guka korijen

zaraženih biljka bilo je potrebno isprati u čistoj vodi. Za mjerenje dijametra guka korištena je binokularno povećalo marke Reichert (Njemačka) pri uvećanju od 20x. Prije postupka mjerenja obavljeno je baždarenje mikrookulara i mikroobjektiva. Mikrookularom je mjeren najmanji i najveći promjer guke te je određena srednja vrijednost mjerenja. Promjer guka izračunan je na osnovi srednje vrijednosti pomnožene prethodno određenim koeficijentom. Nakon završenoga pokusa, korišteni supstrat i sadnice tretirane su *Izosanom G*, granuliranim praškom za opću sanitaciju i dezinfekciju, koji se smatra ekološki prihvatljivim sredstvom, kako bi se spriječio kontakt zaraženoga tla i biljaka s tlom u prirodi.

Svi rezultati obrađeni su metodom deskriptivne statistike uz korištenje *Microsoft Excela*. Statistička analiza rezultata dobivenih praćenjem fenotipskih karakteristika podrazumijevala je primjenu analize glavnih komponenta (engl. *Principal Component Analysis*, PCA). Analiza glavnih komponenta (Hotelling, 1936.) provedena je na osnovi korelacijske matrice u računalnome programu *R* v. 3.4.0 (*R Core Team*, 2017.). U navedenoj su matrici bila uključena kvantitativna svojstva za sve promatrane parametre, odnosno kvantitativna svojstva za sve kombinacije modaliteta pokusnih faktora. Na grafičkome prikazu analize glavnih komponenta vidljiva je disperzija parametara, odnosno kombinacija modaliteta pokusnih faktora na osnovi prvih dviju glavnih komponenta.

## REZULTATI I RASPRAVA

Vrijednosti morfometrijskih parametara sadnica maline inokuliranih bakterijom *Agrobacterium tumefaciens* i podvrgnutih različitim tretmanima prikazani su u Tablici 1. Rezultati istraživanja pokazuju razlike u vrijednostima morfometrijskih parametara kod tretiranih biljaka u odnosu na kontrolnu, zdravu liniju biljaka. Kod kontrolne varijante biljaka uočen je normalan rast i razvoj lista i korijena u odnosu na sadnice iz drugih varijanata, pri čemu su biljke iz svih varijanata imale potrebne nutrijente iz tla koje je bilo periodično navodnjavano. Za razliku od kontrole, sadnice maline zaražene *A. tumefaciens* imale su niži potencijal rasta i razvoja lista (Tablica 1., Varijanta 2.). Međutim, uočen je povećan potencijal rasta korijena (Tablica 1., Slika 1.). Slične promjene na korijenu *Rubus arcticus* L. zabilježili su Kokko i Kärenlampi (1998.) ispitujući reakciju biljke na infekciju *A. tumefaciens*. Prema navedenim autorima, na korijenu inokuliranih biljaka uočene su brojne gomoljaste izrasline, odnosno guke. *A. tumefaciens* inducira tumorigenezu koja se odlikuje brзом proliferacijom stanica na spoju korijena i stabljike biljke u vidu tumora (Pulawska, 2010.; Kado, 2014.; Vinogradova i sur., 2015.; Sekine i Shinmyo, 2020.; Aloni i Aloni, 2021.).

**Tablica 1. Vrijednosti morfometrijskih parametara sadnica iz različitih varijanata**

Table 1. Morphometric parameters values of seedlings from different variants

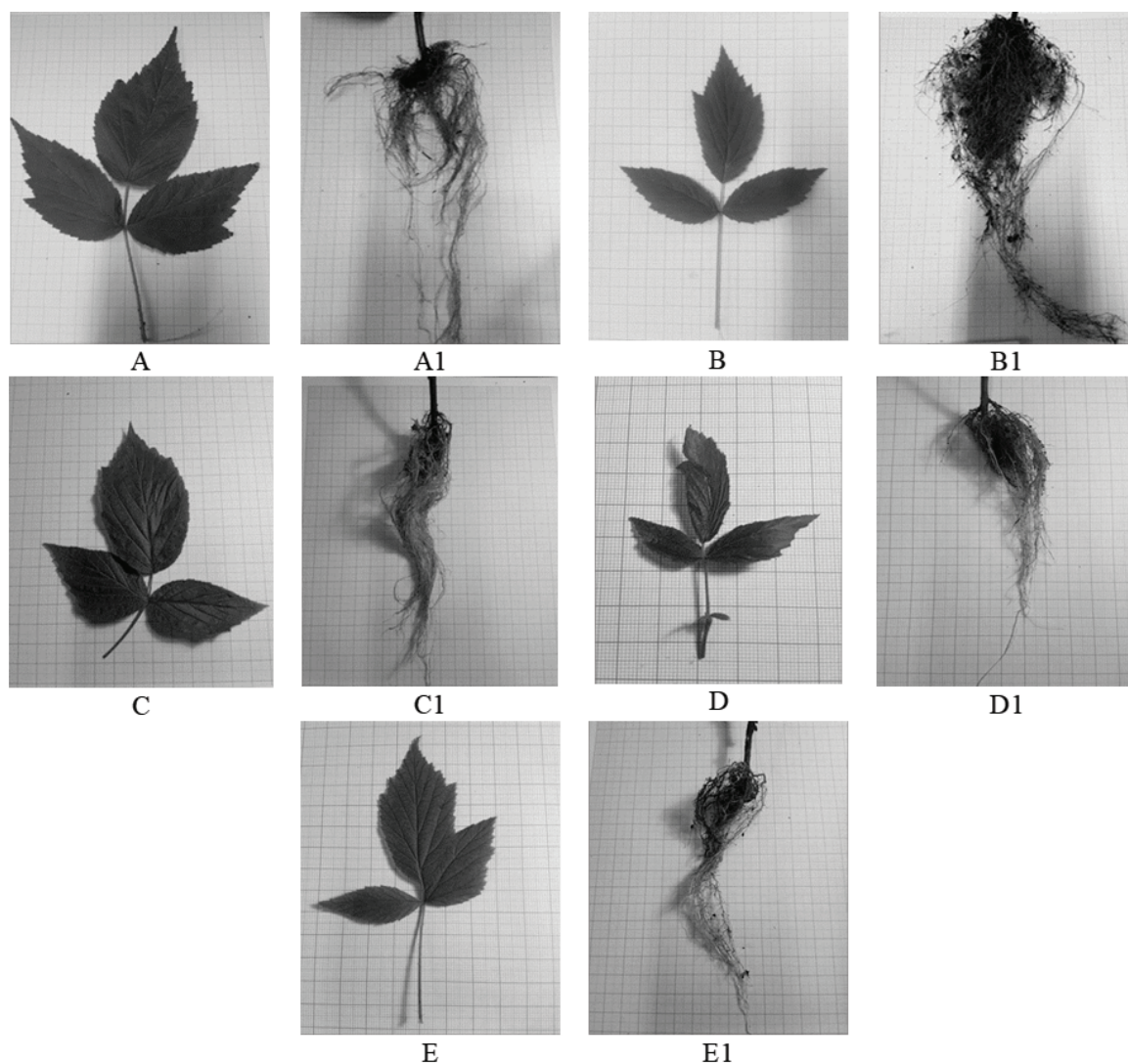
Parametri/Parameters	Varijanta 1 / Variant 1	Varijanta 2 / Variant 2	Varijanta 3 / Variant 3	Varijanta 4 / Variant 4	Varijanta 5 / Variant 5
Visina biljke (cm) / Plant height (cm)	111 ± 29.28	100 ± 29.08	103.58 ± 32.22	92.22 ± 31.89	94.04 ± 36.17
List s peteljkom (cm) / Leaf with petiole (cm)	17.91 ± 0.54	15.79 ± 0.88	15.91 ± 1.90	13.17 ± 2.80	11.57 ± 2.98
Širina listića (cm) / Leaf width (cm)	5.4 ± 0.10	3.75 ± 0.65	3.82 ± 0.64	3.74 ± 1.32	2.72 ± 0.72
Duljina listića (cm) / Leaf length (cm)	9.51 ± 0.26	6.88 ± 1.29	6.93 ± 1.41	6.72 ± 2.08	5.05 ± 1.85
Širina bočnoga korijenčića (cm) / Lateral root width (cm)	0.28 ± 0.07	0.3 ± 0.08	0.27 ± 0.09	0.33 ± 0.14	0.26 ± 0.06
Duljina korijena s korijenskim dlačicama (cm) / Root length with root hairs (cm)	20.76 ± 2.95	20.98 ± 9.14	22.05 ± 3.57	19.76 ± 4.79	19.35 ± 5.0
Širina korijenskih dlačica (cm) / Width of root hairs (cm)	0.06 ± 0.02	0.15 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.02
Duljina korijenske dlake (cm) / Length of root hairs (cm)	15.3 ± 3.41	15.57 ± 10.08	15.06 ± 5.89	15.87 ± 6.11	15.92 ± 6.34
Broj guka (n) / Number of galls (n)	0 ± 0,00	3.57 ± 2.29	2.57 ± 1.81	3.42 ± 2.07	3.57 ± 1.90
Promjer guka (cm) / Gall diameter (cm)	0 ± 0,00	0.53 ± 0.21	0.46 ± 0.20	0.48 ± 0.17	0.53 ± 0.19

Sve vrijednosti predstavljene su kao srednja vrijednost mjerenja ± standardna devijacija

Varijanta 1 – kontrolna linija (netretirane biljke); Varijanta 2 – biljke inokulirane bakterijom *A. tumefaciens*; Varijanta 3 – biljke inokulirane *A. tumefaciens* i tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026; Varijanta 4 – biljke inokulirane *A. tumefaciens* i tretirane bakrovim (II) oksidom; Varijanta 5 – biljke inokulirane *A. tumefaciens*, tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026 i bakrovim (II) oksidom

All values are presented as mean values ± standard deviation

Variant 1 – control line (untreated plants); Variant 2 – plants inoculated with *A. tumefaciens*; Variant 3 – plants inoculated with *A. tumefaciens* and treated with *R. rhizogenes* strain K1026; Variant 4 – plants inoculated with *A. tumefaciens* and treated with copper (II) oxide; Variant 5 – plants inoculated with *A. tumefaciens*, treated with *R. rhizogenes* strain K1026 and copper (II) oxide



Slika 1. List i korijen maline iz različitih varijanata: A) List s peteljkom kontrolne varijante maline; A1) Korijen kontrolne varijante maline; B) List s peteljkom sadnice zaražene *A. tumefaciens*; B1) Korijen sadnice maline zaražene *A. tumefaciens*; C) List s peteljkom sadnice zaražene *A. tumefaciens* tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026; C1) Korijen sadnice zaražene *A. tumefaciens* tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026; D) List s peteljkom sadnice zaražene *A. tumefaciens* tretirane bakrovim (II) oksidom; D1) Korijen sadnice zaražene *A. tumefaciens* tretirane bakrovim (II) oksidom; E) List s peteljkom sadnice zaražene *A. tumefaciens* tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026 i bakrovim (II) oksidom; E1) Korijen sadnice zaražene *A. tumefaciens* tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026 i bakrovim (II) oksidom

Figure 1. Raspberry leaf and root from different variants: A) Leaf with petiole (cm) of the raspberry control variants; A1) Raspberry control variants root; B) Leaf with petiole of a seedling infected with *A. tumefaciens*; B1) Root of raspberry seedling infected with *A. tumefaciens*; C) Leaf with petiole of a seedling infected with *A. tumefaciens*, treated with *R. rhizogenes* strain K1026; C1) Root of seedlings infected with *A. tumefaciens*, treated with *R. rhizogenes* strain K1026; D) Leaf with petiole of seedling infected with *A. tumefaciens*, treated with copper (II) oxide; D1) Root of seedlings infected with *A. tumefaciens*, treated with copper (II) oxide; E) Leaf with petiole of seedling infected with *A. tumefaciens*, treated with *R. rhizogenes* strain K1026 and copper (II) oxide; E1) Root of seedlings infected with *A. tumefaciens*, treated with *R. rhizogenes* strain K1026 and copper (II) oxide

Kod biljaka koje su inokulirane *A. tumefaciens*, a zatim tretirane *R. rhizogenes* sojem K1026, zabilježene su veće vrijednosti praćenih morfometrijskih parametara nadzemnoga dijela biljaka u usporedbi s biljkama koje su inokulirane *A. tumefaciens* bez dodatnih tretmana (Tablica 1.). Također, kod biljaka iz treće varijante uočeno je smanjenje dlakavosti korijena i niži potencijal rasta korijena u usporedbi s biljkama iz varijante 2, što potvrđuje antitumorska svojstva *R. rhizogenes*. Na korijenu biljaka zabilježen je nešto manji broj guka i njihov manji promjer. Prema tome, primjena biološkoga agensa imala je pozitivan učinak na inficirane biljake. Dokazano je da sredstva koja sadrže agrocin 84, spoj koji pripada novoj klasi antibiotika nazvanih inhibitori amino acil tRNA, djeluju na smanjenje intenziteta promjena izazvanih bakterijom *A. tumefaciens*

(Bouzar i sur., 1991; Vicedo i sur., 1993.; Kim, 2006; Ullrich i sur., 2019.; Travin i sur. 2021.; Asenstorfer i sur. 2022.). Burr i sur. (1993.) navode da je agrocin 84 smanjio intenzitet tumora korijena maline u Mađarskoj, ali nije pružio dugoročnu zadovoljavajuću kontrolu bolesti.

Kod biljaka iz četvrtje varijante, koje su nakon inokulacije *A. tumefaciens* tretirane otopinom bakrova (II) oksida, zabilježene su dosta niže vrijednosti parametara visine biljke i duljine lista s peteljkom u usporedbi s biljkama iz prvih triju varijanata. Također, zabilježen je niži potencijal rasta korijena i dlakavosti, dok je duljina korijenskih dlačica pokazala pozitivan trend rasta (Slika 1.D). Broj i promjer guka bio je nešto manji u odnosu na biljke iz druge varijante, ali veći u usporedbi s biljkama iz treće varijante.

Niže vrijednosti većine praćenih morfometrijskih parametara nadzemnoga dijela biljaka zabilježene su u tretmanu kombiniranoga djelovanja biopesticida i fungicida. Zabilježen je niži potencijal rasta korijena i dlakavosti u odnosu na biljke izložene pojedinačnom djelovanju SZB-a. Duljina korijenskih dlačica pokazala pozitivan trend rasta u odnosu na biljke iz prvih četiriju varijanata. Zabilježene su slične vrijednosti broja i promjera guka kao kod biljaka iz druge varijante (Tablica 1., Varijanta 5; Slika 1.E).

Analiza odabranih parametara provedena je na temelju korelacijske matrice, u koju su bile uključene srednje vrijednosti svih praćenih kvantitativnih svojstava. Dobiveni broj odabranih parametara (PC) bio je jednak broju početnih, izvornih kvantitativnih varijabla. Od ukupno 10 novoformiranih sintetskih varijabla, prvih pet je detaljnije analizirano kroz njihove svojstvene vrijednosti i udio koji su one imale u ukupnoj varijansi (Tablica 2.).

**Tablica 2. Svojtvene vrijednosti, udio varijance i kumulativna varijanca povezana s prvih pet glavnih vrijednosti komponenti (PC), procijenjenih iz korelacijske matrice s 10 varijabla**

Table 2. Eigenvalues, variance shares, and cumulative variance related to the first five main component values (PC), estimated from a correlation matrix with 10 variables

Varijable / Variables	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Svojtvene / Eigenvalues	2.3294	1.5444	1.0861	1.0045	0.0000
Udio varijance (%) / Variance shares (%)	54.26	23.85	11.80	10.09	0
Kumulativna varijanca (%) / Cumulative variance (%)	54.26	78.12	89.91	100	100

Varijable s najvećim vrijednostima svojstvenih vektora u prvih pet glavnih komponenta su sljedeće: PC1 – list s peteljkom, širina listića, duljina listića i promjer guka; PC2 – duljina korijena s korijenskim dlačicama, širina korijenskih dlačica i broj guka; PC3 – širina bočnoga korjenčića; PC4 – duljina korijenskih dlačica; PC5 – visina biljke / The variables with the highest values of eigenvectors in the first five main components are as follows: PC1 – leaf with petiole, leaf width, leaf length and gall diameter; PC2 – root length with root hairs, width of root hairs and number of galls; PC3 – width of lateral root; PC4 – length of root hairs; PC5 – plant height

Najznačajnija svojstva PC1 odnose se na morfometrijska svojstva lista i lisne plojke, kao i na promjer guka. Najveće vrijednosti svojstvenih vektora u prvoj komponenti imali su list s peteljkom i duljina listića (0.3863 i 0.3794). Nešto niže vrijednosti svojstvenih vektora pokazali su širina listića (0.3777), dok je najniža svojstvena vrijednost vektora zabilježena za promjer guka (0.3341). U drugoj komponenti najveće vrijednosti svojstvenih vek-

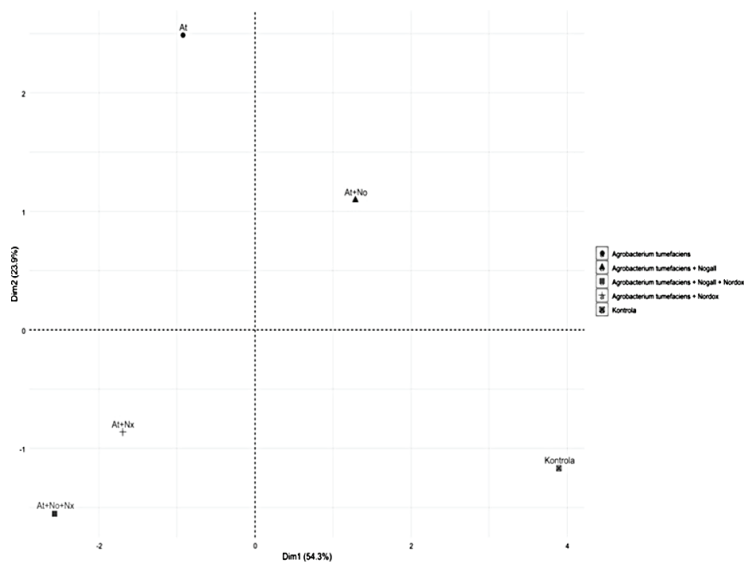
tora pokazali su širina korijenskih dlačica i duljina korijena s korijenskim dlačicama (0.6250 i 0.4405), a najnižu svojstvenu vrijednost vektora imao je broj guka (0.4298). U trećoj komponenti najveće vrijednosti svojstvenih vektora pokazala je širina bočnoga korjenčića (0.7112), u četvrtoj duljina korijenskih dlačica (0.3488), a u petoj komponenti visina biljke (0.7520; Tablica 1.).

**Tablica 3. Doprinos analiziranih svojstava u ukupnoj varijabilnosti pokusa**

Table 3. Contribution of analyzed properties in the total variability of the experiment

Parametri / Parameters	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Visina biljke (cm) / Plant height (cm)	-0.4128	-0.0867	0.1706	-0.1508	-0.7520
List s peteljkom (cm) / Leaf with petiole (cm)	-0.3794	-0.2063	-0.1639	-0.2914	-0.0608
Širina listića (cm) / Leaf width (cm)	-0.3777	0.0496	-0.3509	-0.2723	0.3209
Duljina listića (cm) / Leaf length (cm)	-0.3863	0.0159	-0.3297	-0.2464	0.1296
Širina bočnoga korjenčića (cm) / Lateral root width (cm)	-0.0219	0.0644	-0.7112	0.6224	-0.2925
Duljina korijena s korijenskim dlačicama (cm) / Root length with root hairs (cm)	-0.2628	-0.4405	0.1382	0.3724	0.1379
Širina korijenskih dlačica (cm) / Width of root hairs (cm)	0.1094	-0.6250	0.0482	0.0258	-0.1893
Duljina korijenskih dlačica (cm) / Length of root hairs (cm)	0.3486	0.2662	-0.2037	-0.3488	-0.4033
Broj guka (n) / Number of galls (n)	0.2812	-0.4298	-0.2261	-0.2634	-0.0032
Promjer guka (cm) / Gall diameter (cm)	0.3341	-0.3206	-0.3040	-0.1992	0.0891

Na osnovi komparativne analize (Grafikon 1.) možemo uočiti da su morfometrijski parametri (visina biljke, list s peteljkom, duljina i širina listića, širina bočnoga korjenčića i duljina korijena s korijenskim dlačicama) u pozitivnoj korelaciji kod kontrolne skupine sadnica maline s obzirom na to da su biljke rasle u optimalnim uvjetima za njihov rast i razvoj. U kontrolnoj skupini sadnica koje nisu inokulirane bakterijom *A. tumefaciens* nisu uočene

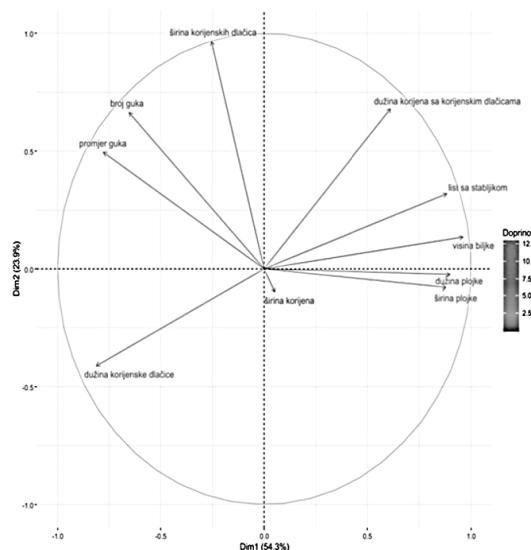


**Grafikon 1. Komparativna analiza varijanti sadnica maline**

Figure 1. Comparative analysis of variants in raspberry seedlings

Morfometrijski parametri zaraženih sadnica maline tretiranih biološkim agensom su u pozitivnoj korelaciji s duljinom korijena s korijenskim dlačicama, visinom biljke te duljinom i širinom listića, a u negativnoj korelaciji s širinom korijenskih dlačica te brojem i promjerom guka, što potvrđuje činjenicu da *R. rhizogenes* soj K1026 smanjuje negativan učinak *A. tumefaciens* (Burr i sur. 1993.; Vicedo i sur., 1993.; Kim i sur., 2006.; Chopra i sur., 2013.; Asenstorfer i sur., 2022.). Dobiveni su rezultati u skladu s Kerrovim istraživanjima (2016.), koji navodi da je kontrola bakteriološka tumora korištenjem nepatogenog soja *R. rhizogenes* uspješno primjenjivana na različitim biljnim vrstama širom svijeta. Nadalje, rezultati rada pokazuju da je primjena bakrova (II) oksida također utjecala na smanjenje intenziteta promjena izazvanih bakterijom *A. tumefaciens*. Uočena je negativna korelacija između duljine korijena s korijenskim dlačicama, lista s peteljkom, visine biljke, duljine i širine listića, ali i promjera i broja guka (Grafikon 1.). Na sadnicama maline koje su prethodno bile mehanički inokulirane *A. tumefaciens*, a zatim tretirane *R. rhizogenes* i bakrovim (II) oksidom, analizirani parametri pokazuju slične korelacijske odnose kao i kod sadnica iz četvrte varijante, koje su tretirane samo bakrovim (II) oksidom, što je posebno uočljivo na parametru širine korijenskih dlačica. Negativna korelacija zabilježena je između duljine korijena s korijenskim dlačicama, lista s peteljkom, visine biljke te duljine i širine

guke. Za razliku od kontrolnih, morfometrijski parametri biljaka na koje je mehanički inokuliran patogeni soj bakterije su u pozitivnoj korelaciji sa širinom korijenskih dlačica, brojem guka i njihovim promjerom. S druge strane, morfometrijski parametri su u apsolutnoj negativnoj korelaciji s duljinom korijena. Također, kod zaraženih biljaka smanjena je duljina lista s peteljkom, širina i duljina listića, ali i visina biljke (Grafikon 1.).



listića. Morfometrijski parametri sadnica maline negativno koreliraju sa širinom korijenskih dlačica te brojem i promjerom guka. U ovome je radu zapažen niži intenzitet promjena kod istovremene primjene ovih dvaju SZB-a u odnosu na pojedinačne tretmane (Grafikon 1.). Rezultati provedenoga istraživanja pružaju uzgajivačima maline sorte „Polka“ u BiH nova saznanja o učinkovitosti komercijalno dostupnih fungicida i biopesticida na tržištu BiH.

## ZAKLJUČAK

Iako se tumorska bolest vrata korijena biljaka uzrokovana bakterijom *A. tumefaciens* intenzivno proučava u svijetu, i dalje uzrokuje velike štete u voćarstvu, pa je iznalaženje kontrolnih mjera izazov za mnoge istraživače. Kozmopolitsko širenje ove bakterije, efikasni mehanizmi izbjegavanja obrambenoga mehanizma biljaka, jedinstvena patologija i kolonizacija biljke doprinose otežanoj prevenciji i kontroli bolesti.

Upravo provedena istraživanja pokazuju razlike u vrijednostima morfometrijskih parametara kod biljaka tretiranih biopesticidima i fungicidima u odnosu na inficirane biljake koje nisu tretirane.

Stoga je na temelju dobivenih rezultata uočljivo da primjena bakrova (II) oksida smanjuje dlakavost korijena i suzbija razvoj tumora korijena maline. Međutim, veći

potencijal razvoja nadzemnoga dijela zaražene biljke i niži potencijal razvoja dlakavosti korijena i pojave tumora uočen je u tretmanu nepatogenim sojem *R. rhizogenes*. Kako je primjena bioloških sredstava za zaštitu usjeva od bolesti važna u održivoj poljoprivredi, dobiveni rezultati ukazuju na potrebu daljnega istraživanja bakterioidnog potencijala bioloških sredstava i njihove primjene u zaštiti bilja i očuvanju okoliša.

## LITERATURA

- Agrios, G.N. (1997). Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, USA.
- Ahmed, B., Jailani, A., Lee, J. H., Lee, J. (2022). Effect of halogenated indoles on biofilm formation, virulence, and root surface colonization by *Agrobacterium tumefaciens*. *Chemosphere*, 293, 133603. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133603>
- Aloni, R., Aloni, R. (2021). Cancer and Vascular Differentiation. *Vascular Differentiation and Plant Hormones*, 309-329.
- Asenstorfer, R. E., Ryder, M. H., Jones, G. P. (2022). Agrocinnopine C, a Ti-plasmid-coded enzyme-product, is a 2-O, 6-O linked phosphodiester of D-Glucose and sucrose. *Phytochemistry*, 194, 113013.
- Bouzar, H., Daouzli, N., Krimi, Z., Alim, A., Khemici, E. (1991). Crown gall incidence in plant nurseries of Algeria, characteristics of *Agrobacterium tumefaciens* strains, and biological control of strains sensitive and resistant to agrocin 84. *Agronomie*, 11(10), 901-908.
- Božić, V. (2013). Zaštita voćaka i pravilna upotreba pesticida. Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
- Burr, T.J. Reid, C.L. Katz, B.H. Tagliati, M.E., Bazzi, C., Breth D.I (1993). Failure of *Agrobacterium radiobacter* Strain K-84 to Control Crown Gallon Raspberry. *Hortscience*, 28(10), 1017-1019.
- Chopra, S., Palencia, A., Virus, C., Tripathy, A., Temple, B. R., Velazquez-Campoy, A., Reader, J. S. (2013). Plant tumour biocontrol agent employs a tRNA-dependent mechanism to inhibit leucyl-tRNA synthetase. *Nature Communications*, 4(1), 1417.
- Ellis, J. G. (2017). Can plant microbiome studies lead to effective biocontrol of plant diseases? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(3), 190-193. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0252-CR>
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., Yang, J. (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology advances*, 37(1), 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.008>
- Hotelling, H. (1936). Relations Between Two Sets of Variates. *Biometrika*, 28(3-4), 321-377.
- Islam, M.S., Rahman, M.M., Rahman, M.A., Qayum, M.A. and Alam, M.F. (2010). In vitro evaluation of *Croton bonplandianum* Baill. as potential antitumor properties using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Agricultural Technology*, 6(1), 79-86.
- Jailani, A., Ahmed, B., Lee, J. H., Lee, J. (2022). Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* growth and biofilm formation by tannic acid. *Biomedicines*, 10(7), 1619. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071619>
- Kado, C. I. (2014). Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in microbiology*, 5, 340. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>
- Kerr, A. (2016): Biological control of crown gall. *Australasian Plant Pathology*, 45, 15-18.
- Khmel, I.A., Sorokina, T.A., Lemanova, N.B., Lipasova, V.A., Metlitski, O.Z., Burdeinaya, T.V., Chernin, L.S. (1998). Biological Control of Crown Gall in Grapevine and Raspberry by Two Pseudomonas spp. with a Wide Spectrum of Antagonistic Activity. *Biocontrol Science and Technology*, 8, 45-57. <https://doi.org/10.1080/09583159830423>
- Kim, J.G., Park, B.K., Kim, S.U., Choi, D., Nahm, B.H., Moon, J.S., Reader, J.S., Farrand, S.K., Hwang, I. (2006). Bases of biocontrol: Sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the Trojan Horse antibiotic that controls crown gall. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8846-8851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602965103>
- Kokko, H. I., Kärenlampi, S.O. (1998). Transformation of arctic bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell reports*, 17(10), 822-826. <https://doi.org/10.1007/s002990050491>
- Kurtović, M., Gaši, F., Grahić, J., Maličević, A., Okić, A., Grbo, L. (2016). Jagodasto voće. Grafičar promet d.o.o. Sarajevo, Sarajevo.
- Kuzmanović, N., Ivanović, M., Čalić, A., Gašić, K., Obradović, A. (2011). Diferencijacija fitopatogenih vrsta roda *Agrobacterium*. *Pesticides and Phytomedicine*, 26(3), 245-253. <https://doi.org/10.2298/pif1103245k>
- Lee, J. E., Jung, M., Lee, S. C., Huh, M. J., Seo, S. M., Park, I. K. (2020). Antibacterial mode of action of trans-cinnamaldehyde derived from cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) essential oil against *Agrobacterium tumefaciens*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 165, 104546. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.02.012>
- McLaughlin, J.L. (1991). Crown gall tumors on potato discs and bine shrimp lethality: Two single bioassays for plant screening and fractionation. In: Hostettmann K (ed) *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 6, 1-31.
- Păcurar, D. I., Thordal-Christensend, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.06.004>
- Poncet, C., Antonini, C., Bettachini, A., Hericher, D., Pionnat, S., Simonini, L., Dessaux, Y. and Nesme, X. (1996). Impact of the crown gall disease on vigour and yield of rose trees. *Acta Horticulturae*, 424, 221-225.
- Pulawska, J. (2010). Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. *Journal of Plant Pathology*, S87-S98.



26. R Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
27. Sekine, M., Shinmyo, A. (2020). Agrobacterium and Plant Genetic Engineering. *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*, 623-639.
28. Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E., Yuan, Z.C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in Plant Science*, 5, 322. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00322>
29. Šiljković, Ž. (2001). Južna Europa u ostvarenju koncepta organske poljoprivrede. *Geoadria*, 6, 93-112. <https://doi.org/10.15291/geoadria.166>
30. Travin, D. Y., Severinov, K., Dubiley, S. (2021). Natural Trojan horse inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases. *RSC Chemical Biology*, 2(2), 468-485. <https://doi.org/10.1039/d0cb00208a>
31. Veselov, D., Langhans, M., Hartung, W., i sur., (2003). Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58 induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta*, 216, 512-522. <http://dx.doi.org/10.1007/00425-002-0883-5>.
32. Vicedo, B., Peñalver, R., Asins, M. J., López, M. M. (1993). Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra-mutant strain K1026. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 309-315. <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.309-315.1993>
33. Vinogradova, A.P., Lebedeva, M.A., Lutova, L.A. (2015). Meristematic characteristics of tumors initiated by *Agrobacterium tumefaciens* in pea plants. *Russian Journal of Genetics*, 51(1), 46-54. <https://doi.org/10.1134/s1022795415010123>

## THE INFLUENCE OF PESTICIDES AND BIOPESTICIDES ON MORPHOLOGICAL CHANGES IN RASPBERRY (*Rubus idaeus* L. „POLKA“) INFECTED WITH THE BACTERIUM *Agrobacterium tumefaciens*

### SUMMARY

**The production of raspberry (*Rubus idaeus* L.) as one of the most promising branches of fruit growing in Bosnia and Herzegovina could be permanently endangered due to the increasing incidence of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. The aim of this paper was to examine the morphological changes on raspberry seedlings caused by the bacterium *A. tumefaciens*, as well as the size and number of tumors depending on the applied biological or chemical treatment. The strain *Agrobacterium tumefaciens* MTCC 431 (ATCC 15955) was used. Morphometric parameters on raspberry seedlings were measured using the ImageJ 1.48v program. A binocular magnifier at 20x magnification was used to measure the tumor diameter. The computer program R c. 3.4.0 was used for a statistical analysis of results and an analysis of main components. It was observed that the raspberries inoculated with *A. tumefaciens* had a lower growth potential when compared to the control line. Rhizobium rhizogenes strain K1026, as an active substance of biopesticide, had a positive effect on the growth of infected raspberry plants, reducing bacterial infection. The applied chemical agent based on copper (II) oxide demonstrated lesser impact on the intensity of *A. tumefaciens* infection when compared to the biological agent. In this paper, a lower intensity of changes in raspberry plants was observed when the biopesticides and fungicides were applied simultaneously, in comparison with the individual treatments.**

**Keywords:** *Rubus idaeus* L., *Agrobacterium tumefaciens*, crown gall disease, morphological changes, effectiveness of plant protection products

(Received on February 3, 2022; accepted on March 17, 2023 – Primljeno 3. veljače 2022.; prihvaćeno 17. ožujka 2023.)