

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Jelena P. Jovičić Petrović

**GLJIVE IZ AGROINDUSTRIJSKOG OTPADA KAO  
ANTAGONISTI FITOPATOGENIM GLJIVAMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Jelena P. Jovicic Petrovic

**FUNGI FROM AGRO-INDUSTRIAL WASTE AS  
ANTAGONISTS OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

MENTOR:

dr Vera Raičević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Miroslav Vrvić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

dr Miomir Nikšić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Vesna Golubović-Ćurguz, docent  
Univerzitet u Beogradu, Šumarski fakultet

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

Istraživanja u okviru disertacije su finansirana iz sredstava projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije "Biodiverzitet kao potencijal u ekoremedijacionim tehnologijama oštećenih ekosistema", TR 31080.

*Predstavljena istraživanja ne bi bila ostvariva da nije bilo pomoći onih kojima dugujem veliku zahvalnost.*

*Ovom prilikom se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Veri Raičević. Hvala za pruženu pomoć u svakom trenutku kad je bila potrebna, na razumevanju, pruženom znanju i iskustvu, motivaciji i ohrabrenju u trenucima kad je bilo najpotrebnije.*

*Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Bulajić na pruženoj pomoći u vezi sa molekularnom identifikacijom izolata, ali i drugim veoma konstruktivnim sugestijama i savetima koji će biti od koristi i tokom daljeg naučnog rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr Miroslavu Vrvic, prof. dr Miomiru Nikšić i doc dr Vesni Golubović-Ćurguz koji su svako u svojoj oblasti doprineli korisnim savetima.*

*Zahvaljujem se članovima Katedre za fitopatologiju koji su pružili pomoć pri molekularnoj identifikaciji gljiva.*

*Hvala timu dr Brankice Tanović iz Instituta za zaštitu životne sredine i pesticide na ustupljenim kulturama fitopatogena i pomoći prilikom izvođenja in vivo ogleda.*

*Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za ekološku mikrobiologiju na pomoći i razumevanju.*

*Hvala mojim prijateljima koji su me podržavali i bodrili.*

*Veliku zahvalnost dugujem roditeljima i sestri, a posebno suprugu i sinu neizmerno hvala za pruženu podršku, motivaciju i veliko strpljenje.*

## Gljive iz agroindustrijskog otpada kao antagonisti fitopatogenim gljivama

### REZIME

Kompostiranjem agroindustrijskog otpada prevazilaze se ekološki problemi i dobija se proizvod značajne upotrebne vrednosti. Dodavanje kompostiranog agroindustrijskog otpada poljoprivrednom zemljištu ima mnoge korisne efekte po useve, a među njima je i smanjenje učestalosti oboljenja biljaka. Smatra se da je za efekat na prouzrokovala bolesti biljaka odgovoran diverzitet mikroorganizama koji stupaju u složene interakcije sa fitopatogenima. Predmet sprovedenih istraživanja su dve vrste agroindustrijskog otpada: komina grožđa i duvanski otpad i kompost od džibre, sporednog proizvoda koji nastaje pri proizvodnji šljivovice.

Cilj istraživanja bio je ispitivanje antagonizma filamentoznih gljiva izolovanih iz agroindustrijskog otpada prema fitopatogenim vrstama. Izvršena je mikrobiološka karakterizacija otpada i izolacija filamentoznih gljiva, a zatim i selekcija izolata koji pokazuju antagonizam prema tri fitopatogene vrste: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Pythium aphanidermatum*. Izolacija je izvršena standardnim mikrobiološkim metodama, a u cilju selekcije je primenjen konfrontacijski test. Odabrano je šest izolata koji su okarakterisani i identifikovani na osnovu morfoloških, odgajivačkih i ekoloških svojstava, proizvodnje hidrolitičkih enzima i molekularnim metodama. Molekularna identifikacija izvršena je umnožavanjem i sekvencioniranjem ITS regiona rDNK i proteinskih gena koji kodiraju sintezu  $\beta$ -tubilina i Tef-1 $\alpha$  i poređenjem dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. Selektovani izolati su identifikovani kao: *Penicillium paneum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Rhizopus oryzae* i *Aspergillus* sp. sekcija *Nigri*.

Ispitan je uticaj ekstracelularnih metabolita šest odabranih izolata sadržanih u filtratu tečne kulture na rast fitopatogena. Primenjene su različite koncentracije filtrata i različiti načini sterilizacije (autoklaviranje i mikrobiološka filtracija). Indukcija proizvodnje antifungalnih metabolita usled prisustva fitopatogene vrste ispitana je putem efekta filtrata dvojne kulture (izolata i fitopatogena) na rast istog biljnog patogena. U cilju ispitivanja uticaja izloženosti izolata prisustvu fitopatogene vrste na indukciju stvaranja

antifungalnih metabolita ispitan je i uticaj filtrata dobijenog od dvojne tečne kulture (izolat sa određenim fitopatogenom) na rast fitopatogenih vrsta. Heterogenost dobijenih rezultata ukazuje na specifičnost interakcija između izolata i fitopatogenih vrsta. Odabrani izolati ispoljili su različite mehanizme delovanja na biljne patogene i doveli do različitog stepena inhibicije. Najveći procenat inhibicije rasta uzrokovao je filtrat kulture *Aspergillus* sp. iz sekcije *Nigri* kod *P. aphanidermatum*, pri čemu su 50% filtrati dvojne i čiste kulture potpuno inhibirali rast fitopatogena.

Sterilan filtrat *T. longibrachiatum* pokazao je značajan *in vitro* uticaj na sve tri fitopatogene vrste, što je dodatno potvrđeno *in vivo* u uslovima staklenika.

Rezultati ove disertacije ukazuju da se u okviru zajednice gljiva iz agroindustrijskog otpada nalaze antagonisti fitopatogenih vrsta, koji deluju putem složenih i za svaku vrstu specifičnih interakcija. Najveći doprinos obavljenih istraživanja ogleda se u razjašnjenju prirodnih procesa koji se dešavaju u agroekosistemima u zajednici različitih vrsta gljiva i biljnih patogena, sa jedne strane i kolekciji sojeva koji uz dodatna istraživanja mogu naći primenu u biotehnologiji.

**Ključne reči:** antagonizam, agroindustrijski otpad, kompost, fitopatogene gljive, inhibicija rasta

**Naučna oblast:** Mikrobiologija

**Uža naučna oblast:** Ekološka mikrobiologija

**UDK:** 635.8:631.95(043.3)

## Fungi from agro-industrial waste as antagonists of phytopathogenic fungi

### ABSTRACT

Composting of agro-industrial waste is the way to overcome ecological problems and to get a product of the significant utility value. Soil amendment with the composted agro-industrial waste possesses many beneficial effects, including the decrease of plant diseases incidence. It is considered that diversity of microorganisms that interact with plant pathogens is responsible for the disease suppression effect. The subject of the conducted research were two types of agro-industrial waste: grape marc and tobacco waste, and compost made of plum stillage, by product in plum brandy production.

The aim of the research was to study the antagonism of filamentous fungi from agro-industrial waste towards phytopathogenic species. Microbiological characterization of wastes and isolation and characterization of filamentous fungi was performed, followed by selection of the isolates that exhibits antagonistic effect on three phytopathogenic species: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Pythium aphanidermatum*. The isolation was carried out by standard microbiological methods, and confrontation test allowed selection of six isolates which were identified and characterized on the bases on morphological, cultural and ecological properties, production of hydrolytic enzymes and by molecular methods. Molecular identification was done by amplification and sequencing of ITS rDNA, and protein coding genes  $\beta$ -tubulin and Tef-1 $\alpha$ , and comparisons of the obtained sequences with sequences available in GenBank. Selected isolates are identified as *Penicillium paneum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus* sp. section *Nigri*.

The effect of extracellular metabolites, contained in the liquid culture filtrate, on the growth of phytopathogens was tested. Different concentrations of filtrates were applied as well as different sterilization methods (autoclaving and microbiological filtration). The induction of antifungal metabolites production by the presence of phitopatogenic species was examined by the effect of dual culture filtrates (of the isolate and plant pathogen) on the growth of the respective plant pathogen.

The variety of obtained results indicates the specificity of interactions between fungi from agro-industrial waste and phytopathogenic species. Selected isolates expressed different mechanisms of action towards plant pathogens and led to different degrees of the inhibition. The highest inhibition percentage caused liquid culture filtrate of *Aspergillus* sp., section *Nigri* on *P. aphanidermatum* growth, whereby 50% culture filtrate led to the complete inhibition of the phytopathogen growth.

*T. longibrachiatum* sterile culture filtrate showed significant *in vitro* effect on the growth of all three phytopathogenic species, which was additionally confirmed by *in vivo* experiments in greenhouse conditions.

Results of this PhD thesis indicate that fungal community of agro-industrial waste comprise phytopathogen antagonists, that act through complex and interactions specific for each species. The most important contribution of conducted research is clarification of natural processes and interactions that take place in agroecosystems in which variety of fungi and plant pathogens coexists, as well as in establishing the collection of strains that could find its application in biotechnology after additional research.

**Key words:** antagonism, agro-industrial waste, compost, phytopathogenic fungi, growth inhibition

**Scientific field:** Microbiology

**Scientific discipline:** Microbial ecology

**UDK:** 635.8:631.95(043.3)



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	3
2.1. Agroindustrijski otpad kao resurs, kompostiranje .....	3
2.2. Uticaj dodatka komposta od agroindustrijskog otpada na suzbijanje bolesti biljaka .....	5
2.3. Mikroorganizmi iz agroindustrijskog otpada i uloga u suzbijanju bolesti biljaka .....	7
2.3.1. Supresivni efekat komine grožđa .....	10
2.3.2. Supresivni efekat duvanskog otpada i komposta od džibre.....	12
2.4. Biološka kontrola.....	13
2.5. Mehanizmi antagonističkog delovanja između gljiva .....	13
2.5.1. Mikoparazitizam .....	14
2.5.2. Kompeticija za prostor, nutrijente i gvožđe.....	14
2.5.3. Produkcija hidrolitičkih enzima.....	16
2.5.4. Produkcija antibiotika i drugih toksičnih metabolita .....	17
2.5.5. Indukcija odbrambenog odgovora biljaka .....	18
2.6. Izolacija i <i>in vitro</i> selekcija antagonista fitopatogenih gljiva .....	18
2.7. <i>In vivo</i> selekcija antagonista fitopatogenih gljiva.....	21
2.8. Identifikacija gljiva, antagonista prema biljnih patogenima .....	23
<b>3. CILJ RADA</b> .....	26
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	28
4.1. Mikrobiološka karakterizacija agroindustrijskog otpada i komposta.....	28
4.2. Izolacija i selekcija filamentoznih gljiva iz agroindustrijskog otpada .....	29
4.2.1. Konfrontacijski test.....	30
4.3. Identifikacija i karakterizacija gljiva iz agroindustrijskog otpada.....	32

4.3.1. Morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike .....	32
4.3.1.1. Morfološke karakteristike .....	32
4.3.1.2. Ekološke karakteristike .....	33
4.3.2. Molekularna identifikacija izolata .....	33
4.3.2.1. Priprema kultura za molekularnu identifikaciju .....	34
4.3.2.2. Ekstrakcija DNK .....	34
4.3.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR) .....	35
4.3.2.4. Vizuelizacija PCR produkta .....	37
4.3.2.5. Prečišćavanje PCR produkta i sekvencioniranje .....	38
4.3.2.6. Molekularna identifikacija .....	38
4.3.3. Enzimaska karakterizacija izolata .....	38
4.4. Uticaj metabolita izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada na rast fitopatogena .....	39
4.4.1. Priprema filtrata tečnih kultura gljiva.....	40
4.4.2. Sterilizacija filtrata tečnih kultura gljiva .....	40
4.4.3. Uticaj filtrata na rast fitopatogenih vrsta .....	41
4.4.4. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) stare 48h na rast <i>Botrytis cinerea</i> .....	42
4.5. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na fitopatogene .....	43
4.5.1. Priprema inokuluma fitopatogena .....	43
4.5.2. Priprema filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longirachiatum</i> , (izolata 10/5).....	44
4.5.3. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na <i>Botrytis cinerea</i> .....	44
4.5.4. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na <i>Fusarium oxysporum</i> .....	45
4.5.5. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na <i>Pythium aphanidermatum</i> .....	45
4.6. Statistička obrada rezultata .....	45
<b>5. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>47</b>

5.1. Mikrobiološke karakteristike agroindustrijskog otpada i komposta.....	47
5.2. Izolacija i filamentoznih gljiva iz agroindustrijskog otpada .....	50
5.2.1. Selekcija gljiva, konfrontacijski test .....	51
5.2.1.1. Konfrontacijski test izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada sa <i>Botrytis cinerea</i> .....	51
5.2.1.2. Konfrontacijski test izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada sa <i>Fusarium oxysporum</i> .....	54
5.2.1.3. Konfrontacijski test izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada sa <i>Pythium aphanidermatum</i> .....	57
5.3. Identifikacija i karakterizacija gljiva iz agroindustrijskog otpada.....	60
5.3.1. Morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike .....	60
5.3.1.1. Morfološke karakteristike izolata K7/1 .....	61
5.3.1.2. Morfološke karakteristike izolata K11/1 .....	61
5.3.1.3. Morfološke karakteristike izolata K16/2 .....	64
5.3.1.4. Morfološke karakteristike izolata 10/5 .....	65
5.3.1.5. Morfološke karakteristike izolata 19/5 .....	66
5.3.1.6. Morfološke karakteristike izolata A/5 .....	68
5.3.1.7. Rast izolata pri različitim temperaturama.....	69
5.3.1.8. Rast izolata pri različitim pH vrednostima .....	70
5.3.1.9. Identifikacija na osnovu morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika .....	70
5.3.2. Molekularna identifikacija .....	75
5.3.2.1. Molekularna identifikacija izolata K7/1 .....	76
5.3.2.2. Molekularna identifikacija izolata K11/1 .....	77
5.3.2.3. Molekularna identifikacija izolata K16/2 .....	78
5.3.2.4. Molekularna identifikacija izolata 10/5 .....	79
5.3.2.5. Molekularna identifikacija izolata 19/5 .....	80
5.3.2.6. Molekularna identifikacija izolata A/5 .....	81
5.3.2.7. Potencijal selektovanih i identifikovanih vrsta za korišćenje u biološkoj kontroli.....	82
5.3.3. Enzimaska karakterizacija gljiva iz agroindustrijskog otpada .....	87

5.4. Uticaj metabolita izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada na rast fitopatogena .....	90
5.4.1. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Penicillium paneum</i> (izolata K7/1) na rast fitopatogena .....	91
5.4.2. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Penicillium chrysogenum</i> (izolata K11/1) na rast fitopatogena .....	98
5.4.3. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Aspergillus fumigatus</i> (izolata K16/2) na rast fitopatogena.....	103
5.4.4. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na rast fitopatogena.....	108
5.4.5. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Rhizopus oryzae</i> (izolata 19/5) na rast fitopatogena .....	114
5.4.6. Uticaj filtrata tečne kulture <i>Aspergillus</i> sp. (izolata A/5) na rast fitopatogena .....	118
5.4.7. Uticaj filtrata tečne dvodnevne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na rast <i>Botrytis cinerea</i> .....	122
5.5. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na fitopatogene.....	124
5.5.1. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na <i>Botrytis cinerea</i> .....	125
5.5.2. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) na <i>Fusarium oxysporum</i> .....	129
5.5.3. <i>In vivo</i> uticaj filtrata tečne kulture <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (izolata 10/5) <i>Pythium aphanidermatum</i> .....	131
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	135
<b>7. LITERATURA</b> .....	140
<b>8. PRILOG</b> .....	167

## 1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja i prehrambena industrija svake godine stvaraju velike količine agroindustrijskog otpada koji opterećuje životnu sredinu ukoliko se ne primenjuju adekvatne mere upravljanja otpadom. Prema *European Environmental Agency* (EEA), komunalni i agroindustrijski otpad predstavljaju dva od pet glavnih tipova otpada u Evropi. Procenjuje se da količine agroindustrijskog otpada prevazilaze 30% od svetske poljoprivredne proizvodnje, a u slučaju prerade voća količina otpada iznosi i do 50% (Ugwuanyi, 2009). Oko 3,5 milijarde tona agroindustrijskog otpada na godišnjem nivou proizvede se u svetu (John, 2009), a veliki deo se samo spaljuje ili odlaže na deponijama čime se povećava ekološki rizik. Održivo upravljanje čvrstim otpadom, podrazumeva implementaciju smanjenja količine otpada, recikliranja i ponovne upotrebe (3R: *reduce, recycle i reuse*). Proizvodnja dovoljnih količina hrane zahteva i kontrolu bolesti i štetočina, što se u najvećoj meri zasniva na upotrebi hemijskih pesticida i takođe ima negativne efekte po životnu sredinu.

Iz svega navedenog proizilazi da se nameće održivi pristup u proizvodnji hrane koji nije lako postići imajući u vidu da je u takav sistem potrebno integrisati ekološke, ekonomske i bezbedonosne aspekte.

Značajna prednost u rešavanju problema agroindustrijskog otpada je u tome da je u pitanju biorazgradiv otpad koji se može uz pomoć mikrobiološke aktivnosti transformisati u korisne proizvode. Prihvatljivo rešenje jeste kompostiranje, a naročito je pogodno za male pogone koji se često pored prerade istovremeno bave i primarnom poljoprivrednom proizvodnjom. Kompostirani agroindustrijski otpad koristi se kao organski dodatak u oplemenjivanju poljoprivrednog zemljišta, a korisni efekti ovakvog dodatka su višestruki: veća sposobnost zadržavanja vode u zoni korena biljaka, viši sadržaj organske materije koji za posledicu ima i pojačanu mikrobiološku aktivnost, uticaj na pH zemljišta i drugo. Jedan od korisnih efekata je i smanjenje broja zaraženih biljaka za šta je u velikoj meri zaslužan biodiverzitet mikroorganizama u kompostu dobijenom od agroindustrijskog otpada.

Pored unosa organske materije, kompost koji se dodaje zemljištu deluje i kao inokulum korisnih mikroorganizama. Agroindustrijski otpad je pogodna sredina za

kolonizaciju filamentoznih gljiva koje proizvode širok spektar hidrolitičkih enzima i prilagođavaju se različitim izvorima ugljenika. Ovakva svojstva mogu se povezati sa značajnim potencijalom kada je u pitanju kompeticija sa drugim mikroorganizmima u zemljištu, kao što su fitopatogene gljive. Ukoliko se aktivnost antagonista ispolji u pogodnom trenutku, zemljišni fitopatogeni koji su slabiji saprofiti uglavnom gube bitku u kompeticiji sa mikroorganizmima iz komposta prilagođenim na različite izvore nutrijenata. Međusobne interakcije mikroorganizama su složene i podložne delovanju različitih biotičkih i abiotičkih faktora. Jedna od osnovnih karakteristika antagonizma je i specifičnost koja je ujedno i ograničavajući faktor u široj upotrebi biološke kontrole. Stoga je neophodno izučavanje svakog konkretnog antagonističkog odnosa za određeni par antagoniste i fitopatogene gljive.

Antagonizam saprofitnih mikroorganizama prema fitopatogenim gljivama postiže se zahvaljujući nizu mehanizama: kompeticiji, parazitizmu, antibioizi i delovanju hidrolitičkih enzima. Najčešće je u pitanju sinergistički efekat više različitih mehanizama. Ispitivanjem mehanizama antagonizma gljiva iz agroindustrijskog otpada prema fitopatogenim gljivama objašnjavaju se prirodni procesi koji se dešavaju tokom primene komposta u usevima. Takođe, kao rezultat nastaje okarakterisana kolekcija odabranih izolata koji imaju potencijal za primenu u biološkoj kontroli i biotehnologiji. Tako upoznavanje mehanizama kroz koje se antagonizam ispoljava kao i faktora koji utiču na složene interakcije između mikroorganizama doprinosi boljem razumevanju procesa koji se dešavaju u agroekosistemu, ali pruža i mogućnosti za uspešnu primenu.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1 Agroindustrijski otpad kao resurs, kompostiranje

Pod agroindustrijskim otpadom podrazumevaju se sporedni proizvodi koji nastaju tokom proizvodnje i prerade poljoprivrednih proizvoda. Ovakav otpad najčešće se odlagao, spaljivao ili koristio za stočnu ishranu. S obzirom na velike količine otpada koje nastaju tokom primarne proizvodnje i prerade poljoprivrednih proizvoda, kao i sve veće zahteve za održivim upravljanjem prirodnim resursima, teži se razvoju tehnologija koje omogućavaju da se otpad u velikoj meri iskoristi i da se pri tom dobiju korisni proizvodi. Ovakav održivi pristup koristan je i sa ekološkog i sa ekonomskog gledišta, s obzirom da je otpad veoma dostupna sirovina koja se može iskoristiti za biokonverziju do korisnih proizvoda. Sa ekološkog aspekta, agroindustrijski otpad predstavlja problem ne samo zbog količine, već i zbog hemijskog sastava (na primer velika količina fenolnih jedinjenja (**Mussatto i sar., 2012**)).

Tehnologije koje se odnose na upotrebu agroindustrijskog otpada zasnivaju se na činjenici da ovakav otpad u sebi sadrži vredne organske materije koje mogu biti prevedene u: polimere, antibiotike, biogas, enzime, antioksidanse, pigmente, organske kiseline, arome, biomasu (kvasci, pečurke) i druge korisne proizvode (**Kaur i sar., 2014**). Agroindustrijski otpad se uopšteno smatra najboljim za fermentaciju u čvrstom stanju (solid state), ali se može koristiti i za submerzne fermentacije (**Singh i sar., 2012**). *Solid state* fermentacija predstavlja transformaciju od strane mikroorganizama bez dodatka vode, ali se podrazumeva da supstrat ima dovoljno vlage za razvoj mikroorganizama (**Padney, 2003**). Ovakav vid fermentacije je kompostiranje, koje je s obzirom na troškove prerade agroindustrijskog otpada najpogodnije sa ekonomskog aspekta, naročito za male proizvođače koji se u velikom broju slučajeva bave ujedno i primarnom proizvodnjom i preradom (**Nigam, 2009**).

Kompostiranje je proces biološke transformacije organske materije koji se odvija pod aerobnim termofilnim i mezofilnim uslovima tokom kog mikroorganizmi proizvode materijal koji je stabilan, bezbedan i sadrži značajnu količinu humusnih supstanci (**Marhuenda-Egea i sar., 2007**). Ovakav postupak predstavlja zapravo biokonverziju lignoceluloznog materijala. Lignoceluloza se sastoji iz tri vrste polimera -

celuloze, hemiceluloze i lignina koji su jako umreženi i predstavlja osnovnu komponentu biomase biljnog porekla (**Perez i sar., 2002**). Značaj biokonverzije ogleda se i u tome što ovog materijala ima u izobilju, smatra se da sadrži oko polovinu biljne materije proizvedene u fotosintezi. Procenat celuloze, hemiceluloze i lignina, u različitom otpadu, varira u najvećoj meri u zavisnosti od biljne vrste i procesa kojim je određena sirovina podvrgnuta. Obično je sadržaj celuloze, koja je dominantna frakcija u biljnom ćelijskom zidu 35-50%, hemiceluloze 20-35% i lignina 10-25% (**Mussatto i sar., 2012**).

Mikroorganizmi mogu da vrše transformaciju ovih supstrata zahvaljujući moćnim enzimskim sistemima, a u transformaciji lignoceluloznog materijala uključeni su hidrolitički enzimi zaduženi za biotransformaciju polisaharida i ligninolitički koji transformišu lignin i otvaraju prstenaste fenil-strukture (**Sanchez, 2009**). Pored lignoceluloze u agroindustrijskom otpadu zastupljeni su i šećeri, proteini, minerali i voda, koji čine ovaj materijal pogodnim za razvoj mikroorganizama, a naročito gljiva koje u ovakvoj sredini mogu brzo da se razvijaju (**Mussatto i sar., 2012**).

Kompostiranjem nastaje proizvod koji zavisno od kvaliteta može imati različite namene. Dodatak kompostiranog agroindustrijskog otpada u zemljište ima značajne korisne efekte, koji su poznati od davnih vremena, a pokazalo se da se odnose na poboljšanje fizičkih, hemijskih i mikrobioloških karakteristika zemljišta. Dodatak kompostiranog agroindustrijskog otpada dovodi do povećanog sadržaja organske materije u zemljištu, do većeg kapaciteta zadržavanja vode, poboljšanja strukture zemljišta, što se odražava na bolju aeraciju i drenažu i omogućava lakšu penetraciju korena. Pored toga, organski otpad predstavlja i izvor nutrijenata, dovodi do pojačanja mikrobiološke aktivnosti zemljišta, što se direktno odražava na plodnost zemljišta (**Matos-Moreira i sar., 2012; Lodha i sar., 2002**). Pored navedenih razloga za upotrebu komposta na usevima, ova mera jeste i deo integralnog pristupa biološkoj kontroli biljnih patogena usled efekta smanjenja broja zaraženih biljaka (**Hadar i sar., 1992**).

Pored poznavanja grupa mikroorganizama koji imaju aktivnu ulogu u transformacijama tokom kompostiranja, od praktičnog značaja je i poznavanje mikrobioloških karakteristika komposta koje predstavljaju parametar mikrobiološkog kvaliteta – broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija i brojnost *Escherichia coli*. Izvori mikrobiološke kontaminacije komposta su raznovrsni i uključuju polazni



materijal, mehanizaciju, nedovoljnu temperaturu tokom kompostiranja, mikrobiološki kvalitet korišćene vode, naknadnu kontaminaciju tokom sazrevanja i daljeg rukovanja kompostom i drugo. Poznavanje mikrobiološkog kvaliteta je značajno imajući u vidu da dodatkom komposta u poljoprivredno zemljište kompost postaje potencijalni izvor kontaminacije u proizvodnji hrane (**Gorny, 2006**).

## **2.2. Uticaj dodatka komposta od agroindustrijskog otpada na suzbijanje bolesti biljaka**

Rastuća svetska populacija i potrebe za hranom predstavljaju izazov za poljoprivredu. Smatra se da se 12% gubitaka prinosa nastaje usled prisustva bolesti izazvanih biljnim patogenima (**Sharma, 2012**). Pored toga, smatra se da su biljni patogeni razlog nestanka oko 30% svih biljnih vrsta (**Kucuk i Kivanc, 2003**). Stoga biljni patogeni, prevashodno gljive, predstavljaju jednu od najvećih pretnji za proizvodnju hrane i stabilnost ekosistema u svetu (**Benítez i sar., 2004**). Jedna od široko primenjivanih mera u suzbijanju fitopatogenih gljiva jeste upotreba fungicida. Međutim, danas se poljoprivreda susreće i sa zahtevima tržišta za smanjenjem ostataka pesticida u svežem voću i povrću, što ima za posledicu iznalaženje alternativa za kontrolu biljnih patogena (**Reuveni i sar., 2002**). Neselektivno delovanje pesticida, razvijanje rezistencije, rizik po životnu sredinu i bezbednost ljudi takođe idu u prilog značaju primene bezbednijih pristupa (**Sharma, 2012**).

Održiva poljoprivreda naročito se suočava sa izazovom proizvodnje dovoljne količine hrane uz održanje kvaliteta životne sredine. Između ostalog, održiva poljoprivreda se zasniva na biološkim procesima i biodiverzitetu zemljišta tako da su brojni postupci koji doprinose aktivnosti mikroorganizama u zemljištu značajan deo ovakvog integralnog pristupa. U ovakvu praksu može se svrstati i dodatak komposta od agroindustrijskog otpada zemljištu.

Poznat koristan efekat koji se postiže dodatkom kompostiranog agroindustrijskog otpada poljoprivrednom zemljištu, a od kog se polazi u ovom istraživanju, jeste i smanjenje incidence bolesti biljaka (**Bailey i Lazarovits, 2003; Hoitink, 2004**). Usled rezultata istraživanja koji ukazuju na ovakav efekat koji se postiže dodatkom komposta u zemljište, uveden je termin „supresivni kompost“. Supresivni supstrat/kompost može se definisati kao okruženje u kome je razvoj bolesti biljaka redukovano iako je patogen

prisutan, u usevima biljke koja je osetljiva za određenu bolest (**Diáñez i sar., 2005**). Upotreba komposta od agroindustrijskog otpada kao organskog dodatka zemljištu predstavlja primer prirodne biološke kontrole bolesti koja je rezultat kompleksne interakcije između mikroorganizama u kompostu, biljnih patogena i biljaka (**Avilés i sar., 2011**). Treba napomenuti da je supresivnost komposta uglavnom specifična. Većina komposta su prirodno supresivni kada su u pitanju bolesti biljaka izazvane uzročnicima iz rodova *Phytophthora* i *Pythium*, skoro 20% su supresivni i kad su u pitanju vrste roda *Rhizoctonia* (**Hoitink i Boehm, 1999**).

Efekat dodatka komposta u zemljište u smislu suzbijanja biljnih patogena potiče od abiotičkih ali i biotičkih faktora (**Suárez-Estrella, 2012; Boulter i sar., 2002**). Produkcija fungitoksičnih komponenti kao što su organske kiseline i amonijak usled organskih dodataka u zemljište može se posmatrati kao abiotički faktor, a direktan antagonizam mikroorganizama koji naseljavaju kompost prema biljnim patogenima predstavlja biotičku komponentu (**Suárez-Estrella, 2012**). Mikroorganizmi iz komposta koji kontrolišu bolesti smatraju se korisnim mikroorganizmima ili biokontrolnim agensima, a u osnovi kontrole bolesti nalazi se njihov odgovor na raspoložive rezerve energije dostupne u kompostu (**Hoitink i Boehm, 1999**).

Kao osnovne kategorije biološke kontrole biljnih patogena usled dodatka komposta u zemljište navode se opšta i specifična supresija (**Hoitink i sar, 1996**).

Opšta supresija rezultat je sveukupne mikrobne aktivnosti koja suzbija razvijanje patogena i direktno je vezana sa mikrobnim diverzitetom (**Stone i sar., 2004**). Mikrobiološka aktivnost zemljišta ili supstrata u kritičnim trenucima patogeneze, naročito tokom klijanja biljnog patogena ili kolonizacije, direktno je povezana sa ovakvim efektom (**Avilés i sar., 2011**). Više različitih mikroorganizama nalazi se u kompeticiji za nutrijente i prostor sa patogenima. U kompostu sporo oslobađanje nutrijenata pogoduje razvoju korisnih mikroorganizama, dok su patogeni u većoj meri zavisni od egzogenih izvora nutrijenata kao što su eksudati korena (**Diáñez i sar., 2005**).

Specifična supresija odnosi se na određenu grupu/vrstu mikroorganizama koji putem antagonizma ispoljenog prema određenom patogenu u određenom delu životnog ciklusa dovode do smanjenja incidence bolesti (**Stone i sar., 2004; Cook i Baker, 1983**). Smatra se da se samo specifični supresivni potencijal može preneti u drugo zemljište dodatkom male količine supresivnog supstrata (**Avilés i sar., 2011**).

### 2.3. Mikroorganizmi iz agroindustrijskog otpada i uloga u suzbijanju bolesti biljaka

Mikrobiološke karakteristike komposta zavise od sastava polaznog supstrata (izvora organske materije u polaznom otpadu), ali i primenjene tehnike kompostiranja. Takođe, one su zavisne i od međusobnih interakcija mikroorganizama, koje su važne tokom procesa kompostiranja, ali i nakon aplikacije komposta u zemljište (**Fuchs, 2010**). Dodatkom komposta poljoprivrednom zemljištu značajno se pojačava mikrobiološka aktivnost i diverzitet mikroorganizama usled činjenice da kompost deluje kao svojevrsni inokulum obogaćujući diverzitet, ali dodatak utiče i na razmnožavanje mikroorganizama inače prisutnih u zemljištu (**Innerebner i sar., 2006; Chu i sar., 2007**).

Pored toga što se mikrobiološka slika otpada menja tokom procesa kompostiranja postoji veza između diverziteta mikroorganizama u agroindustrijskom otpadu i u kompostu dobijenog od istog otpada. Iako se tokom kompostiranja razvijaju visoke temperature koje mogu eliminisati veliki broj antagonista prisutnih u početnom materijalu, korisni mikroorganizmi mogu preživeti u spoljašnjem sloju niže temperature, a nakon što temperatura padne ispod 40°C dolazi do rekolonizacije delimično pasterizovanog komposta i na taj način se tokom sazrevanja komposta razvija njegova supresivnost (**Avilés i sar., 2011; Hoitink i Boehm, 1999**). Stoga veći deo predstavnika populacija mikroorganizama u kompostu zapravo dolazi iz polaznog supstrata (**Pugliese i sar., 2008**). Smatra se da se kompost dobijen od različitih vrsta otpada razlikuje po mehanizmu suzbijanja patogena, jer su i interakcije mikroorganizama specifične. **Castaño i sar. (2011)** ukazali su na vezu sastava polaznog materijala i mikrobioloških karakteristika komposta, što opet ima za posledicu i različit efekat komposta na pojedine biljne patogene. Polazni materijal svojim sastavom diktira i diverzitet mikroorganizama koji koriste određene izvore energije, a najčešće je ovakva prilagođenost mikroorganizama i u vezi sa specifičnim antagonizmom. Tako je ustanovljeno da je zajednica mikroorganizama zadužena za inhibiciju *Pythium ultimum* populacija bakterija koje mogu da transformišu masne kiseline i tako redukuju klijanje spora patogena (**McKellar i Nelson, 2003**). **Bórrero i sar. (2006)** ukazuju da zajednice mikroorganizama iz komposta od komine grožđa koji

suzbija *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* uglavnom koriste kompleksne polimere, dok zajednice iz nesupresivnog treseta koriste šećere.

Brojna istraživanja ukazuju na to da su mikroorganizmi iz komposta od agroindustrijskog otpada u velikoj meri zaduženi za suzbijanje bolesti, ali od značaja su i abiotički faktori.

Način da se razdvoji biotički i abiotički efekat na biljne patogene jeste ispitivanje inhibitornog efekta sterilisanog i nesterilisanog komposta na rast fitopatogenih gljiva i pojavu bolesti. **Suárez-Estrella i sar. (2012)** ispitivali su inhibitorni efekat više vrsta komposta dobijenog od različitih materijala i došli do rezultata da je inhibitorni efekat nestao kod 10 od 17 uzoraka nakon sterilizacije, dok rezultati **Joshi i sar. (2009)** ukazuju da nema mnogo varijacija između različitih vrsta komposta i da je inhibicija prevashodno mikrobiološke prirode. **Noble i Coventry (2005)** su ispitivali supresivni efekat komposta i došli do zaključka da je mehanizam supresije primarno biološke prirode, mada ne isključuju i dodatni uticaj drugih, abiotičkih faktora. Istraživanja **Pane i sar. (2011)** ukazuju da dodatak komposta tresetu utiče na suzbijanje *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia minor*, supresivnost koja se postiže dodatkom komposta je specifična i u velikoj meri redukovana sterilizacijom.

U radu **Chen i Nelson (2008)** supresija poleganja krastavca uzrokovanog *Pythium ultimum* od strane komposta je redukovana prethodnim autoklaviranjem. **Craft i Nelson (1996)** ispitivali su suzbijanje *Pythium graminicola* i mikrobiološke karakteristike komposta sa ovakvim efektom. Termički tretman komposta doveo je do gubitka supresivnog efekta, a dodatak male količine netretiranog komposta u termički tretiran kompost je dovelo do vraćanja mikrobne populacije, kao i supresivnog efekta. Sličnim eksperimentom **Malandraki i sar. (2008)** pokazali su mikrobiološku prirodu suzbijanja *Verticillium dahliae* uz dodatak komposta. U *in vitro* testu dvojnih kultura 16 od 46 izolata bakterija i gljiva iz komposta je pokazalo inhibitorni efekat prema *V. dahliae*.

**Kavroulakis i sar. (2006)** navode da je supresivni efekat komposta dobijenog od agroindustrijskog otpada zasnovan na interakcijama komposta ili kompostne mikroflore sa biljnim patogenima. Supresivni efekat čajeva od komposta od agroindustrijskog otpada kao polaznog materijala ispitan je u radu **Siddiqui i sar. (2008)**. Ispitan je efekat nesterilnih čajeva, čajeva sterilisanih filtracijom i

autoklaviranih. Nesterilni čajevi su imali najveći inhibitorni efekat na *Choanephora cucurbitatum*. Nešto niži (a opet značajan) efekat imali su čajevi sterilisani filtracijom. Pretpostavka je da su za takav efekat odgovorni prisutni metaboliti mikroorganizama, a učinak je niži jer je uklanjanjem mikroorganizama isključen direktni mehanizam - kompeticija koja predstavlja jedan od značajnih mehanizama. **Van Elsas i sar. (2002)** takođe dolaze do zaključka da je suzbijanje prouzrokovača bolesti biljaka usko vezano sa zajednicama mikroorganizama u kompostu, a pretpostavlja se da je jedan od osnovnih mehanizama kompeticija za nutrijente i prostor. Pored toga, autori smatraju da antagonizam mikroorganizama iz komposta od agroindustrijskog otpada prema biljnim patogenima nije jedini mehanizam.

**Koné i sar. (2010)** ispitivali su suzbijanje folijarnih biljnih patogena paradajza od strane produkata na bazi komposta (kompostni čajevi) i došli do rezultata koji ukazuju da je mikrobiološka komponenta ovakvih produkata važna za ovakav efekat s obzirom na to da su ličati podvrgnuti sterilizaciji izgubili efekat na biljne patogene u *in vitro* istraživanju.

Određeni naponi su učinjeni i u smeru mogućnosti inokulacije komposta ispitanim biokontrolnim agensima. Pri tom se pokazalo da različite gljive ne kolonizuju jednako sve supstrate. Predstavnicima roda *Trichoderma* sp. se bolje razvijaju na supstratima sa više lignoceluloze dok *Penicillium* sp. bolje obrasta supstrat u koji se dodaje komina grožđa, medijum sa niskim sadržajem celuloze i manje šećera. (**Gershuny, 2011**). Ovim se može objasniti i različit efekat različitih vrsta komposta (odnosno njihovih autohtonih populacija) na biljne patogene.

Mikroorganizmi su uobičajeni stanovnici zemljišta, stajnjaka i biljnog otpadnog materijala. Mogu da transformišu agroindustrijski otpad, a njihova rasprostranjenost zavisi od organskih materija prisutnih u supstratu. Saznanja o divertitetu gljiva u agroindustrijskom otpadu su višestruka, imajući u vidu njihove korisne uloge ali i bezbedonosni aspekt.

Primarna uloga gljiva u agroindustrijskom otpadu ogleda se tokom transformacija u procesu biokonverzije (**Bari i sar., 2007**). Zahvaljujući moćnim enzimskim sistemima gljive mogu da vrše transformaciju lignoceluloznog materijala koji čini osnovnu komponentu otpadnog materijala biljnog porekla. Pored toga, gljive mogu učestvovati u procesu bioremedijacije koji se odvija uporedo sa kompostiranjem i

tako transformisati toksična jedinjenja prisutna u otpadu (na primer derivati pesticida) **(de Sousa Fragoeiro, 2005)**.

Mikrobiološka priroda supresivnosti komposta od agrindustrijskog otpada potiče od mikroorganizama koji se u njemu nalaze, a među njima i filamentoznih gljiva, koje stupaju u različite interakcije sa drugim mikroorganizmima iz kojih proizilazi primena komposta u integralnom pristupu zaštiti useva.

Treba imati u vidu da gljive prisutne u agroindustrijskom otpadu mogu predstavljati i opasnost po zdravlje ljudi i životinja. *Aspergillus fumigatus* je gljiva koja se veoma često nalazi u vazduhu, zemljištu, a i organskom materijalu tokom razgradnje i predstavlja jak alergen, izaziva aspergiloze kod ljudi i stvara niz toksičnih metabolita **(Wu i sar., 2003)**. Među uobičajenim gljivama koje potiču iz vazduha, vrste rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* i *Cladosporium* su povezane sa spektrom problema vezanih za ljudsko zdravlje kao što su alergije, astma, infekcije, iritacije i slično **(Wu i sar., 2003; Shelton i sar., 2002)**.

### 2.3.1. Supresivni efekat komine grožđa

Komina grožđa je sporedni produkt vinarija nastao nakon ceđenja grožđa. Između 15% i 20% biljne mase tokom prerade grožđa u vino je otpad, što čini hiljade tona **(Diánez i sar., 2005)**, a 90% komine koja nastaje kao otpad potiče iz vinske industrije. Ovakav otpad sadrži veliku količinu biodegradabilnih komponenata. Sadrži pokožicu, pulpu, semenke i ćelije kvasaca koji je učesvovao u alkoholnoj fermentaciji **(Mazza, 1995)**. Semenke čine oko 40% komine, pokožica i pulpa 60% **(Nair i Pullammanappallil, 2013)**. Pokožica se sastoji iz kompleksno umreženih polimera: celuloze, hemiceluloze, pektina i lignina. Sadržaj lignina u komini je od 38 do 40% **(Valiente, 1995)**. Pored lignina, komina je bogata neutralnim šećerima, polifenolima, vlaknima, taninima, vinskom kiselinom, sirćetnom kiselinom i antocijanima **(Nair i Pullammanappallil, 2013)**.

Komina, ukoliko nije adekvatno tretirana, može uzrokovati niz problema u životnoj sredini. U Evropskoj uniji, svi sporedni produkti industrije vina moraju biti destilovani (EU Council Regulation N°1493/1999), a zatim se ostatak nakon eventualnog uklanjanja tartarata i semenki sagoreva u cilju dobijanja energije ili kompostira.

Komina se često koristi za destilaciju i proizvodnju tradicionalnih jakih pića (Silva i sar., 2000). Iz semenki grožđa se dobija ulje, a ostatak ima veliki potencijal za ekstrakciju vrednih jedinjenja koja se mogu koristiti kao antioksidansi (Nair i Pullammanappallil, 2013) ili prirodne boje (Rym i sar., 2012).

Komina se odlikuje niskom pH (3,8 – 6,8), visokom koncentracijom određenih makronutrijenata (sadržaj kalijuma 11,9 – 72,8 g/kg), visokom koncentracijom fitotoksičnih polifenola (1,2 – 19 g/kg), niskom koncentracijom mikronutrijenata i teških metala. Bustamante i sar. (2008) ističu navedene karakteristike uz napomenu da nisu kompatibilne sa zahtevima poljoprivrednog zemljišta, te stoga ovakav otpad mora biti kondicioniran pre upotrebe. Ovakvo kondicioniranje podrazumeva pre svega podešavanje pH, kompostiranje i mešanje sa drugim vrstama otpada, najčešće animalnog porekla (Bustamante i sar., 2008; Paradelo i sar., 2012).

Santos i sar. (2008) i Bai i sar. (2008) ukazuju na mogućnosti kontrole biljnih patogena pomoću komine, a Garcia-Martínez i sar. (2009) ukazuju na pogodnost komposta od otpada iz vinske industrije kao supstrata za gajenje paradajza.

Efekat komposta od komine grožđa i njegovog vodenog ekstrakta uspešno je testiran kao sredstvo za sprečavanje razvića *Botrytis cinerea* na paradajzu i paprici (Elad i Shtienberg, 1994). Gorodecki i Hadar, 1990 ispitali su efekat komine grožđa na *Rhizoctonia solani* i *Sclerotium rolfsi*, a isti autori (Hadar i Gorodecki, 1991) ispitali su i inhibitorni efekat komposta od komine na klijanje sklerocija i viabilnost *R. solani*. Inhibitorni efekat povezuje se sa velikim brojem izolata *Penicillium* spp., a predstavnici ovog roda u velikoj meri kolonizuju kominu grožđa, dok uobičajeni paraziti *Rhizoctonia solani* iz roda *Trichoderma* nisu izolovani u ovom istraživanju.

Hadar i Mandelbann (1992) ispitali su karakteristike komposta od komine grožđa i došli do zaključka da je suzbijanje *Rhizoctonia solani* i *Phytophthora aphanidermatum* u prisustvu komposta rezultat mikrobiološke aktivnosti koja se razvija tokom procesa kompostiranja. Sterilizacijom komposta je dolazilo do gubitka efekta na biljne patogene, a nakon dodatka male količine nesterilnog komposta, kompostu je vraćen supresivni efekat. Smatra se da je jedan od osnovnih mehanizama zapravo kompeticija mikroorganizama iz komposta i patogenih mikroorganizama za nutrijente.

U istraživanju Bórrero i sar. (2004; 2006) komina grožđa pokazala se efikasnom u suzbijanju *F. oxysporum* var. *lycopersici*. Ovakav efekat potiče od biotičkih

i abiotičkih faktora s obzirom na to da je posle termičkog tretmana kompost od komine grožđa zadržao inhibitorski efekat, ali u manjoj meri u odnosu na netretiran kompost.

S obzirom na mogućnosti primene komine od grožđa od važnosti je izučavanje diverziteta mikroorganizama, a prevashodno gljiva, kako bi se omogućilo razmatranje ekoloških kao i bezbedonosnih aspekata. **Steichsbier i sar. (1982)** su na osnovu gajenja na selektivnim podlogama i morfoloških metoda izučavali proces humifikacije komine grožđa sa aspekta smene populacija. Komini su na početku u velikoj meri kolonizovali kvasci, zatim termofilne/termotolerantne bakterije, aktinomicete i filamentozne gljive iz komine koje većinski pripadaju rodovima *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Thermomyces* i *Mucor*. U radu **Ntougias i sar. (2010)** prvi put je uz pomoć molekularnih metoda izvršena karakterizacija filamentoznih gljiva iz komine grožđa. Izolati koji su u najvećoj meri bili zastupljeni u komini pokazali su najveći stepen sličnosti sa *Aspergillus fumigatus*, *Bionectria ochroleuca*, *Haematonectria haematococca*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Penicillium* sp., *Geotrichum candidum* var. *citri-aurantii*, *Mycocladus corymbifer* i *Aspergillus* sp.

### 2.3.2. Supresivni efekat duvanskog otpada i komposta od džibre

Pored komine grožđa i istraživanja u okviru ove disertaciju uključene su i druge vrste otpada – otpad iz duvanske industrije i kompost od džibre, otpada koji nastaje nakon destilacije komine u proizvodnji šljivovice.

Zbog proizvodnje lokalnog karaktera nema radova koji ukazuju na mogućnosti iskorišćavanja džibre u smislu organskog dodatka zemljištu i efekta na suzbijanje bolesti biljaka, dok duvanski otpad nastaje u većim količinama i do sada je više napora istraživača bilo usmereno na mogućnosti njegove upotrebe.

Kompostirani otpad iz duvanske industrije se u radu **Okur i sar. (2008)** preporučuje kao organski dodatak zemljištu u cilju poboljšanja fizičkih, hemijskih i mikrobioloških karakteristika zemljišta. Imajući u vidu prisustvo nikotina koji može biti štetan po diverzitet korisnih i štetnih organizama u ekosistemu, preporučuje se kompostiranje otpada uz biodegradaciju nikotina i prethodno mešanje sa drugim vrstama otpada (**Adediran i sar., 2004**). U ovom istraživanju izvršena je izolacija gljiva iz duvanskog otpada i testiranje antagonizma izolata prema fitopatogenim vrstama.



## 2.4. Biološka kontrola

Termin „biološka kontrola“ u fitopatologiji odnosi se na korišćenje mikrobnih antagonista (introdukovanih ili autohtonih) u suzbijanju populacija jednog ili više izazivača bolesti. Mikroorganizmi koji ispoljavaju antagonizam prema biljnim patogenima nazivaju se „biokontrolni agensi“ (**Pal i McSpadden Gardener, 2006**). Pored toga, termin biološka kontrola se često koristi i u širem smislu i obuhvata agronomsku praksu koja deluje u pravcu suzbijanja prouzrokovaca bolesti biljaka putem različitih biotičkih i abiotičkih faktora (na primer dodatak komposta) (**Alabouvette i sar., 2009**).

Iako je sve veći broj proizvoda namenjenih biološkoj kontroli prisutan na tržištu, ovi proizvodi predstavljaju samo 1% od ukupne količine primenjenih sredstava u usevima, dok fungicidi predstavljaju čak 15% od ukupnih hemijskih sredstava koji se koriste u poljoprivredi (**Fravel, 2005**). Ali, treba imati u vidu da direktiva EU (EC) No 1107/2009, u preambuli 35 ističe da "da bi se obezbedio visok nivo zaštite zdravlja ljudi životinja, kao i bezbednost životne sredine, potrebno je sredstva za zaštitu bilja pravilno koristiti, u skladu sa principima integrisanog upravljanja štetnim organizmima i davanje prioriteta ne hemijskim i prirodnim alternativama, kad god je to moguće“.

## 2.5. Mehanizmi antagonističkog delovanja između gljiva

Mehanizmi delovanja antagonista (biokontrolnih agenasa) na fitopatogene gljive uključuju: mikoparazitizam, kompeticiju za prostor i nutrijente, kompeticiju za gvožđe putem siderofora, inhibiciju patogena putem antimikrobnih jedinjenja (antibioza), delovanje hidrolitičkih enzima (koje može biti u sklopu mikoparazitizma) i indukciju odbrambenog odgovora biljaka. Najčešće nije u pitanju jedan određen mehanizam već sinergističko dejstvo više različitih mehanizama. (**Diáñez i sar., 2005**). Dešava se da određeni biokontrolni agens različitim mehanizmima deluje na suzbijanje različitih prouzrokovaca bolesti biljaka (**Whipps, 2001**).

Od navedenih tipova mehanizama, mikoparazitizam i kompeticija mogu se svrstati u direktan antagonizam, koji je rezultat direktnog kontakta patogena, dok ostali predstavljaju indirektno mehanizme (**Junaid i sar., 2013**). Upoznavanje mehanizama antagonizma prema biljnim patogenima važno je ne samo sa aspekta razvoja adekvatne

metode za selekciju potencijalnih biokontrolnih agenasa, već i za određivanje adekvatnih postupaka primene u biološkoj kontroli (Sneh, 1998).

#### 2.5.1. Mikoparazitizam

Kada je u pitanju interakcija između saprofitnih i fitopatogenih gljiva, mikoparazitizam predstavlja vrstu hiperparazitizma, pri čemu antagonist (saprofita gljiva) parazitira na biljnom patogenu. Neke od vrsta koje ispoljavaju ovakvo svojstvo prema biljnim patogenima su *Acremonium alternatum*, *Acrodontium crateriforme*, *Ampelomyces quisqualis*, *Cladosporium oxysporum*, *Gliocladium virens* (Kiss, 2003), kao i predstavnici roda *Trichoderma* (Sharma, 2012).

Mikoparazitizam zahteva kontakt između gljiva. Trofičkom kretanju ka hifama druge gljive prethodi prepoznavanje signalnih molekula od strane gljive domaćina. Sledi obmotavanje hifama pri kom mikoparaziti luče enzime zadužene za hidrolizu ćelijskog zida patogena u kome nastaju manji otvori, nakon čega ćelijski sadržaj koriste za svoju ishranu (Benítez i sar., 2004; Sharma, 2012). Ovakva interakcija je kompleksna i pored fizioloških prate je i morfološke promene. Dolazi do umotavanja oko hifa domaćina, razvoja struktura sličnih apresorijama, prodora i ubijanja domaćina (Lorito i sar., 1996; Benítez i sar., 2004). Mikoparazitizam je teško odvojiti od nekih drugih mehanizama interakcije. Mnogi produkuju i antibiotike koji prethodno oslabe gljivu na kojoj će parazitirati, a imajući u vidu da je prisutno delovanje na ćelijski zid fitopatogene gljive, aktivnost hidrolitičkih enzima je neophodna u okviru mikoparazitizma. Jedan od primera za ovakav vid antagonizma je biološka kontrola *Rhizoctonia solani* od strane *Trichoderma* sp. (Diáñez i sar., 2005).

#### 2.5.2. Kompeticija za prostor, nutrijente i gvožđe

Jedan od važnih mehanizama preživljavanja u različitim ekosistemima jeste i kompeticija za prostor i nutrijente. Kompeticija nije među primarnim mehanizmima kad je biološka kontrola u pitanju, ali je itekako značajan mehanizam kod antagonista koji imaju sposobnost da iz prostora uz samu površinu korena biljke istisnu patogene gljive (Howell, 2003; Hoitink i Changa, 2004). Stoga je ovaj mehanizam od većeg značaja za patogene koji se razvijaju u zemljištu kao što su fitopatogeni predstavnici rodova *Fusarium* i *Pythium*.

Predstavnici zajednice mikroorganizama brzo koriste raspoložive izvore energije i nalaze se u stalnoj kompeticiji za dostupna razgradiva organska jedinjenja i druge nutrijente u okruženju (**Stone i sar., 2004**). Mikroorganizmi koji potiču iz komposta bore se za nutrijente sa biljnim patogenima iz rizosfere, a većina patogena predstavlja slabe saprofite koji najčešće gube u kompeticiji za nutrijente u zemljištu u koje je dodat kompost (**Hoitink i Changa, 2004**).

Poseban značaj ima kompeticija za nutrijente koji su esencijalni, ali prisutni u niskim koncentracijama kao što su gvožđe i mangan. Primera ovakvog mehanizma je više u interakcijama bakterija i fitopatogenih gljiva. Jedan od takvih mehanizama je produkcija siderofora od strane sojeva *Pseudomonas fluorescens*, pomoću kojih se vezuje gvožđe iz mikrookruženja (**Pal i McSpadden Gardener, 2006**). Siderofore su helatori gvožđa koje luče mnogi mikroorganizmi kako bi ga vezali i rastvorili i ujedno učinili nedostupnim patogenima. Ovakav sistem uključuje i protein koji je važan za transportovanje ovako vezanog gvožđa u ćeliju. Smatra se da je pomenuti mehanizam dosta zastupljen u suzbijanju gljiva i oomiceta kao prouzrokovaca bolesti (**Duijff i sar., 1994**).

Neki patogeni su zavisni od određenih supstanci kao što su masne kiseline, koji su im potrebne da prevaziđu dormanciju pre infekcije. Određeni antagonisti upravo kompeticijom za ove stimulanse redukuju sposobnost patogena da izazovu bolest (**Junaid i sar., 2013**). Kompeticija za nutrijente je jedan od najčešćih mehanizama između mikroorganizama iz komposta od agroindustrijskog otpada i biljnih patogena, koji se pominju u literaturi (**McKellar i Nelson, 2003**).

Jedan od mehanizama kojim deluju najpoznatiji biokontrolni agensi iz roda *Trichoderma* je i kompeticija koja je moguća zahvaljujući brzom rastu, mogućnosti da preživljavaju u nepovoljnim uslovima i efikasnosti u korišćenju nutrijenata (**Benítez i sar., 2004**). Među mehanizmima kontrole *Botrytis cinerea* od strane predstavnika *Trichoderma* spp., veoma važnom smatra se upravo kompeticija s obzirom na osetljivost ovog patogena na manjak nutrijenata (**Latorre i sar., 2001**). Međutim, ovaj mehanizam najčešće je sinergistički udružen sa produkcijom antibiotika i delovanjem hidrolitičkih enzima (**Howell, 2003**).

### 2.5.3. Produkcija hidrolitičkih enzima

Gljive su poznate po lučenju različitih hidrolitičkih enzima i mogućnosti da razlažu veliki broj organskih polimera kao što su hitin, proteini, celuloza, hemiceluloza i drugi. Neki od ovih enzima mogu delovati i kroz mehanizam antagonizma prema fitopatogenim gljivama. Od posebnog značaja jesu hitinaze i  $\beta$ -1,3-glukanaze koje imaju ulogu u razgradnji polisaharida – hitina i  $\beta$ -glukana, koji se nalaze u sastavu ćelijskog zida gljiva (**Whipps, 1997; Kavroulakis i sar., 2006**). Hitin je nerastvorljivi polisaharid koji se sastoji iz jedinica N-acetilglukozamina povezanih 1,4-kovalentnom vezom, sa trodimenzionom helikoidnom strukturom koja je stabilizovana vodoničnim vezama. Hitin čini 22-44% ćelijskog zida gljiva i stoga je esencijalan za strukturni integritet hifa. Hitinolitički enzimi čine zapravo kompleks endohitinaza, egzohitinaza i N-acetilglukozaminidaza, a konačan produkt njihove aktivnosti je N-acetilglukozamin. (**Sharma, 2012**).

Antagonistička aktivnost izolata vrsta *Trichoderma* podrazumeva i sintezu hidrolitičkih enzima, kao što su hitinaze, glukanaze, proteaze i drugi (**Lorito, 1998**). Među antagonistima koji putem ovakvog mehanizma delovanja narušavaju ćelijski integritet biljnih patogena nalazi se *Trichoderma koningii*. Ispitivanja **Howell (2003)** ukazuju da transformisan izolat *T. koningii* koji nije imao mogućnost sinteze navedenog enzima pokazuje značajno smanjen stepen antagonizma prema fitopatogenim gljivama. Ipak, ne dolazi do potpunog odsustva antagonizma, što opet ukazuje na to da je sinteza hitinaza i glukanaza samo jedan od mehanizama biološke kontrole kada je ova gljiva u pitanju.

$\beta$ -1,3-glukanaze inhibiraju klijanje spora ili rast patogena i često deluju zajedno sa hitinazama i antibioticima. Kod bakterija ovi enzimi uglavnom imaju ulogu u ishrani dok kod gljiva primarno imaju druge funkcije – u morfogenetičkim, morfolitičkim procesima tokom razvoja gljiva i diferencijacije, zatim u dobijanju ugljenika i energije u stanju gladovanja kada deluju kao autolitički enzimi, a tek na kraju je i uloga u ishrani saprofita i mehanizam antagonizma mikoparazita (**El-Katatny i sar., 2001**).

Efekat delovanja enzima koji narušavaju ćelijski zid patogena je dvojak, imajući u vidu da pojedini produkti koji nastaju pri hidrolizi mogu doprineti rezistenciji biljke domaćina. Takođe, određene agrotehničke mere mogu indirektno uticati na sprečavanje bolesti putem navedenog mehanizma. Dodatak hitozana zemljištu nakon žetve tako

podstiče degradaciju patogena u zemljištu od strane već prisutnih mikroorganizama (**Pal i Mc Spadden Gardener, 2006**).

Hitinaze i  $\beta$ -1,3-glukozidaze predstavljaju najproučavanije antifungalne proteine, a geni koji kodiraju navedene enzime pružaju mogućnosti u proizvodnji transgenih biljaka otpornih na gljive, uzročnike bolesti (**Sharma, 2012**).

Pored enzima koji učestvuju u hidrolizi polisaharida, jedan od značajnih mehanizama antagonizma može biti i produkcija proteaza koje utiču na hidrolizu enzima patogena. Tako enzimi *Botrytis cinerea* mogu biti inaktivirani aktivnošću proteaza koje proizvodi *Trichoderma harzianum* (**Elad i sar., 1999**). Hidrolitički enzimi *B. cinerea* ključni su za prvu fazu interakcije sa domaćinom. Ovi enzimi uključuju delovanje kutinaze i pektinolitičkih enzima koji su zaduženi za nastanak infekcije, a antagonisti mogu hidrolizovati ove enzime i na taj način uticati na sprečavanje nastanka bolesti (**Kapat i sar., 1998**).

#### 2.5.4. Produkcija antibiotika i drugih toksičnih metabolita

Većina mikroorganizama ima sposobnost da proizvodi i luči jednu ili više komponenta sa svojstvom specifičnih ili nespecifičnih antibiotika. Mehanizam biološke kontrole koji podrazumeva delovanje ovakvih metabolita na biljne patogene naziva se antibioza (**Hoitink i sar., 1996**). Antibioza je jedan od važnih mehanizama za preživljavanje mikroorganizama kroz eliminaciju konkurencije za izvore hrane koja je često limitirana u zemljištu (**Ellis i sar., 2000**). Antibioza se dešava tokom interakcije dva organizma pri čemu se proizvode metaboliti niske molekularne mase koja se mogu podeliti u više kategorija: nepolarne/isparljive, polarne/neisparljive i antibiotike rastvorne u vodi. Smatra se da su isparljivi metaboliti dosta efikasniji s obzirom na to da mogu delovati na udaljenim mestima od mesta produkcije (**Junaid i sar., 2013**).

*Trichoderma* i *Gliocladium* su srodni biokontrolni agensi u čiji složen mehanizam delovanja spada i produkcija antibiotika gliovirina i gliotoksina (**Howell i sar., 1993**). Pored pomenutog, predstavnici roda *Trichoderma* proizvode viridin, triholin, glizoprenine, heptelidinsku kiselinu, terpene, pirone i peptaibole koji mogu da inhibiraju rast fitopatogenih gljiva (**Sharma, 2012; Hjeljord i Tronsmo, 1998**).

Pored antibiotika, mnogi drugi sporedni produkti metabolizma mikroorganizama mogu delovati inhibitorno na biljne patogene. Primeri za ovakav mehanizam su uglavnom među bakterijskim antagonistima, a takav je produkcija HCN-a od strane

*Pseudomonas fluorescens* pokazala se kao mehanizam za suzbijanje biljnih patogena (Voisard i sar., 1989).

#### 2.5.5. Indukcija odbrambenog odgovora biljaka

Indukovana rezistencija podrazumeva uticaj mikroorganizama ili abiotičkih faktora na pokretanje mehanizama odbrane kod biljaka (Nelson i Boehm, 2002; Kloepper i sar., 1992). Indukovana rezistencija može biti uslovljena izlaganjem biljke patogenim i nepatogenim mikroorganizmima ili različitim hemijskim agensima kao što su salicilna kiselina, jasmonska kiselina, etilen, 2,6-dichloro-izonikotinska kiselina ili S-metil-estar benzo-tiadiazol-7-karbotionske kiseline (Vallad i sar., 2000; Glazebrook, 2001). Salicilna kiselina koju mogu proizvoditi i određeni biokontrolni agensi često se metaboliše tokom infekcije patogena i vodi ka ekspresiji proteina zaduženih za imuni odgovor. Proteini uključuju različite enzime odgovorne za liziranje ćelija patogena, ali utiču i na veze između biljnih ćelija kako bi se oduprle infekciji ili uzrokuju lokalno odumiranje ćelija. Ovakav efekat opisan je i kod više mikroorganizama – biokontrolnih agenasa (Van Loon i sar., 1998). Korisni mikroorganizmi kao što su mikorizne gljive, bakterije aktivatori biljnog rasta (plant growth promoting) i biokontrolni agensi (*Trichoderma* sp.) mogu indukovati odbrambeni odgovor kod biljaka (Avilés i sar., 2011). Ovakav efekat potvrđen je u radu Saksirirat i sar. (2009), koji su ispitali efikasnost *Trichoderma* sp. u indukciji rezistencije kod paradajza. Nakon inokulacije zemljišta u lišću je došlo do jače aktivnosti hitinaza i glukanaza.

#### 2.6. Izolacija i *in vitro* selekcija antagonista fitopatogenih gljiva

S obzirom na značaj mikroorganizama iz komposta i agroindustrijskog otpada i njihovog antagonizma prema biljnim patogenima, ovakav materijal je pogodan i za izolaciju i selekciju antagonista. Ispitivanje interakcija između različitih mikroorganizama važno je sa aspekta objašnjenja promena koje se prirodno dešavaju u strukturi zajednica gljiva, ali i sa aspekta iskorišćavanja ovih interakcija za biološku kontrolu. Pored supresivnog zemljišta ili drugog supstrata (supresivnog komposta) od kojih se polazi pri izolaciji i selekciji potencijalnih antagonista, među endofitnim vrstama takođe je veliki broj onih koji utiču na suzbijanje biljnih patogena (Mejía i sar., 2008).

Jedan od testova koji se najčešće primenjuje za *in vitro* selekciju izolata dobijenih standardnim mikrobiološkim metodama jeste konfrontacijski test ili test dvojnih kultura na čvrstoj podlozi koji predstavlja osnovnu proceduru u ispitivanju antagonizma. Tokom ovog testa posmatra se interakcija kolonija dva mikroorganizama zasejana na čvrstu hranljivu podlogu. Nakon inkubacije i razvića dve kolonije (izolata – potencijalnog antagonista i patogene gljive), posmatraju se različiti pokazatelji antagonizma. Pokazatelji posmatrani u različitim radovima razlikuju se u zavisnosti od mehanizma koji je većina ispitivanih izolata ispoljavala (**Mejía i sar., 2008; Badalyan i sar., 2004; Park i sar., 2002; Kanjanamaneesathian i sar., 1994.; Martínez-Álvarez i sar., 2012; Lahlali i Hijri, 2010**) i mogu se razdvojiti na kategorije:

- Jedan od najčešćih pokazatelja je procenat inhibicije rasta kolonije patogene gljive u odnosu na kontrolu koji se određuje merenjem prečnika kolonije patogena i poređenjem sa kolonijom na kontrolnoj podlozi na koju je zasejan samo patogen;
- Kao drugi parametar uzima se i pojava zona inhibicije rasta ukoliko dolazi do zaustavljanja rasta patogene gljive usled prisutnog antagoniste, a pre dodira micelija. Smatra se da pojava ovakvog rezultata konfrontacijskog testa ukazuje na antibiozu;
- U određenim slučajevima se određuje smanjenje poluprečnika micelije fitopatogene gljive prema koloniji izolata u odnosu na poluprečnik micelije ka drugoj strani Petri kutije. Smatra se da je „pobednik“ u konfrontacijskom testu ona gljiva kod koje je rast u većoj meri radijalan;
- Kompeticija najčešće podrazumeva neposredan kontakt dvaju micelija i prerastanje jedne preko druge;
- Izolat se odbacuje kao antagonista, ukoliko se gljive podjednako razvijaju, a rast obe micelije biva zaustavljen pri dodiru kolonija (mutualistička inhibicija).

U nekim slučajevima dolazi do promene u izgledu kolonija (najčešće gubitku pigmentacije pri rastu sa kolonijom antagonista u konfrontacijskom testu (**Gveroska i Ziberoski, 2011; Berg i sar., 2005; Zaim i sar., 2013**)).

Koji od pokazatelja će biti zastupljen u konkretnom ispitivanju zavisi od mehanizma koji ispoljavaju ispitivani izolati prema ispitivanoj fitopatogenoj gljivi. Izolati koji se karakterišu boljim sposobnostima kolonizacije i brzim rastom najčešće ispoljavaju aktivnost pri dodiru kolonije sa kolonijom fitopatogene gljive (kompeticija) i ovakav efekat je dosta čest za vrste iz roda *Trichoderma*, dok antagonisti rodova

*Penicillium* i *Aspergillus* koje karakteriše nešto sporiji rast, ali i lučenje antibiotika dovode do pojave zona inhibicije. (Park i sar., 2002; Badalyan i sar., 2004; Kanjanamaneesathian i sar., 1994).

Procenat izolata koji pokazuju antagonizam prema određenim fitopatogenim gljivama od ukupnog broja ispitivanih je različit u zavisnosti od materijala iz kog potiču izolati kao i planiranja i cilja selekcije. U nekim slučajevima ciljano se testiraju samo izolati koji pripadaju rodovima poznatim po svom antifungalnom delovanju, dok se u drugim ispituju svi izolati iz uzoraka. Diáñez i sar. (2005) su određivali supresivni efekat komposta od komine grožđa prema *Pythium aphanidermatum* i *Phytophthora parasitica*. Iz komposta je dobijeno 432 različita izolata mikroorganizama od kojih je u *in vitro* selekciji sedam pokazalo inhibiciju prema *P. aphanidermatum*, a dva prema *P. parasitica*. Može se zaključiti da procenat izolata koji pokazuju antagonizam zavisi i od ispitivanog fitopatogenog mikroorganizma i da su interakcije između gljiva specifične. Jedan od načina da se *in vitro* ispita mehanizam antagonizma kao i faktori koji na njega utiču jesu ogledi koji uključuju testiranje rasta patogenih gljiva u prisustvu filtrata tečnih kultura (supernatanta) antagonista (Ma i sar., 2008).

Inhibitorni efekat filtrata dobijenih iz tečnih kultura antagonista prethodno selektovanih konfrontacijskim testom ukazuje na prisustvo aktivnih neisparljivih metabolita (Odebode, 2006). Ogledi ispitivanja uticaja filtrata na rast fitopatogena mogu dati odgovor na pitanja adekvatnog vremena gajenja kako bi se produkovali određeni aktivni metaboliti antagonista i uvid u mogućnosti indukcije određenih mehanizama koji će pospešiti ukupni antagonistički efekat (na primer indukcija enzima zaduženih za antagonistički efekat dodatkom određenih supstrata kao što je hitin) (Terna i sar., 2013). Termostabilnost aktivnih komponenata može biti ispitana poređenjem efekta filtrata sterilisanih toplotom i filtrata sterilisanih mikrobiološkom filtracijom (Narain, 1972), a ekstrakcija supernatanta i ispitivanje efikasnosti pojedinih frakcija je početak puta ka određivanju aktivnih metabolita (Ezziyyani i sar., 2007; Nicoletti i sar., 2004). Sa druge strane odsustvo efekta sterilnih filtrata tečnih kultura na rast fitopatogenih gljiva, a suzbijanje njihovog rasta od strane istog izolata u konfrontacijskom testu ukazuje na dominantnu ulogu direktnog antagonizma (Almri i sar., 2012).



Važno je istaći visoku specifičnost interakcija između gljiva. Ne postoje antagonisti koji se smatraju univerzalnim biokontrolnim agensima. Izolat koji ispoljava aktivnost prema određenom biljnom patogenu može se smatrati biokontrolnim agensom, ali samo za suzbijanje tog određenog patogena (**Terna i sar., 2013**). **Ma i sar. (2008)** ispitivali su mogućnosti inhibicije više fitopatogenih gljiva od strane *Penicillium striatisporum* Pst10. Dobijeni rezultati ukazuju upravo na specifičnost interakcija s obzirom da su neki izolati fitopatogena u velikoj meri inhibirani dok na druge *P. stratisporum* Pst10 nije imao inhibitorni efekat.

### 2.7. *In vivo* selekcija antagonista fitopatogenih gljiva

Izolacija i selekcija antagonista, potencijalnih biokontrolnih agenasa, pored niza *in vitro* testova obuhvata i *in vivo* testove. *In vitro* testovi služe za preliminarnu selekciju antagonista i ispitivanje mehanizama antagonizma, ali kako bi se utvrdila efikasnost selektovanih mikroorganizama u realnim uslovima, neophodno je izvršiti ispitivanja u oglecima sa zaraženim biljkama u uslovima staklenika i na polju. Rezultati koji se dobiju u pojedinim fazama istraživanja međusobno se mogu razlikovati zbog uticaja uslova sredine. Usled toga može se desiti i da izolati selektovani u laboratorijskim uslovima ne utiču na suzbijanje bolesti *in vivo*, a nekad se dešava da izolati koji *in vitro* ne pokazuju inhibitorni efekat *in vivo* zapravo suzbijaju bolest usled delovanja mehanizma indukcije rezistencije biljaka.

Treba imati u vidu da biokontrolni agensi, uglavnom, u poljskim uslovima nisu tako efikasni kao što su fungicidi (**Brunner i sar., 2005.**). Za uspešnost primene biokontrolnog agensa u uslovima staklenika i polja važno je imati u vidu faktore sredine koji mogu uticati na preživljavanje biokontrolnog agensa i mehanizme antagonizma. Faktori kao što su pH vrednost i sadržaj i vrsta dostupne organske materije direktno utiču na aktivnost mikroorganizama, a samim tim i na suzbijanje bolesti (**Mazzola, 2002**).

Više od 80 godina poznato je da filamentozne vrste roda *Trichoderma* stupaju u antagonističke odnose sa različitim fitopatogenim gljivama (**Weindling, 1932**) i danas su jedna od čestih komponenti komercijalnih biofungicida koji se koriste u kontroli ekonomski važnih biljnih patogena (**Harman, 2000**).

Sojevi koji se koriste u biološkoj kontroli treba da imaju sposobnost preživljavanja u širokom opsegu temperature, saliniteta, da podnose nisku vlagu, da su otporni na primenljivane fungicide i druge hemikalije. S obzirom da *Trichoderma* ima sposobnost preživljavanja u različitim ekološkim nišama, ove karakteristike, zajedno sa sposobnošću da imaju brz rast i proizvode visoko efikasne siderofore pomoću kojih helati gvožđa inhibiraju rast drugih gljiva, čine vrste roda *Trichoderma* snažnim konkurentom (Klein i Eveleigh, 1998; Eisendle i sar., 2004).

Ipak se može reći da su objavljena brojna istraživanja koja se odnose na *in vitro* uslove, odnosno na interakciju patogen – biokontrolni agens, ali manji broj radova je vezan za rasvetljavanje složenih interakcija patogen – biljka – biokontrolni agens u uslovima *in vivo*. Ono što prvenstveno ograničava ova istraživanja je efikasno praćenje procesa (Lu i sar., 2004). Efikasno praćenje biokontrolnog procesa *in vivo* zasniva se na upotrebi vitalnih markera (Mikkelsen i sar., 2003), čime se stvara mogućnost razvoja novih metoda selekcije i poboljšanja aplikacije. Primena *green fluorescent protein* (GFP) kodiranog (*gfp*) gena je moćno sredstvo za praćenje sudbine mikrobnih (bakterijskih i glivičnih) inokulanata u *in situ* uslovima (Hassan i sar., 2002).

*In vivo* ogledi i sama primena biokontrolnih agenasa imaju značajne rezultate kad je u pitanju biološka kontrola bolesti u uslovima stakleničke proizvodnje. Značajano veći procenat komercijalnih biopreparata namenjen upravo upotrebi u staklenicima iako površina pod staklenicima čini samo 0,02% ukupnih poljoprivrednih površina (Paulitz i Bélanger, 2001). Može se pretpostaviti da je veći potencijal biološke kontrole u odnosu na useve u polju upravo usled manjih varijacija različitih faktora i većeg stepena kontrole u procesu proizvodnje. Među patogenima koji izazivaju bolesti i dovode do gubitaka u staklenicima nalaze se i *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Pythium aphanidermatum* (Utkhede, 2004). Među prirodnim antagonistima navedenih patogena koji *in vivo* daju dobre rezultate nalaze se brojne bakterije i gljive. Pored sojeva roda *Trichoderma* kao najzastupljenijih biokontrolnih agenasa, potvrđena je efikasnost i: nepatogenih sojeva *F. oxysporum*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pythium oligandrum*, *Gliocladium virens*, *Streptomyces griseoviridis* i mnogih drugih (Paulitz i Bélanger, 2001).

## 2.8. Identifikacija gljiva, antagonista biljnih patogena

Jedan od neophodnih koraka u izučavanju ekologije gljiva je i određivanje strukture populacija mikroorganizama. Identifikacija gljiva tradicionalno se zasnivala na morfološkim karakteristikama. Usled činjenice da se ne mogu svi mikroorganizmi odgajiti u laboratorijskim uslovima, kao i nemogućnosti identifikacije srodnih vrsta sa veoma sličnim morfološkim karakteristikama, sve veći značaj imaju molekularne metode intetifikacije koje se zasnivaju na umnožavanju određenih regiona genoma putem lančane reakcije polimeraze (Polymerase chain reaction, PCR) i sekvencioniranja dobijenih produkata.

Regioni ribozomalnih gena DNK gljiva pokazali su se kao dobri za amplifikaciju putem PCR-a. Konzervativni delovi su idealni za dizajniranje prajmera koji omogućavaju umnožavanje odvojenih heterogenih regiona (**Grades i sar., 1991**).

*Internal transcribed spacer* (ITS) region evoluirao brzo, varijabilan je i informativan na nivou vrste, čime omogućava razlikovanje nekad čak i vrlo srodnih vrsta, dok su geni koji kodiraju sintezu proteina manje pogodni usled akumuliranja manje mutacija, mada i oni imaju primenu u identifikaciji (**Lopes i sar., 2013**). ITS region obuhvata dva nekodirajuća *spacer* regiona odvojena sa genom za 5.8S rRNA na genomnoj DNK uglavnom ukupne dužine od 650-900 bp. (**Horton i Bruns, 2001**). Najčešće se umnožava pomoću ITS1/ITS4 para prajmera po protokolu **White i sar. (1990)**.

U slučajevima kada se sekvence ITS regiona pokažu kao nedovoljno diskriminatorne za pouzdanu i preciznu identifikaciju, potrebno je izvršiti i umnožavanje i sekvencioniranje dodatnih regiona. Pored ITS regiona, veliku ulogu u identifikaciji gljiva imaju i neki konsitutivni (housekeeping) proteinski geni, kao što je  $\beta$ -tubulin, koji akumuliraju manje mutacija (**Elinax i Voigt, 2003**).  $\beta$ -tubulin region je koristan u identifikaciji vrsta iz roda *Aspergillus* i *Penicillium* koji se inače često razvijaju u agroindustrijskom otpadu (**He i sar., 2008; Samson i sar., 2004; Lopes i sar., 2013**). Umnožavanje pomenutog regiona se uglavnom izvodi pomoću Bt2a/Bt2b para prajmera po protokolu **Glass i Donaldsona (1995)**.

Amplifikacija gena translacionog elongacionog faktora 1-alfa (TEF-1 $\alpha$ ) pomoću ef1/ef2 para prajmera (**O'Donnell i sar., 1998**) takođe nalazi primenu u molekularnoj identifikaciji gljiva, a pokazala se kao korisna u molekularnoj identifikaciji predstavnika roda *Trichoderma* koji su među najpoznatijim antagonistima fitopatogenih gljiva

(Holmes i sar., 2004; Martínez-Álvarez i sar., 2012). Produkti dužine do 1 kbp uključuju četvrti i peti intron i deo velikog egzona tefl gena koji kodira sintezu translacionog elongacionog faktoraproteina neophodnog za izduživanje hifa (Hatvani, 2008).

Vrste iz roda *Trichoderma* su u fokusu kad su u pitanju istraživanja u smeru potrage za uspešnim biokontrolnim agensima. Čak 90% biokontrolnih agenasa razvijenih do danas čine predstavnici ovog roda (Benítez i sar., 2004). Identifikacija predstavnika roda *Trichoderma* na osnovu morfoloških pokazatelja je otežana. Veliki je stepen morfološke sličnosti određenih vrsta i smatra se da nema dovoljno morfoloških i odgajivačkih pokazatelja za njihovo razlikovanje (Siddiquee i sar., 2007). Iz tog razloga predlagane su podele na „agregate vrsta“, a kasnije i na sekcije kako bi se morfološki slični izolati grupisali. Kubicek i sar. (2001) ističu da je čak 50% morfološki identifikovanih vrsta *Trichoderma* spp. zapravo pogrešno identifikovano.

Izolati rodova *Aspergillus* i *Penicillium* se takođe očekuju u ovom istraživanju imajući u vidu njihovu prethodno navedenu rasprostranjenost, a i antagonizam nekih sojeva prema fitopatogenim gljivama. Među predstavnicima pomenutih rodova postoje srodne vrste sa visokim stepenom morfološke sličnosti, stoga primena metoda molekularne identifikacije može značajno doprineti preciznosti. Vrste iz roda *Aspergillus*, sekcija *Nigri*, međusobno se teško mogu razlikovati na osnovu morfologije pa se uglavnom koristi sekvencioniranje gena za  $\beta$ -tubulin i kalmodulin (Varga i sar., 2011). Neke vrste *Penicillium* sp. ustanovljene na osnovu morfoloških karakteristika primenom molekularnih metoda i profila sekundarnih metabolita podeljene su u više vrsta veoma srodnih prema morfološkim parametrima (Boysen i sar., 1996).

Pored izučavanja antagonizma gljiva, važna je i njihova detaljna karakterizacija. Karakterizacija izolata je važna radi ispitivanja i objašnjenja mehanizama, što omogućava adekvatnu primenu, ali i sa bezbedonosnog aspekta. Neke od gljiva koje ispoljavaju antagonizam prema biljnim patogenima ili neko drugo korisno svojstvo, mogu ujedno biti oportunistički patogeni, alergeni i mikotoksikogeni mikroorganizmi. S obzirom na uticaj uslova gajenja mikroorganizama na ispoljavanje ovih svojstvava kao i mogućnosti genetskog inženjeringa, neželjene karakteristike izolata ne isključuju u potpunosti mogućnost njihove uspešne primene. Analize ekspresije pojedinih gena

patogena i antagonista važnih za njihov međusobnu interakciju mogu dati važne informacije i doprineti uspešnoj primeni.

### 3. CILJ RADA

Suzbijanje prouzrokovaca bolesti biljaka dodavanjem kompostiranog agroindustrijskog otpada u zemljište, kao i mikrobiološka priroda ovako postignutog efekta privlače pažnju brojnih istraživača i predstavljaju veoma aktuelan pravac u sklopu održive i organske proizvodnje biljaka. Filamentozne gljive zastupljene su u otpadu i tokom kompostiranja imaju važnu ulogu u transformacijama lignoceluloznog materijala, ali se pokazalo i da ove gljive različitim mehanizmima ispoljavaju antagonistički efekat prema fitopatogenim mikroorganizmima.

U okviru ove disertacije ispitivan je agroindustrijski otpad: komina grožđa, duvanski otpad i kompost od džibre - sporedni proizvod pri proizvodnji šljivovice. Ciljevi ove disertacije polaze od postavljene hipoteze da različite vrste agroindustrijskog otpada u okviru diverziteta gljiva poseduju potencijal za suzbijanje biljnih patogena.

Početni cilj istraživanja je stvaranje kolekcije filamentoznih gljiva iz različitog otpada i komposta, koja će nastati tokom procesa izolacije i dobijanja čistih kultura. Ova kolekcija predstavljajući osnovu za dalja istraživanja u okviru disertacije i koristiće se za selekciju sojeva i ispitivanje antagonizma.

Iz tako dobijene polazne kolekcije izvršiće se selekcija izolata koji pokazuju antagonizam prema značajnim biljnim patogenima: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum*. Nakon odabira antagonističkih izolata, izvršiće se njihova identifikacija na osnovu morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika. Radi postizanja veće preciznosti, identifikacija će biti dopunjena molekularnim metodama. Određivanje enzimske aktivnosti izolata ima za cilj da doprinese njihovoj celokupnoj karakterizaciji, ali i objašnjavanju mehanizma antagonizma odabranih izolata. Na ovaj način nastaje kolekcija identifikovanih i okarakterisanih filamentoznih gljiva poreklom iz agroindustrijskog otpada.

Razumevanju mehanizama interakcije doprineće ispitivanje uticaja ekstracelularnih metabolita izolata sadržanih u filtratu tečne kulture na rast fitopatogenih gljiva. Termostabilnost metabolita i uticaj izloženosti antagonista prisustvu fitopatogene gljive na indukciju njihovog stvaranja dopuniće navedena saznanja. Pored ispitivanja potencijala delovanja u *in vitro* ogledima, dalja istraživanja obuhvatiće i u *in vivo* testove u uslovima staklenika.

Na taj način rezultati dobijeni u okviru ove disertacije doprineće sagledavanju mogućnosti iskorišćavanja agroindustrijskog otpada, što će predstavljati značajan prilog pravilnom upravljanju biorazgradivim otpadom i stvaranje kolekcije identifikovanih i okarakterisanih filamentoznih gljiva.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Mikrobiološka karakterizacija agroindustrijskog otpada i komposta

Izolacija filamentoznih gljiva izvršena je iz različitog agroindustrijskog otpada: komina grožđa, sporedni proizvod u proizvodnji vina (Ogledno dobro Radmilovac, Poljoprivredni fakultet, Beograd), kompost od džibre, sporednog proizvoda iz proizvodnje šljivovice (individualno poljoprivredno gazdinstvo, Paštrić, Mionica), otpad iz duvanske industrije (kompanija Philip Moris).

Komina grožđa je uzeta u sezoni prerade grožđa, sa gomile koja kasnije podleže kompostiranju. Kompost od džibre je uzet sa gomile na koju se nekoliko godina unazad odlaže džibra i podleže spontanom kompostiranju. Gomila je nepokrivena i nezaštićena, primećeni su tragovi glodara. Gornji sloj je skinut i uzet je uzorak komposta. Uzorkovanje je izvršeno van sezone proizvodnje šljivovice. Uzorak duvanskog otpada je sitnjevina sa obrade, krupnija frakcija, na površini listova duvana u momentu izorkovanja bile su vidljive razvijene plesni.



Slika 1. Komina grožđa (levo) i kompost od džibre (desno)

Uzorci su transportovani u Laboratoriju Katedre za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu u sterilnim kesama za uzorkovanje, a zatim je izvršena njihova mikrobiološka karakterizacija i izolacija gljiva.

Mikrobiološka karakterizacija agroindustrijskog otpada izvršena je primenom standardnih metoda razređenja i selektivnih hranljivih podloga. Razređenje uzoraka je vršeno u sterilnoj vodovodskoj vodi. Određivanje ukupnog broja bakterija vršeno je na



deset puta razblaženom tripton soja agaru, (TSA; Torlak, Beograd). Broj gljiva određen je na Roze Bengal podlozi sa dodatkom streptomicina (RB), koji je pripremljen prema recepturi: glukoza 10 g, pepton 5 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g, rose bengal 0,033 g, agar 15 g, destilovana voda 1 l i 0,33 g streptomicina koji se dodaje nakon sterilizacije pred izlivanje podloge (**Peper i sar., 1995**), a broj aktinomiceta na skrobno-amonijačnom agaru (SKA) sastava: skrob 10 g,  $(NH_4)_2SO_4$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g, NaCl 1 g,  $KNO_3$  1 g,  $CaCO_3$  3 g, agar 20 g, 1 l vode.

Određivanje brojnosti ispitivanih mikroorganizama izvršeno je nakon inkubacije u termostatima (Binder, Nemačka) na odgovarajućim temperaturama. Ukupan broj bakterija je određen nakon inkubacije od pet dana na 30°C, gljiva nakon sedam dana inkubacije na 25°C, dok je inkubacija za aktinomicete trajala sedam dana na 30°C.

Broj mikroorganizama izražen je na 1 gram suvog otpada, a vlaga otpada je prethodno određena sušenjem na 105°C u trajanju 2 sata.

Prisustvo ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija i vrste *Escherichia coli* određeno je metodom Petri filma (3M Microbiology Products, USA), prema uputstvu proizvođača. Po 1 ml osnovnog razređenja ( $10^{-1}$ ) dodat je na dehidrisanu podlogu Petri filma preko koje je pažljivo vraćena folija tako da nema zahvaćenih mehurića vazduha. Petri film je inkubiran 48h na 37°C za određivanje broja ukupnih koliformnih i 44°C za određivanje fekalnih koliformnih bakterija. Posle inkubacije, prisutne koliformne bakterije su formirale crvene tačkaste kolonije, a *E. coli* nešto krupnije plave kolonije sa mehurićima gasa.

pH vrednost uzoraka (aktivna kiselost) je određena elektrometrijski.

#### **4.2. Izolacija filamentoznih gljiva iz agroindustrijskog otpada**

Nakon inkubacije na RB medijumu, za dalja istraživanja izabrane su morfološki različite kolonije.

Pikirane su morfološki različite kolonije sa RB medijuma i presejane na krompir-dekstrozni agar (PDA; Merck, Nemačka). Višestrukim presejavanjem dobijene su čiste kulture. Čistoća kulture je proveravana, prilikom svakog presejavanja posmatranjem mikroskopskih (mikroskop Leica DMLS, Nemačka) i makroskopskih karakteristika gljiva. Kulture gljiva čuvane su na kosom PDA na 4°C i održavane presejavanjem na svakih mesec dana uz istovremenu proveru čistoće kultura.

#### 4.2.1. Konfrontacijski test

Konfrontacijski test ili test dvojnih kultura iskorišćen je za preliminarni odabir izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada kako bi se došlo do izolata koji pokazuju antagonizam prema fitopatogenim vrstama i koji će biti uključeni u dalje istraživanje.

U istraživanju su korišćene fitopatogene vrste: *Botrytis cinerea* i *Pythium aphanidermatum* (kulture iz kolekcije Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd) i *Fusarium oxysporum* (izolat sa paprike, kolekcija Katedre za fitopatologiju, Poljoprivredni fakultet, Beograd).

Za potrebe konfrontacijskog testa, čiste kulture izolata iz agroindustrijskog otpada i fitopatogena osvežene su na PDA podlozi i odgajane sedam dana na 25°C u mraku. Za dalje testiranje je korišćen PDA, koji je izliven u Petri kutije prečnika 9 mm. Na površinu agara su zatim na udaljenosti od oko 3 cm naneseni diskovi micelije izolata iz agroindustrijskog otpada i fitopatogena, oba promera oko 5 mm. Ogled je ponovljen tri puta. Kao kontrola, disk micelije fitopatogena zasejan je na PDA podlogu na istoj poziciji, ali bez izolata iz agroindustrijskog otpada sa druge strane Petri kutije. Tokom narednih sedam dana posmatrana je interakcija gljiva iz agroindustrijskog otpada i fitopatogenih vrsta.

Pošto se očekuje da među ispitivanim izolatima različite taksonomske pripadnosti mogu biti zastupljeni različiti mehanizmi antagonizma, uzeto je više kriterijuma za selekciju. Pojave pri kontaktu dvaju micelija ispitivanih gljiva su praćene i ocenjivane po sledećim kategorijama:

1. Meren je procenat inhibicije rasta micelije fitopatogena u odnosu na miceliju na kontrolnoj Petri kutiji. Procenat inhibicije rasta, odnosno smanjenja prečnika kolonije je izračunat kao:

$$IP_D (\%) = \frac{Da - Dc}{Dc} \times 100$$

Dc – prečnik kolonija u kontrolnim Petri kutijama (mm)

Da – prečnik kolonija u Petri kutijama sa dvojnim kulturama (mm)

IP (%) – procenat inhibicije rasta fitopatogena;

2. Mereno je rastojanje od centra do ivice kolonije fitopatogena u pravcu ka ispitivanom izolatu i poređeno sa rastojanjem od centra do ivice kolonije ka suprotnom kraju Petri kutije. Ukoliko je prisustvo izolata iz agroindustrijskog otpada uticalo da rast micelije fitopatogena nije radijalan, procenat smanjenja poluprečnika ka izolatu je izračunat kao:

$$IP_d (\%) = \frac{da - dc}{dc} \times 100$$

$d_c$  – poluprečnik kolonije ka bližoj ivici Petri kutije (mm)

$d_a$  – poluprečnik kolonije ka koloniji izolata iz agroindustrijskog otpada (mm)

$IP_d (\%)$  – procenat smanjenja poluprečnika kolonije fitopatogena;

3. Ocenjivano je prisustvo i veličina zone inhibicije rasta fitopatogena;
4. Zabeležene su pojave zona zadebljale micelije fitopatogene gljive, kao i promene u pigmentaciji fitopatogenih gljiva;
5. Zabeležena je pojava prerastanja kolonije fitopatogena od strane micelije izolata iz agroindustrijskog otpada.

Konfortacijski test je urađen prema modifikovanim metodama **Mejía i sar. (2008)**, **Badalyan i sar. (2004)**, **Mishra (2010)** i **Sharma (2011)**. Navedene promene su zabeležene nakon pet dana inkubacije, osim prerastanja micelije koje je provereno i sedmog dana.

Procena antagonizma koji je određen konfrontacijskim testom izvršena je prema **Sookchaoy i sar. (2009)** koji je antagonističku aktivnost na osnovu konfrontacijskog testa klasifikovao kao:

- veoma visoka antagonistička aktivnost ( $IP_D > 75\%$ ),
- visoka antagonistička aktivnost ( $IP_D = 61-75$ ),
- umerena antagonistička aktivnost ( $IP_D = 51-60$ ),
- slaba antagonistička aktivnost ( $IP_D < 51$ ).

Dalja istraživanja u disertaciji su obuhvatila šest izolata gljiva koji su u konfrontacijskom testu pokazali umerenu, visoku ili veoma visoku antagonističku

aktioivnost prema bar jednoj od tri ispitivane fitopatogene vrste: *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum* ili koji su doveli do prerastanja micelije bar jednog od tri fitopatogena.

### 4.3. Identifikacija i karakterizacija gljiva iz agroindustrijskog otpada

U okviru identifikacije i karakterizacije selektovanih izolata utvrđena su morfološka, odgajivačka i ekološka svojstva. Nakon identifikacije na osnovu pomenutih svojstava primenjene su molekularne metode identifikacije, a izvršena je i kvalitativna enzimska karakterizacija odabranih izolata.

#### 4.3.1. Morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike

U cilju karakterizacije šest selektovanih izolata, ali i njihove preliminarne identifikacije ispitane su njihove morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike.

##### 4.3.1.1. Morfološke karakteristike

Morfološka identifikacija izolata vršena je prema priručniku **Samson i sar. (2000)**. Izolati su okarakterisani preko svojih makromorfoloških i mikromorfoloških svojstava. U trajanju od sedam dana inkubacije na 25°C u mraku, meren je prečnik i praćen izgled kolonija izolata na hranljivim podlogama: krompir-dekstrozni agar (PDA), sladni agar (SA), Čapek-ov agar (ČA) i Sabouraud agar (SB). PDA (Merck, Germany) i SA (Torlak, Beograd, Srbija) su korišćene kao gotove dehidrisane podloge i pripremane prema uputstvu proizvođača. Čapek-ov agar je pripreman prema recepturi: 30 g saharoze, 2 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, 15 g agara i 1 l destilovane vode, a Sabouraud-ov agar: 40 g saharoze, 10 g peptona, 20 g agara i 1 l destilovane vode. Sve podloge su sterilisane autoklaviranjem na 121°C u trajanju od 15 min. Od makromorfoloških svojstava ispitivani su: veličina kolonije, boja, konzistencija, izgled ivica, stvaranje eksudata i boja sa naličja Petri kutije.

Nativni preparati pripremani su od kultura starih pet dana tako što je na predmetno staklo naneta kap sterilne vode u koju je sterilnom iglom naneta micelija, a potom je postavljeno pokrovno staklo. Preparat je posmatran uz pomoć optičkog mikroskopa Leica DMLS, Nemačka, pod direktnim uvećanjima od 40x do 1000x. Neposredno pred posmatranje pod objektivom uvećanja 100x na pokrovno staklo je

nanošena i kap imerzionog ulja, a mikroskopiranje je vršeno objektivom uljane imerzije. Mikroskopiranjem je posmatrana septiranost hifa, izgled sporonosnih hifa, izgled i veličina spora i njihov raspored na sporonosnim hifama. Za određivanje veličine spora izvršeno je 100 slučajno odabranih spora po za svaki ispitivani izolat.

#### 4.3.1.2. Ekološke karakteristike

Od ekoloških karakteristika ispitan je rast izolata pri različitim temperaturama i pH vrednostima hranljive podloge.

##### Rast izolata pri različitim temperaturama

Maksimalne temperature rasta izolata gljiva su ispitivane zasejavanjem na PDA podlogu i inkubacijom u termostatima u trajanju od sedam dana u mraku pri odgovarajućim temperaturama. Rast je praćen od temperature 25°C, zatim na temperaturama višim za po 5°C sve do temperature pri kojoj bi rast gljiva bio zaustavljen. Razviće micelije na PDA podlozi nakon inkubacije na određenoj temperaturi je smatrano pozitivnim rezultatom. Pored temperature od 25°C i viših, ispitan je i rast na temperaturama od 4°C i 10°C.

##### Rast izolata pri različitim pH vrednostima

Za ispitivanje rasta izolata pri različitim pH vrednostima korišćen je krompir dekstrozni bujon (PDB; Hi Media, Indija) čija pH vrednost je podešena pre autoklaviranja dodavanjem 1M rastvora HCl. Ispitan je rast pri sledećim pH vrednostima: 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 5,0 i 7,0. Formiranje micelije na podlogama sa podešenom pH vrednošću nakon sedam dana inkubacije pri 25°C u mraku, smatrano je pozitivnim rezultatom.

#### **4.3.2. Molekularna identifikacija izolata**

Molekularna identifikacija izolata podrazumevala je sekvencioniranje produkata dobijenih nakon amplifikacije sa univerzalnim i specifičnim prajmerima i poređenje dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank Bazi podataka (National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA). Najpre je kod svih izolata izvršena amplifikacija ITS (Internal transcribed spacer) regiona jedarne DNK

(deo 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 i deo 28S rRNA) pomoću univerzalnih ITS1 i ITS4 prajmera. Kod određenog broja izolata primenjena je amplifikacija dodatnih regiona upotrebom: efl/ef2 para prajmera za umnožavanje elongacionog faktora TEF-1 $\alpha$  ili Bt2a/Bt2b para prajmera za umnožavanje  $\beta$ -tubulin regiona.

#### 4.3.2.1. Priprema kulutra za molekularnu identifikaciju

DNK je ekstrahovana iz micelije dobijene iz tečnih kultura izolata gajenih na PDB podlozi i zamrznute na -80°C.

Kolonije gljiva su odgajane sedam dana u mraku na PDA. U Erlenmajer kolbe razliveno je 200 ml PDB. Podloga je sterilisana i zasejana sa pet diskova promera 5 mm uzetih sa ivice kolonija koje su se razvile na PDA. Kolbe sa inokulisanom PDB podlogom su inkubirane sedam dana na 25°C u mraku u orbitalnom termostarirajućem šekjeru (Environmental Shaker-Incubator ES-20, BIOSAN, Letonija) pri 160 o/min. Tečna kultura je profiltrirana kroz filter papir. Micelija na filter papiru je isprana nekoliko puta sterilnom destilovanom vodom, a zatim osušena pod vakuumom. Osušena micelija je podeljena u porcije veličine od po 100 mg, koje su pakovane u aluminijumsku foliju, obeležene, zamrznute na -80°C i čuvane do upotrebe.

#### 4.3.2.2. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija ukupne količine dezoksiribonukleinskih kiselina (DNK) je izvršena pomoću komercijalnog DNeasy Plant Mini Kit-a (Qiagen, Hilden, Nemačka), prema uputstvu proizvođača.

Po 100 mg zamrznute micelije svih šest izolata prebačeno je u mikrotubice od 1,5 ml i homogenizovano pomoću tučka uz dodavanje tečnog azota. U svaku tubicu je pipetirano po 400  $\mu$ l AP1 pufera i po 4  $\mu$ l enzima RNase A. Posle kratkog mešanja sadržaja na Vortex-u, izvršena je inkubacija na 65°C u trajanju od 20 min na vodenom kupatilu uz povremeno mešanje. U toku inkubacije dolazi do razgradnje ćelijskog zida i ribonukleinskih kiselina (RNK). Posle inkubacije u svaku tubicu je dodato po 130  $\mu$ l pufera AP2 koji omogućava taloženje proteina i polisaharida iz smeše. Tubice su inkubirane 5 min na ledu i 5 min centrifugirane na 14000 o/min. Posle centrifugiranja se pomoću pipete izdvaja lizat bez taloga iz tubica i prenosi u QIAshredder Mini spin kolone sa filterom koje su postavljene u kolekcione tubice od po 2 ml. Tubice su

centrifugirane 2 min na 14000 o/min. DNK se posle centrifugiranja nalazi u rastvoru koji je propušten kroz filter i prebačen u tubice od 2 ml. Uz neprestano mešanje, u svaku tubicu je dodato po 675  $\mu$ l pufera AP3/E. 650  $\mu$ l ove suspenzije je zatim prebačeno u DNeasy Mini spin kolone sa filterom. Posle centrifugiranja od 1 min na 10000 o/min, tečna faza koja je prošla kroz filter je odstranjena, a ukupna DNK se zadržava na filteru. U tubicu je dodata i preostala količina suspenzije i ponovljen je postupak centrifugiranja sa odbacivanjem tečne faze. Pored DNK, za filter su vezane i nečistoće koje se otklanjaju u sledećem koraku. U tubice je u dva navrata dodato po 500  $\mu$ l AW pufera, a potom je izvršeno centrifugiranje kolona 1 min na 10000 o/min, a zatim 2 min na 14000 o/min radi uklanjanja tečnosti. DNeasy Mini spin kolone su prebačene u mikrotubicu sa poklopcem i direktno na filter je pipetirano 100  $\mu$ l AE pufera za rastvaranje DNK. Tokom inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min DNK se oslobađa sa filtera i rastvara. Tubice su posle toga centrifugirane 1 min na 10000 o/min. Tečna faza koja je prošla kroz filter prilikom centrifugiranja sadrži ukupnu DNK i čuvana je na  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalje upotrebe.

#### 4.3.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je primenjena u cilju identifikacije ispitivanih izolata gljiva. Najpre je u slučaju svih šest izolata izvršeno umnožavanje odgovarajućeg segmenta DNK iz ITS regiona, a kod određenih izolata umnoženi su i konstitutivni proteinski geni koji kodiraju translacioni elongacioni faktor  $1\alpha$  (TEF- $1\alpha$ ) i  $\beta$ -tubulin. Za sve reakcije primenjeni su ranije opisani prajmeri (Tabela 1).

PCR reakcije obavljene su u radnoj zapremini od 25  $\mu$ l koju čine 12,5  $\mu$ l 2X PCR Master miksa (K071, Fermentas, Litvanija), 9  $\mu$ l Rnase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), po 1,25  $\mu$ l svakog prajmera (100 pmol/ $\mu$ l, Metabion International, Nemačka) i 1  $\mu$ l ekstrahovane ukupne DNK odgovarajućeg uzorka. U svakoj PCR reakciji kao negativna kontrola korišćena je smeša sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK u koju je umesto DNK uzorka dodavana molekularna RNase-free voda. PCR reakcije izvedene su u termosajkleru (Thermocycler T-1, Biometra, UK) pri različitim protokolima u zavisnosti od korišćenih prajmera (Tabela 1).

### PCR sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4

ITS1/ITS4 su univerzalni par prajmera kojima je omogućena amplifikacija ITS (Internal transcribed spacer) regiona jedarne DNK eukariota.

PCR amplifikacija obavljena je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina u trajanju od 60 s pri 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 35 s pri 94°C, hibridizacije (annealing) 35 s pri 57°C, elongacije prajmera 1 min pri 72°C praćeno finalnom elongacijom od 10 min pri 72°C (**Takamatsu i Kano, 2001; Cunnington i sar., 2003**).

### PCR sa parom prajmera ef1/ef2

Prajmeri ef1/ef2 se koriste za amplifikaciju gena za TEF-1 $\alpha$ , koji je uključen u mehanizam translacije proteina u ćelijama gljiva. Sekvence ovog gena kod roda *Trichiderma* nalaze primenu u identifikaciji i filogenetskoj karakterizaciji vrsta (**Hatvani i sar., 2007**).

PCR umnožavanje izvedeno je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 2 min pri 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 1 min pri 94°C, hibridizacije 1 min pri 53°C, elongacije 2 min pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min (**O'Donnell i sar., 1998**).

### PCR sa parom prajmera Bt2a/Bt2b

Prajmeri Bt2a/Bt2b omogućavaju amplifikaciju gena za  $\beta$ -tubulin koji je uključen u mehanizam translacije proteina u ćelijama gljiva prilikom rasta i izduživanja ćelija. Gen pokazuje visok polimorfizam sekvenci između blisko srodnih vrsta gljiva, a čestu primenu nalazi u razlikovanju srodnih vrsta rodova *Penicillium* i *Aspergillus* (**He i sar., 2008; Samson i sar., 2004**). Primenjeni su sledeći uslovi reakcije: inicijalna denaturacija DNK 1 min pri 94°C, 33 ciklusa koji se sastoje od denaturacije od 1 min na 94°C, hibridizacije 1 min na 60°C i elongacije 1 min na 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min (**He i sar., 2008**).



Tabela 1. Prajmeri korišćeni u molekularnoj identifikaciji izolata

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca 5'-3'	Očekivana veličina fragmenta	Literaturni izvor
<b>ITS</b>	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	~600 bp	<b>Takamatsu i Kano (2001)</b>
<b>TEF-1<math>\alpha</math></b>	ef1 ef2	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC GGAAGTACCAGTGATCATGTT	~ 900 bp	<b>Geiser i sar. (2004)</b>
<b><math>\beta</math>-tubulin</b>	Bt2a Bt2b	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	~ 600 bp	<b>Glass i Donaldson (1995)</b>

## 4.3.2.4. Vizuelizacija PCR produkata

Vizuelizacija umnoženih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem u 1% agaroznom gelu. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem 1,20 g agaroze u 120 ml 1 x TBE pufera (90 mM Tris; 90 mM borna kiselina i 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA), zagrevanjem do ključanja i izlivanjem gela prohlađenog na oko 60°C u kalup sa češljevima. Gel je ostavljen 30 min da se ohladi i stegne, posle čega je uronjen u kadu za elektroforezu sa 1x TBE puferom. Po 5 ml PCR produkata je na parafilmu pomoću pipete mešano sa 1  $\mu$ l boje 6x Loading dye (Fermentas Life Sciences GmbH, Litvanija) i unošeno u bunariće po određenom rasporedu. Korišćen je i marker MassRuler™ DNA ladder, Mix (Fermentas Life Sciences GmbH, Litvanija) kako bi se odredila veličina produkata poređenjem sa trakama koje potiču od produkata poznate veličine. Elektroforeza je izvedena pri konstantnoj struji od 120 V u trajanju od oko 40 min u aparatu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine 100, Serva electrophoresis GmbH, UK). Gel je posle elektroforeze bojen potapanjem u rastvor etidijum bromida u koncentraciji od 0,5  $\mu$ g/ml u trajanju od 20 min. Umnoženi fragmenti su posmatrani u komori pomoću UV svetla na transiluminatoru (Biometra, UK). Prisustvo jednog DNK fragmenata očekivane dužine označeno je kao pozitivna reakcija.

#### 4.3.2.5. Prečišćavanje PCR produkata i sekvencioniranje

PCR produkti su prečišćeni pomoću komercijalnog QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Nemačka), prateći upustvo proizvođača. Jedna zapremina reakcione smeše i PCR produkta posle amplifikacije pomešana je sa pet zapremina PBI pufera i prebačena u QIAquick reakcionu kolonu koja je smeštena u kolekcionu tubicu zapremine 1 ml. Kako bi se DNK vezala za filter izvršeno je centrifugiranje 1 min na 13000 o/min, nakon čega je odbačena tečna faza. QIAquick kolona je vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugiranje je ponovljeno na isti način kako bi se ostaci tečnosti uklonili sa filtra. QIAquick kolona je smeštena u novu tubicu od 1,5 ml. Kako bi se izvršilo rastvaranje DNK sa filtra dodato je 50 µl EB pufera i centrifugirano 1 min na 13000 o/min. Tako pripremljena DNK je do dalje analize čuvana na 4°C.

Umnoženi fragmenti izolata gljiva su posle prečišćavanja poslani na uslužno sekvencioniranje u oba smera, korišćenjem istih prajmera kao pri amplifikaciji, na ABI 3730XL Automatic Sequencer u MacroGen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., određene su im konsenzus nukleotidne sekvence i deponovane su u GenBank bazu podataka u okviru National Center for Biotechnology Information (NCBI), gde im je dodeljen pristupni broj (GenBank Accession Number).

#### 4.3.2.6. Molekularna identifikacija

Molekularna identifikacija izolata gljiva izvršena je višestrukim uparivanjem dobijenih sekvenci sa sekvencama drugih gljiva dostupnih u GenBank bazi podataka. Nakon obrade sekvenci, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizom i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pomoću CLUSTAL W programa (Thompson i sar., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci.

#### 4.3.3. Enzimska karakterizacija izolata

Enzimska karakterizacija izolata izvršena je API ZYM testom (bioMérieux, France), prema uputstvu proizvođača. API ZYM je brza tehnika koja omogućava semi-kvantitativno određivanje enzimske aktivnosti kroz 19 reakcija u veoma malim

zapreminama uzorka. Sistem sadrži traku sa 20 bunarića u čijoj osnovi se nalazi enzimski supstrat i njegov pufer. Ova osnova omogućava kontakt enzima i supstrata. Uzorak koji se u bunariće nanosi u tečnom stanju ujedno vrši rehidraciju supstrata. Nakon inkubacionog perioda, proizvodi reakcija se detektuju preko obojenja koje nastaje nakon dodatka reagensa.

#### Priprema izolata za API ZYM test

Izolati su inkubirani na Petri kutijama sa PDA i nakon pet dana sa ivice kolonija je isečeno pet diskova promera oko 5 mm i preneseno u kolbe sa po 200 ml sterilnog PDB. Dalja inkubacija je vršena u orbitalnom šejkeru (BIOSAN, Litvanija) na 160 o/min, na 25°C u trajanju od sedam dana u mraku. Tečna kultura je profiltrirana kroz sterilnu gazu, a dobijeni filtrat je korišćen za API ZYM test.

#### API ZYM test

Enzimska karakterizacija svih šest odabranih izolata primenom API ZYM testa izvršena je tako što je prvo naneto po 65 µl filtrata u bunariće. U udubljenja zaštitne plastične kutije je uneto oko 5 ml destilovane vode radi održavanja vlage, a zatim su ubačene trake sa bunarićima i inkubirane 4 sata na 37°C. Nakon inkubacije u svaku reakcionu tubicu dodata je po jedna kap reagenasa ZYM A i ZYM B (bioMérieux, Francuska), a posle pet minuta je vizuelno ocenjena promena boje i poređena sa API ZYM Colour Chart-om. Prvi bunarić predstavlja kontrolu sa čijom bojom se poredi boja reakcionih bunarića.

#### **4.4. Uticaj metabolita izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada na rast fitopatogena**

U radu je ispitan uticaj sterilnih sirovih filtrata dobijenih iz tečne kulture izolata na rast fitopatogenih gljiva, *in vitro*. Filtrati su dobijeni na dva načina, pri rastu izolata u čistoj kulturi i pri zajedničkom rastu u dvojnoj kulturi sa svakom pojedinačnom fitopatogenom vrstom. Sterilizacija filtrata je izvršena na dva načina, toplotom (autoklaviranjem) i hladnom sterilizacijom (membranskom filtracijom).

Kao kontrola u ovim istraživanjima poslužile su vrednosti rasta gljiva na PDA bez dodatka ekstrakta i poređen je sa rezultatima rasta gljiva u prisustvu sterilnih filtrata.

#### **4.4.1. Priprema filtrata tečnih kultura gljiva**

U ovim istraživanjima filtrati su pripremljeni na dva načina. Jedna vrsta filtrata dobijena je od čistih kultura ispitivanog izolata. Druga vrsta filtrata dobijena je pri rastu dvojne kulture, izolata gljive iz agroindustrijskog otpada i fitopatogene gljive. Na ovaj način provereno je da li fitopatogena vrsta indukuje formiranje metabolita drugačijeg spektra delovanja. Za oba načina pripreme filtrata izolati gljiva su pre upotrebe osveženi presejavanjem na PDA inkubacijom u trajanju od sedam dana na 25°C u mraku.

##### Priprema filtrata iz čistih kultura

Pripremljene su Erlenmajer kolbe sa po 200 ml sterilne PDB podloge. Tečna podloga je inokulisana sa po pet diskova micelije promera oko 5 mm, isecanih sa ivice kolonija razvijenih na PDA. Zasejane podloge sa gljivama inkubirane su u trajanju od sedam dana na 25°C u mraku, na orbitalnom šejkeru pri 160 o/min. Nakon perioda inkubacije tečne kulture su profiltrirane kroz višeslojnu gazu. Nakon izdvajanja micelije izvršeno je dodatno filtriranje kroz filter papir i centrifugiranje pri 8000 o/min u trajanju od 15 min (Centrifuge U-320, BOECO, Nemačka). Supernatant dobijen na ovaj način predstavlja sirovi filtrat. (Ma i sar., 2008)

##### Priprema filtrata iz dvojne kulture

Filtrati dvojnih kultura su pripremani na način kao što je opisana priprema filtrata tečnih kultura, sa tom razlikom što je PDB bujon inokulisan sa po pet diskova micelije izolata i pet diskova micelije određene fitopatogene vrste.

#### **4. 4. 2. Sterilizacija filtrata tečne kulture gljiva**

Dobijeni filtrati podvrgnuti su sterilizaciji na dva načina: sterilizacijom toplotom pod u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 min i hladnom sterilizacijom filtriranjem pomoću sterilnih mikrobioloških filtara promera 0,45 µm (Milipore, Irska).

Dobijeni filtrati su grupisani i obeleženi na sledeći način:

1. filtrati dobijeni iz čiste tečne kulture izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada, sterilisani autoklaviranjem (oznake K7/1a, K11/1a, K16/2a, 10/5a, 19/5a, A/5a);
2. filtrati dobijeni iz čiste tečne kulture izolata iz agroindustrijskog otpada, sterilisani filtracijom (oznake K7/1f, K11/1f, K16/2f, 10/5f, 19/5f, A/5f);
3. filtrati dobijeni iz dvojne tečne kulture – izolat iz agroindustrijskog otpada + fitopatogen, sterilisani autoklaviranjem (oznake za dvojnju tečnu kulturu sa *B. cinerea*: K7/1+Ba, K11/1+Ba, K16/2+Ba, 10/5+Ba, 19/5+Ba, A/5+Ba; oznake za dvojnju tečnu kulturu sa *F. oxysporum*: K7/1+Fa, K11/1+Fa, K16/2+Fa, 10/5+Fa, 19/5+Fa, A/5+Fa; oznake za dvojnju tečnu kulturu sa *P. aphanidermatum*: K7/1+Pa, K11/1+Pa, K16/2+Pa, 10/5+Pa, 19/5+Pa, A/5+Pa);
4. filtrati dobijeni iz dvojne tečne kulture – izolat iz agroindustrijskog otpada + fitopatogen, sterilisani filtracijom (oznake za dvojnju tečnu kulturu sa *B. cinerea*: K7/1+Bf, K11/1+Bf, K16/2+Bf, 10/5+Bf, 19/5+Bf, A/5+Bf; oznake za dvojnju tečnu kulturu sa *F. oxysporum*: K7/1+Ff, K11/1+Ff, K16/2+Ff, 10/5+Ff, 19/5+Ff, A/5+Ff; oznake za dvojnju tečnu kulturu sa *P. apohanidermatum*: K7/1+Pf, K11/1+Pf, K16/2+Pf, 10/5+Pf, 19/5+Pf, A/5+Pf).

#### 4. 4. 3. Uticaj filtrata na rast fitopatogenih vrsta

U radu je ispitan uticaj filtrata dobijenih iz čistih kultura šest izolata filamentoznih gljiva kao i uticaj filtrata dobijenih iz dvojnih kultura izolata i određenih fitopatogenih vrsta na rast: *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum*.

Filtrati koji su sterilisani membranskom filtracijom dodati su u PDA podlogu, koja je prethodno prohlađena na 45°C u tri koncentracije (1, 10 i 50%). Odgovarajuće zapremine PDA podloge prethodno su pripremljene standardnom procedurom, a u podlogu namenjenu dodatku filtrata u koncentraciji od 50% dodato je još 10 g agara/l kako bi se omogućilo da se podloga stegne i nakon dodatka filtrata. Uticaj filtrata sterilisanih autoklaviranjem ispitan je pri koncentracijama od 10 i 50%.

Čist agarizovan autoklaviran filtrat (100%) pripreman je tako što je u odgovarajuću količinu filtrata tečnih kultura dodato 20 g agara/l.

Svi ogledi su izvedeni u tri ponavljanja. Podloge su izlivanе u sterilne Petri kutije prečnika 90 mm, a kontrolne Petri kutije su sadržale PDA podlogu bez dodatog ekstrakta. Sa ivice kolonija fitopatogenih gljiva prethodno gajenih sedam dana u mraku

na 25°C na PDA podlozi, isecan je disk prečnika oko 5 mm i prenošen na centar Petri kutija sa podlogama koje sadrže različite koncentracije filtrata gljiva iz agroindustrijskog otpada. Inkubacija je izvršena u termostatu na 25°C. Na svaka 24h meren je prečnik kolonija do trenutka kad kolonije u kontroli ispune Petri kutiju. U daljem proračunu su korišćeni podaci izmereni onog dana kad je micelija na kontrolnim podlogama dostigla 50-80% prečnika Petri kutije, odnosno petog dana rasta kada je u pitanju *B. cinerea*, sedmog dana rasta za *F. oxysporum* i drugog dana za *P. aphanidermatum*. Određena je srednja vrednost prečnika za tretman iz tri ponavljanja, a zatim je izračunat procenat inhibicije rasta fitopatogena prema formuli:

$$IP (\%) = \frac{Df - Dc}{Dc} \times 100$$

Dc – prečnik kolonija na PDA bez filtrata (mm)

Df – prečnik kolonija na PDA sa filtratom (mm)

IP (%) – procenat inhibicije rasta fitopatogene gljive

Pored promena u prečniku kolonija, evidentirane su i druge morfološke promene koje su primećene na kolonijama fitopatogenih vrsta u prisustvu pojedinih filtrata, kao što su promene u pigmentaciji i gustini hifa. Ukoliko je evidentirana neka od pomenutih morfoloških promena, ispitivano je da li je promena reverzibilna. Isečak sa ivice izmenjene kolonije je presejavan na PDA podlogu bez filtrata. Razviće kolonije sa morfološkim karakteristikama kao i u slučaju kolonija na kontrolnoj Petri kutiji je uzeto za pokazatelj da je promena reverzibilna.

#### **4. 4. 4. Uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) stare 48h na rast *Botrytis cinerea***

Na osnovu rezultata prethodnih eksperimenata, a u cilju ispitivanja uticaja starosti tečne kulture na rast fitopatogene gljive, izabran je sterilan filtrat dvodnevne kulture gljive *Trichoderma longibrachiatum*, izolat 10/5 i ispitan je njegov uticaj na rast *B. cinerea*. Priprema filtrata je izvršena na isti način kao i u prethodnim oglecima, osim što je PDB podloga inkubirana u trajanju 48h, umesto sedam dana.

#### 4.5. *In vivo* uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na fitopatogene

Za *in vivo* ogled odabran je izolat 10/5, identifikovan kao *Trichoderma longibrachiatum*, odnosno sterilan filtrat tečne kulture. Biljke su veštački inokulisane ispitivanim fitopatogenim gljivama, a zatim je testiran uticaj sterilnog filtrata tečne kulture izolata 10/5 na pojavu simptoma i upoređivan sa pojavom simptoma na biljkama tretiranim standardnim fungicidom i kontrolom (inokulisane netretirane biljke). Postupak ispitivanja efikasnosti ekstrakta prema fitopatogenim gljivama: *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum* izveden je u uslovima staklenika.

Krastavac je korišćen kao test biljka u *in vivo*, s obzirom da je preporučena biljka za *in vivo* testove sa uzročnikom *P. aphanidermatum* prema protokolu **EPPO (2004)** i imajući u vidu činjenicu da *B. cinerea* sve češće predstavlja problem u stakleničkoj proizvodnji različitih biljnih vrsta, pa i krastavca (**Dik i Wubben, 2007**). U slučaju ispitivanja uticaja na *F. oxysporum* koji je specijalizovan prema domaćinu test biljka je paprika, jer je izolat ove gljive sa kojim su rađena ispitivanja izolovan sa zaražene paprike.

##### 4.5.1. Priprema inokuluma fitopatogena

Inokulumi fitopatogenih gljiva su pripremljeni od micelije prethodno odgajane na PDA podlozi na 25°C u mraku u trajanju od pet dana. Seme pšenice je korišćeno za dalju pripremu inokuluma. Oko 20 g semena pšenice je natapano u destilovanoj vodi, nakon 24h je autoklavirano na 120°C u trajanju od 1,5h. Nakon hlađenja u posude sa sterilnom pšenicom dodati su fragmenti micelije fitopatogenih gljiva. Posude sa pšenicom su stavljene na 25°C na inkubaciju u trajanju od sedam dana za *B. cinerea* i *P. aphanidermatum* i deset dana za *F. oxysporum*. Povremeno je vršeno protresanje zrna kako se ne bi stvorila kompaktna masa, a po potrebi je dodavana i sterilna destilovana voda kako ne bi došlo do isušivanja zrna (**Chellemi i sar., 2000**). Pre inokulacije je provereno je da li je micelija podjednako obrasla zrna, a mikroskopski je provereno da li je došlo do sporulacije fitopatogena na zrnima.

#### 4.5.2. Priprema filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5)

Za pripremu filtrata korišćena je micelija odgajana na PDA podlozi u trajanju od pet dana, na 25° C u mraku. Diskovi micelije su korišćeni za inokulaciju prethodno pripremljene tečne podloge – PDB. Nakon inkubacije tečne podloge u trajanju od sedam dana na orbitalnom šejkeru, pri 160 o/min, na 25° C u mraku, tečna kultura je profiltrirana kroz gazu kako bi se odvojila micelija. Filtrat je autoklaviran na 121° C u trajanju od 15 min.

#### 4.5.3. *In vivo* uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na *Botrytis cinerea*

Za ispitivanje biološke efikasnosti ekstrakta izolata 10/5 prema *B. cinerea* korišćene su biljke krastavca (*Cucumis sativus*, Sunčani potok). Po 20 semenki je zasejano u saksije prečnika 10 cm x 15 cm napunjene sa supstratom Florabalt Semi 1 (Floragard®, Nemačka). Nakon nicanja biljaka, vršeno je proređivanje tako da broj biljaka krastavca po saksiji bude deset, a zatim je izvršena inokulacija biljaka u fenofazi kotiledona tako što je oko korena svake biljke dodato po četiri zrna inokuluma u prvom i po tri zrna inokuluma u drugom ogledu. Ispitivanje je ponavljano u pet saksija po tretmanima koji su obeleženi:

10/5: inokulisane biljke tretirane filtratom izolata 10/5,

F: inokulisane biljke tretirane fungicidom fenheksamid (Teldor 500-SC, Bayer CropScience, Nemačka),

PK: pozitivna kontrola, inokulisane biljke, netretirane,

NK: negativna kontrola, neinokulisane, netretirane biljke.

Neposredno nakon inokulacije je vršeno tretiranje koje je podrazumevalo zalivanje saksija sa po 100 ml ekstrakta *T. longibrachiatum* (10/5), odnosno zalivanje sa po 100 ml 0,1% razređenja fungicida (F) ili sa po 100 ml sterilne vode (PK, NK). Pri inokulaciji je kod negativne kontrole uz koren biljke dodat odgovarajući broj sterilnih zrna pšenice. Nakon inokulacije je svakodnevno praćena pojava poleganja biljaka, sve dok smrtnost u inokulisanoj netretiranoj kontroli nije dostigla oko 70%.



#### **4.5.4. *In vivo* uticaj filtrata *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na *Fusarium oxysporum***

Za ispitivanje biološke efikasnosti ekstrakta izolata 10/5 prema *F. oxysporum* korišćene su biljke paprike (*Capsicum annuum*, kalifornijsko čudo). Korišćene su saksije promera 10 cm x 15 cm napunjene sa supstratom Florabalt Semi 2 nemačkog proizvođača Floragard®. Prilikom sadnje rasada paprike u fenofazi sa 4-8 listova, oko korena svake biljke je dodavano po 10 zrna inokulima, a kod negativne kontrole dodata su sterilna zrna pšenice. Ispitivani tretmani su primenjivani na isti način kao što je opisano u prethodnom odeljku (4.5.3) sa tom razlikom da je korišćen fungicid kaptan (Agrokaptan; Agromarket, Srbija) u razređenju 0,2%. Nakon inokulacije i tretiranja svakodnevno su u uslovima staklenika praćene promene na biljkama. Nakon dve nedelje utvrđen je i procenat preživelih biljaka i izvršeno je merenje vlažne mase biljaka. Ogled je izveden u devet ponavljanja.

#### **4. 5. 5. *In vivo* uticaj filtrata *Trichoderma longibrachiatum* (izolat 10/5) na *Pythium aphanidermatum***

Za ispitivanje biološke efikasnosti filtrata tečne kulture izolata 10/5 prema *P. aphanidermatum* korišćene su biljke krastavca. Ogled je izveden na način kako je opisano u odeljku 4.5.3. sa tom razlikom što je kao fungicid korišćen propamokarb-hidrohlorid (Previcur 607 SL, Bayer CropScience, Nemačka) u razređenju 0,25%. Nakon inokulacije je svakodnevno praćena pojava poleganja biljaka, sve dok smrtnost u inokulisanoj netretiranoj kontroli nije dostigla oko 70%.

### **4. 6. Statistička obrada rezultata**

Za obradu podataka dobijenih u ogledu ispitivanja uticaja filtrata tečne kulture antagonista na rast fitopatogena korišćene su standardne statističke metode. Za utvrđivanje značajnosti efekta pojedinih tretmana korišćen je Dunnett-ov test, zatim je izvršena trofaktorijalna analiza varijanse koja je uključila koncentracije 10% i 50% i u slučaju jednog izolata dvofaktorijalna analiza varijanse sa tretmanima koncentracije 10%. Naknadno poređenje tretmana je izvršeno pomoću najmanje značajne razlike (LSD). Korišćen je nivo značajnosti 0,05, a za obradu podataka je korišćen softver IBM SPSS 20.

*In vivo* ogledi su postavljeni po potpunom slučajnom blok sistemu sa pet ponavljanja. Efikasnost je izračunata po Abbott-u, a za obradu rezultata korišćene su standardne statističke metode, analiza varijanse i Duncan-ov test.

NAPOMENA: Tokom izrade disertacije su prilikom prijave sekvenci tri izolata preimenovana. U pitanju su izolati K7/1, K11/1 i K16/2, koji na fotografijama nose oznake G1, G2 i G3.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Mikrobiološke karakteristike agroindustrijskog otpada i komposta

Na osnovu mikrobioloških analiza u prvoj fazi istraživanja utvrđene su razlike između agroindustrijskog otpada (komina grožđa, duvanski otpad i kompost od džibre) u pogledu brojnosti određenih grupa mikroorganizama (Tabela 3). Ustanovljene razlike su u skladu sa razlikama u aktivnoj kiselosti i sadržaju vlage u otpadnom materijalu (Tabela 2).

Najnižu kiselost od 3,75 i najviši sadržaj vlage od 74,37% imala je komina grožđa. Takođe, uočeno je da je pH vrednost ispitivanog komposta (7,63) veća od pH vrednosti otpada (3,75 i 6,06). (Tabela 2).

Tabela 2. Aktivna kiselost (pH) i sadržaj vlage agroindustrijskog otpada i komposta

Uzorak	pH	Sadržaj vlage (%)
<b>Komina grožđa</b>	3,75	74,37
<b>Duvanski otpad</b>	6,06	39,38
<b>Kompost od džibre</b>	7,63	55,78

Tabela 3. Ukupan broj bakterija, gljiva i aktinomiceta u agroindustrijskom otpadu i kompostu izražen na 1g suvog otpada/komposta

Uzorak	Ukupan broj bakterija $\times 10^7$	Ukupan broj gljiva $\times 10^4$	Ukupan broj aktinomiceta $\times 10^4$
<b>Komina grožđa</b>	168,22	78,01	13,05
<b>Duvanski otpad</b>	4,70	2,20	556,09
<b>Kompost od džibre</b>	10,71	79,92	7,84

Populacije bakterija su najbrojnije u komini grožđa ( $168,2 \times 10^7$ /g suvog otpada) i ovi rezultati ukazuju na visok sadržaj organske materije u otpadu. U komini grožđa utvrđen je i veći broj gljiva (Tabela 3), što je u skladu sa niskom pH vrednošću (Tabela 2). Najmanji broj bakterija i gljiva prisutan je u duvanskom otpadu u kome je brojnost aktinomiceta bila viša u odnosu na druge vrste agroindustrijskog otpada (Tabela 3).

Kompostiranje kao biološki proces konverzije čvrste organske materije do proizvoda sa visokim sadržajem organske materije i biološke aktivnosti ima različitu primenu, uključujući primenu u kontroli erozije, revegetaciji, biofiltraciji i bioremedijaciji (Alexander, 1999). Kompost nastaje kao proizvod aktivnosti različitih

taksonomskih i fizioloških grupa mikroorganizama, i postoji više studija o sastavu i dinamici populacija mikroorganizama tokom kompostiranja komunalnog otpada. Međutim, malo se zna o mikrobnom diverzitetu u toku kompostiranja agroindustrijskog otpada (**Pepe i sar., 2013**). Zajednice mikroorganizama kao aktivne komponente učestvuju u procesu biodegradacije tokom kompostiranja, a gljive predstavljaju njihov značajan deo. Odnos biomase gljiva prema biomasi prokariota u kompostu iznosi 2:1 (**Sparling i sar., 1982**).

U kompostu od džibre konstatovana je velika brojnost gljiva,  $79,92 \times 10^4$ /g suvog komposta (Tabela 3). Prema rezultatima **Anastasi i sar. (2005)**, brojnost gljiva u kompostu od otpada koji sarži u najvećoj meri ostatke biljnog porekla je iznosila  $8,2 \times 10^5$ /g sm. U rezultatima **Sabet i sar. (2013)** brojnost gljiva u pet ispitivanih vrsta komercijalnog komposta iznosila je od  $5,6 \times 10^4$  do  $5,4 \times 10^4$ /g sm. Ovakva brojnost je uporediva sa brojem gljiva u plodnijim zemljištima (**Thorn, 1997**) i opravdava upotrebu komposta kao bioaktivatora u poljoprivrednom zemljištu. Na brojnost i diverzitet gljiva u kompostu utiču brojni faktori, uključujući temperaturu, vlažnost, odnos C/N, pH, ali su od najvećeg značaja pH vrednost i temperatura (**Grigatti i sar., 2011**).

Pored određivanja brojnosti osnovnih taksonomskih grupa mikroorganizama u agroindustrijskom otpadu, utvrđeno je i prisustvo ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija i *Escherichia coli*.

Tabela 4. Broj ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija i *Escherichia coli* agroindustrijskom otpadu i kompostu izražen na 1g suvog otpada/komposta

Uzorak	Ukupne koliformne bakterije $\times 10^2$	Fekalne koliformne bakterije $\times 10^2$	<i>Escherichia coli</i> $\times 10^2$
<b>Komina grožđa</b>	2,24	nema	nema
<b>Duvanski otpad</b>	111,45	5,84	nema
<b>Kompost od džibre</b>	839,12	3,46	2,04

Opasnost od prisustva humanih patogena u zemljištu je odavno prepoznata i upravljanje ovim rizikom zahteva razumevanje izvora kontaminacije i kontrolu procesa koji mogu doprineti kontaminaciji. Među glavnim izvorima kontaminacije mogu biti različite otpadne vode, komunalni i agroindustrijski otpad. U poljoprivrednoj proizvodnji u kojoj se koristi neodgovarajuće pripremljen stajnjak i kompost, može se

povećati rizik od zagađenja zemljišta (**Anderson i sar., 2006**). **Gerba i Smith (2005)** ističu da je detektovano više od 150 entero patogena u različitim vrstama otpada, a svake godine se otkrivaju nove vrste entero patogena. Među merama za smanjenje rizika od kontaminacije patogenima isti autori navode neophodnost kvantifikacije rizika, kao i potrebu za ispitivanjima koja će dati više podataka o koncentraciji patogena u otpadu i standardizaciju metodologije za detekciju patogena.

Imajući sve ovo u vidu, neophodno je sa higijensko-sanitarnog aspekta razmatrati mikrobiološki kvalitet dobijenog komposta kroz parametre prisustva humanih patogenih mikroorganizama, kao što *E. coli*, *Salmonella*, ukupne i fekalne koliformne bakterije, fekalne streptokoke i drugih indikatorskih mikroorganizama.

Brojnost indikatora fekalne kontaminacije je varirao u ispitivanim vrstama agroindustrijskog otpada (Tabela 4). **Gong i sar. (2006)** ističu da je brojnost koliformnih bakterija u 19 ispitanih vrsta komposta takođe varirala u širokom intervalu od  $1,8 \times 10^2$  do  $2,5 \times 10^6$ /g sm.

Najveća brojnost ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija, kao i *E. coli* je prisutna u kompostu od džibre. Određeni stepen kontaminacije ovog uzorka je i očekivan kada imajući u vidu lokaciju gomile (blizina farme u okviru poljoprivrednog gazdinstva) i činjenicu da je u pitanju nezaštićen i nepokriven otpad koji je podvrgnut spontanom kompostiranju. Najmanja brojnost ukupnih koliformnih bakterija ( $2,24 \times 10^2$ /g sm) je u komini grožđa u kojoj je u potpunosti izostalo prisustvo fekalnih koliformnih bakterija i *E. coli*. U duvanskom otpadu je potvrđeno prisustvo kako ukupnih, tako i fekalnih koliformnih bakterija.

Pored spoljašnjih faktora koji mogu dovesti do kontaminacije već dobijenog komposta (skladištenje, pakovanje), **Gong i sar. (2005)** navode da određeni broj patogena može preživeti proces kompostiranja, tako da postoji veza kontaminacije polaznog materijala i dobijenog komposta. Iako visoka temperatura u toku termofilne faze kompostiranja (50-70°C) uništava mezofilne mikroorganizme (**Jones i Martin, 2003**), prisustvo mutantnih sojeva, ali i nemogućnost da se dovoljno dugo održi visoka temperatura mogu dovesti do opstanka i rasta patogenih bakterija (**Nicholson i sar., 2005**).

## 5.2. Izolacija filamentoznih gljiva iz agroindustrijskog otpada

Filamentozne gljive su značajne usled uloge u degradaciji lignoceluloznog otpada, sposobnosti njihovog preživljavanja u ekstremnim uslovima, značaja u procesu sazrevanja komposta, uloge u održavanju plodnosti zemljišta, suzbijanju biljnih patogena, bioremedijaciji i stimulaciji rasta biljaka. Iz ovoga sledi i važnost upoznavanja diverziteta populacije gljiva u kompostu i agroindustrijskom otpadu. Monitoring populacija gljiva u otpadu i kompostu je od suštinskog značaja i u cilju otkrivanja gljiva opasnih za zdravlje ljudi, životinja i biljaka kao i zbog standardizacije kvaliteta komposta (**Summerbell i sar., 1994**).

Primena standardne metode razređenja i selektivnih hranljivih podloga je imala za cilj mikrobiološku karakterizaciju otpada kroz utvrđivanje brojnosti pojedinih grupa mikroorganizama, ali i izolaciju iz koje je proistekla kolekcija kultura gljiva koja će se koristiti u daljem istraživanju.

Nakon utvrđivanja brojnosti gljiva, pojedinačne, morfološki različite kolonije sa RB hranljive podloge su presejavane na sterilnu PDA podlogu. Višestrukim presejavanjem dobijene su čiste kulture ukupno 46 različitih izolata od kojih po 16 izolata potiče iz komine grožđa i duvanskog otpada, a 14 iz komposta od džibre. Čistoća kultura je proverena praćenjem morfoloških karakteristika kolonija ali i mikromorfoloških karakteristika.

Izolati dobijeni iz duvanskog otpada i komposta od džibre bili su značajno heterogeniji prema svojim makromorfološkim karakteristikama u odnosu na izolate iz komine grožđa. U komini grožđa je dominirala grupa gljiva sličnih makromorfloških karakteristika. Na osnovu preliminarnog posmatranja morfoloških karakteristika kolonija, većina izolata iz komine ispoljila je osnovne osobine na osnovu kojih su identifikovani kao pripadnici rodova *Penicillium* i *Aspergillus*. Među izolatima iz duvanskog otpada i komposta od džibre nalazile su se gljive međusobno raznovrsne prema izgledu kolonija, za koje je utvrđeno da pripadaju rodovima *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* i *Aspergillus*.

Kompost od agroindustrijskog otpada poznat je kao izvor mikroorganizama koji suzbijaju bolesti biljaka, uključujući rodove bakterija i gljiva: *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma* i *Gliocladium* (**Nelson i Boehm, 2002**). Ovaj navod uz druge navode iz pregleda

literature ukazuje na uticaj biodiverziteta gljiva na suzbijanje fitopatogena, pa se stoga pošlo se od hipoteze da se među izolatima iz agroindustrijskog otpada i komposta mogu naći i antagonisti biljnih patogena *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i *Pythium aphanidermatum*. Odabir izolata za dalja istraživanja izvršena je na osnovu rezultata konfrontacijskog testa.

### 5.2.1. Selekcija gljiva, konfrontacijski test

Konfrontacijski test je u istraživanju imao svrhu da se izvrši preliminarna eliminacija i izaberu izolati za dalja istraživanja. Nakon odabira u dalja istraživanja bili su uključeni samo oni izolati koji su testu pokazali antagonizam prema bar jednom biljnom patogenu. Na osnovu rezultata odabrano je šest morfološki različitih izolata. Tri izolata od šest selektovanih potiču iz komine grožđa i imaju oznake: K7/1, K11/1 i K16/2, a tri potiču iz komposta dobijenog od džibre i označeni su kao: 10/5, 19/5 i A/5. Ni jedan od izolata gljiva iz duvanskog otpada u konfrontacijskom testu nije pokazao značajan efekat na rast fitopatogenih gljiva, stoga su ovi izolati isključeni iz daljeg istraživanja.

U ovoj fazi je procenjivan inhibitorni uticaj izolata na rast tri fitopatogene vrste: *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum*. *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum* predstavljaju zemljišne patogene koji su saprofitnoj fazi preživljavanja u zemljištu i podložni su kako uticaju biotičkih tako i abiotičkih faktora. Među biotičkim faktorima su i interakcije sa korisnim mikroorganizmima na kojima se zasniva njihova biološka kontrola (Haas i Défago, 2005). *B. cinerea* nije zemljišni patogen, ali preživljava u zemljištu na biljnim ostacima koji tako mogu predstavljati izvor zaraze (Yunis i Elad, 1989).

#### 5.2.1.1. Konfrontacijski test izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada sa *Botrytis cinerea*

Ukupni gubici prinosa u proizvodnji grožđa u svetu uzrokovani samo fitopatogenom *B. cinerea* procenjuju se na najmanje dve milijarde \$US na godišnjem nivou (Elmer i Michailides, 2004). Zbog širokog kruga domaćina, ovaj patogen nanosi velike štete i u proizvodnji drugih useva, kao što su malina, jagoda, povrće i ukrasne biljke. Samo 2001. godine tretman *B. cinerea* fungicidima je koštao oko 540 miliona

evra što predstavlja 10% svetskog tržišta fungicidima (Annual Report, UIPP 2002). Pored toga, tretman fungicidima protiv *B. cinera* je doveo do pojave rezistentnih sojeva, što ukazuje na potrebu za razvojem novih sredstava zaštite (Leroux i sar., 2002). Jedna od alternativa je i biološka kontrola pomoću korisnih mikroorganizama koji ispoljavaju antagonizam prema ovoj fitopatogenoj gljivi i/ili indukuju rezistenciju kod biljaka. Među mikrobnim antagonistima *B. cinerea* do sada su opisane brojne filamentozne gljive kao što su *Trichoderma* sp., *Ulocladium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. (Elmer i Reglinski, 2006). Istraživanja mogućnosti upotrebe *Trichoderma* sp. u cilju suzbijanja ovog biljnog patogena započeta su pre više od 30 godina (Dubos i sar., 1978), a među prvim komercijalizovanim preparatima na bazi *Trichoderma* sp. je preparat na bazi *T. harzianum* T39 (Elad, 2001). Trenutno na tržištu postoji više preparata namenjenih suzbijanju *B. cinerea*, a najčešće se baziraju na sojevima roda *Trichoderma* (Trichopulvin 25 PU, Research Institute of Plant Protection, Romania sa sojem *T. viride* Td50; T-22, Bioworks Inc., USA sa sojem *T. harzianum* 1295-22 i drugi).

Svaki od šest selektovanih izolata gljiva pokazao je u konfrontacijskom testu u manjoj ili većoj meri antagonizam prema *B. cinerea* (Tabela 5).

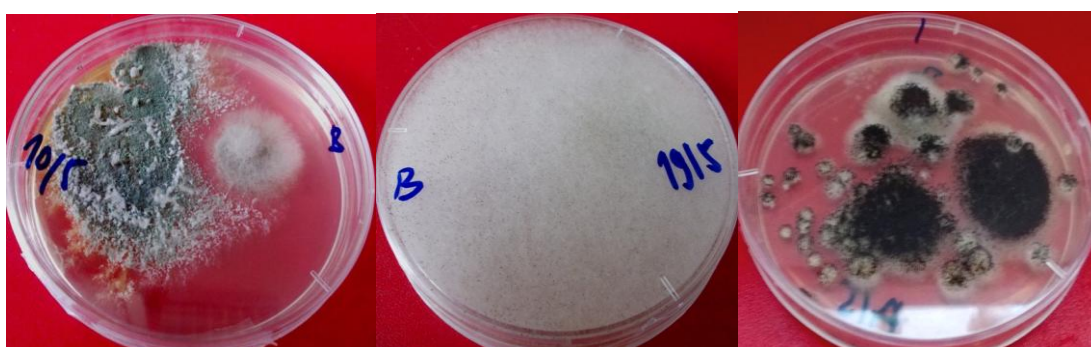
Tabela 5. Rezultati konfrontacijskog testa selektovanih izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada i *Botrytis cinerea*

Oznaka izolata	Rast <i>Botrytis cinerea</i> i odnos sa kolonijama izolata u konfrontacijskom testu
K7/1	Prosečan prečnik kolonije <i>B. cinerea</i> je redukovan za 77% u odnosu na kontrolu.
K11/1	Poluprečnik kolonije <i>B. cinerea</i> prema koloniji izolata je za 53% manji od poluprečnika ka drugoj strani Petri kutije. Sedmog dana dolazi do prerastanja kolonije <i>B. cinerea</i> od strane micelije izolata.
K16/2	Prečnik kolonije <i>B. cinerea</i> redukovan u odnosu na kontrolu za 35%, zatim kolonije izolata potpuno prerastaju koloniju <i>B. cinerea</i> .
10/5	Prečnik kolonije <i>B. cinerea</i> je redukovan za 68%, između kolonija se javlja zona inhibicije od 2-3 mm.
19/5	Kolonije izolata potpuno prerastaju koloniju <i>B. cinerea</i> .
A/5	Javlja se mutualistička inhibicija. Pri kontaktu sa micelijom <i>B. cinerea</i> , micelija izolata dobija žuti pigment. Sedmog dana dolazi do prerastanja micelije <i>B. cinerea</i> od strane izolata.





Slika 2. Petri kutije sa dvojnim kulturama *Botrytis cinerea* i selektovanih izolata iz komine grožđa nakon pet dana inkubacije (s leva na desno: *B. cinerea* sa izolatima K7/1, K11/1 i K16/2)



Slika 3. Petri kutije sa dvojnim kulturama *Botrytis cinerea* i selektovanih izolata iz komposta od džibre nakon pet dana inkubacije (s leva na desno: *B. cinerea* sa izolatima 10/5, 19/5 i A/5)

Nakon inkubacije, izolati K7/1, K11/1, K16/2 i 10/5 su doveli do smanjenja veličine kolonija *B. cinerea* u odnosu na kolonije u kontroli. Procenat inhibicije rasta se kretao od 35% do 77% i bio je najviši pri rastu *B. cinerea* sa izolatima K7/1 i 10/5. **Bogumil i sar (2013)** su konfrontacijskim testom ispitali antagonizam 52 izolata *Trichoderma* sp. prema *B. cinerea*. Procenat inhibicije rasta *B. cinerea* je iznosio 45-78%, a izolati koji su doveli do najveće inhibicije identifikovani su kao *T. artoviride*.

Selekcija putem konfrontacijskog testa je u ispitivanjima **Huang i Erickson (2002)** poslužila za odabir antagonista prema *B. cinerea*. Odabrani izolati bakterija i gljiva: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium griseofulvum* i *Trichoderma hamatum* doveli su do inhibicije rasta *B. cinerea* do 65% u konfrontacijskom testu, a u *in vivo* ogledu su pokazali značajne efekte u sprečavanju bolesti sočiva (*Lens culinaris*) izazvane ovim patogenom.

Zona inhibicije se formirala između izolata 10/5 i *B. cinerea*, dok je prerastanje micelije *B. cinerea* od strane micelije izolata primećeno u testovima sa izolatima K16/2, 19/5 i A/5. Pri dodiru kolonija izolata A/5 sa kolonijom *B. cinerea*, po ivici kolonije izolata se javila žuta pigmentacija. (Tabela 5).

#### 5.2.1.2. Konfrontacijski test izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada sa *Fusarium oxysporum*

Među vrstama roda *Fusarium* su i predstavnici odgovorni za vaskularnu trulež korena i stabla više vrsta ekonomski važnih biljaka. *F. oxysporum* je široko rasprostranjen i može dugo da preživi na organskoj materiji prisutnoj u zemljištu (**Edel i sar., 2001; Burgess, 1981**). Usled specijalizacije, odnosno svojstva da uzrokuje bolesti kod određene grupe biljaka domaćina, patogeni sojevi su klasifikovani u *formae speciales* (**Armstrong i Armstrong, 1981**), a neki nepatogeni predstavnici vrste *F. oxysporum* su ispitani i sa aspekta upotrebe u biološkoj kontroli s obzirom na antagonizam koji ispoljavaju prema fitopatogenim gljivama (**Shishido i sar., 2005**).

Pored nepatogenog *F. oxysporum* i drugi biokontrolni agensi su ispitani *in vitro* i *in vivo* ogledima u cilju suzbijanja *F. oxysporum*. Među njima su gljive i bakterije iz rodova *Streptomyces*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Trichoderma* (**Alabouvette i sar., 1993; Weller, 2002**).

Od šest selektovanih izolata, četiri su u konfrontacijskom testu dovela do inhibicije rasta *F. oxysporum* dok su preostala dva uzrokovala morfološke promene kolonija fitopatogene gljive (Tabela 6).

Tabela 6. Rezultati konfrontacijskog testa selektovanih izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada i *Fusarium oxysporum*

Oznaka izolata	Rast <i>Fusarium oxysporum</i> i odnos sa kolonijama izolata u konfrontacijskom testu
<b>K7/1</b>	Poluprečnik kolonije <i>F. oxysporum</i> prema koloniji izolata je za 36% manji od poluprečnika ka drugoj strani Petri kutije, zatim dolazi i do prerastanja kolonije <i>F. oxysporum</i> od strane kolonije izolata.
<b>K11/1</b>	Nije došlo do smanjenja prečnika micelije <i>F. oxysporum</i> , ali je micelija fotopatogene gljive izmenjena pri dodiru sa micelijom K11/1 (pojas gušće beličaste micelije).
<b>K16/2</b>	Nije došlo do smanjenja prečnika micelije <i>F. oxysporum</i> , ali je micelija fotopatogene gljive izmenjena pri dodiru sa micelijom K 16/2 (pojas gušće beličaste micelije).
<b>10/5</b>	Poluprečnik kolonije <i>F. oxysporum</i> prema koloniji izolata je za 37,5% manji od poluprečnika ka drugoj strani Petri kutije.
<b>19/5</b>	Kolonija izolata 19/5 potpuno prerasta <i>F. oxysporum</i> . Rast micelije je za 90% inhibiran u odnosu na kontrolu, a poluprečnik micelije <i>F. oxysporum</i> ka izolatu je u potpunosti (100%) redukovan.
<b>A/5</b>	Poluprečnik kolonije <i>F. oxysporum</i> prema koloniji izolata je za 33% manji od poluprečnika ka drugoj strani Petri kutije. U zonama micelije bližim koloniji micelija je nešto tamnije ljubičaste boje.

Slika 4. Petri kutije sa dvojnim kulturama *Fusarium oxysporum* i selektovanih izolata iz komine grožđa nakon pet dana inkubacije (s leva na desno: *F. oxysporum* sa izolatima K7/1, K11/1 i K16/2)



Slika 5. Petri kutije sa dvojnim kulturama *Fusarium oxysporum* i selektovanih izolata iz komposta od džibre nakon pet dana inkubacije (s leva na desno: *F. oxysporum* sa izolatima 10/5, 19/5 i A/5)

Inhibicija rasta u konfrontacijskom testu sa odabranim izolatima se najčešće manifestovala kao smanjenje poluprečnika kolonije *F. oxysporum* ka kolonijama izolata u odnosu na poluprečnik kolonija ka drugoj strani Petri kutije (izolati K7/1, 10/5, 19/5 i A/5). Do prerastanja kolonije *F. oxysporum* od strane izolata došlo je u slučaju izolata K7/1 i 19/5. Izolati K11/1 i K16/2 nisu doveli do inhibicije rasta gljive *F. oxysporum*, ali je došlo do pojave morfološki izmenjene micelije pri dodiru sa kolonijama izolata. Micelija *F. oxysporum* je u najvećoj meri (90%) bila inhibirana od strane kolonije izolata 19/5, a izolati K7/1, 10/5 i A/5 su doveli do inhibicije koja se kretala u opsegu 33-37,5%. (Tabela 6).

Na koloniji izolata 10/5 se pri dodiru sa kolonijom *F. oxysporum* javio pojas micelije sa izraženom sporulacijom. Ovakva pojava se navodi kao rezultat i u radu **Sharma (2011)** pri posmatranju antagonizma *F. oxysporum* i različitih izolata *Trichoderma* sp., a nastaje pod uticajem metabolita *F. oxysporum* koji takođe ima svoje odbrambene mehanizme. Brz rast *Trichoderma* sp. i pojačana sporulacija u delu ka koloniji fitopatogene gljive omogućavaju da *Trichoderma* ovakav odbrambeni odgovor *F. oxysporum* prevaziđe. U istom istraživanju navode se i moguće promene u morfologiji *F. oxysporum* kao odgovor na prisustvo antagonista. Među njima su promene u smislu jače pigmentacije što je u istraživanju u okviru ove disertacije zabeleženo u konfrontacijskom testu sa izolatom A/5. Pretpostavlja se da ovakve promene u morfologiji kolonija uglavnom odražavaju fiziološke promene koje se javljaju kao odgovor na stres.

*F. oxysporum* kao patogen smatra se najvažnijim uzročnikom gubitaka u usevima paprike i sve više se obraća pažnja na iznalaženju biokontrolnih agenasa za sprečavanje šteta. U istraživanju **Sahi i Khalid (2007)**, vrste roda *Trichoderma* su u

konfrontacijskom testu uticale na inhibiciju rasta *F. oxysporum* izolovanog sa paprike za 6-62%, pri čemu je *T. viride* imala najveći inhibitorski efekat, a efekat *T. harzianum* (34%) je uporediv sa izolatom 10/5 iz ovog istraživanja. *T. viride* je i u konfrontacijskom testu u istraživanju **Kavitha i Nelson (2013)** imala najveći inhibitorski efekat na *F. oxysporum* od 72,20%.

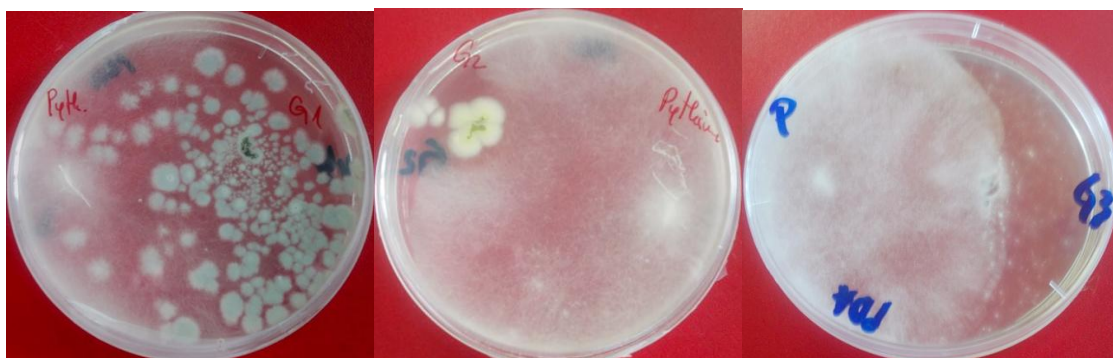
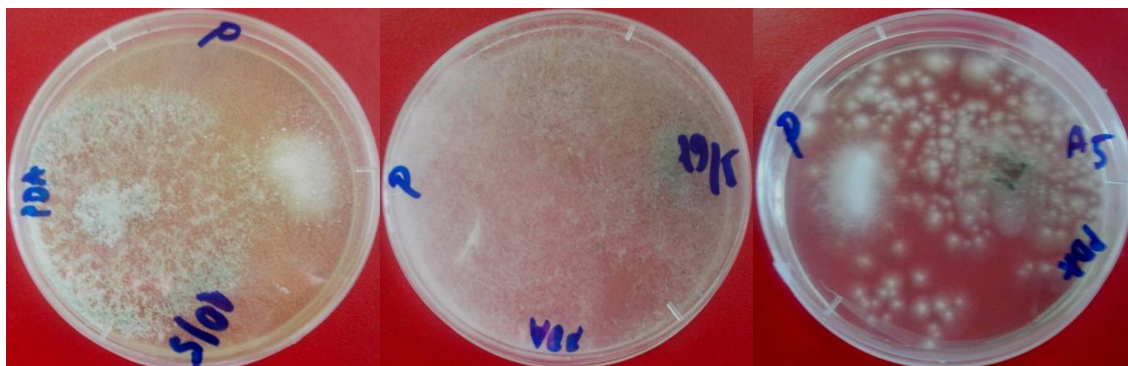
#### 5.2.1.3. Konfrontacijski test izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada sa *Pythium aphanidermatum*

*P. aphanidermatum* pripada klasi *Oomycetes* i spada u veoma rasprostranjene zemljišne biljne patogene (**Nzungize i sar., 2012**). Pored toga, ovaj patogen izaziva bolest kod više vrsta biljaka što dovodi do značajnih gubitaka u poljoprivredi (**Jeyaseelan i sar., 2012**). Osetljiv je kad je u pitanju kompeticija i antagonizam tokom njegove saprofitne faze, što predstavlja ključni faktor u mogućnostima biološke kontrole ovog patogena (**Martin i Loper, 1999**). Pokazalo se da dodatak različitog komposta zemljištu, između ostalog i komposta od komine grožđa, utiče na suzbijanje *P. aphanidermatum* (**Hadar i sar., 1992**), a među ispitanim antagonistima koji pokazuju potencijal za biološku kontrolu *P. aphanidermatum* nalaze se: *Gliocladium virens*, *Trichoderma harzianum*, *Agrobacterium radiobacter* K-84, *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus* sp. (**Jeyaseelan i sar., 2012**).

Četiri od šest selektovanih izolata doveli su do različitog stepena inhibicije rasta *P. aphanidermatum* u konfrontacijskom testu, dok je u preostala dva slučaja došlo do zaustavljanja rasta obe gljive pri dodiru kolonija (mutualistička inhibicija), (Tabela 7).

Tabela 7. Rezultati konfrontacijskog testa selektovanih izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada i *Pythium aphanidermatum*

Oznaka izolata	Rast <i>Pythium aphanidermatum</i> i odnos sa kolonijama izolata u konfrontacijskom testu
K7/1	Izolat prvo zaustavlja rast <i>P. aphanidermatum</i> čije su kolonije prečnika smanjenog za 65% u odnosu na prečnik u kontrolnim Petri kutijama. Nakon zaustavljanja dolazi i do prerastanja <i>P. aphanidermatum</i> od strane izolata K7/1.
K11/1	<i>P. aphanidermatum</i> raste nesmetano do rastojanja od 2 mm do kolonije izolata kada se rast zaustavlja i nastaje zona inhibicije.
K16/2	Izolat K16/2 i <i>P. aphanidermatum</i> nesmetano rastu do kontakta kolonija, nakon čega dolazi do mutualističke inhibicije.
10/5	Poluprečnik kolonije <i>P. aphanidermatum</i> prema koloniji izolata je za 39% manji od poluprečnika ka drugoj strani Petri kutije, a prečnik micelije je za 77% redukovan u odnosu na kontrolu.
19/5	Izolat 19/5 i <i>P. aphanidermatum</i> nesmetano rastu do kontakta kolonija, nakon čega dolazi do mutualističke inhibicije.
A/5	Rast <i>P. aphanidermatum</i> je zaustavljen, prečnik kolonija je za 81% smanjen u odnosu na kontrolu.

Slika 6. Petri kutije sa dvojnim kulturama *Pythium aphanidermatum* i selektovanih izolata iz komine grožđa nakon pet dana inkubacije (s leva na desno: *P. aphanidermatum* sa izolatima K7/1, K11/1 i K16/2)Slika 7. Petri kutije sa dvojnim kulturama *Pythium aphanidermatum* i selektovanih izolata iz komposta od džibre nakon pet dana inkubacije (s leva na desno: *P. aphanidermatum* sa izolatima 10/5, 19/5 i A/5)

Najveći procenat inhibicije rasta *P. aphanidermatum* u konfrontacijskom testu je pokazao izolat A/5 (81%). Smanjenje prečnika *P. aphanidermatum* uzrokovali su i izolati K7/1 (65%) i 10/5 (77%), što je uporedivo sa rezultatima koji su postignuti sa izolatom *Trichoderma viride*, divlji tip 1433 u radu **Khare i sar. (2010)** gde je *P. aphanidermatum* u konfrontacijskom testu inhibiran za 72%. Iako je inhibicija usled primene pomenutog soja bila značajno manja od ispitivanih mutanata, efikasnost divljeg tipa je u uslovima staklenika iznosila 50,8%. Procenat inhibicije *P. aphanidermatum* od strane 12 različitih sojeva vrsta *T. harzianum* i *T. viride* koje pokazuju potencijal za biološku kontrolu u radu **Arunachalam i Sharma (2012)** kretao se od 56,5% do 86,4%. U poređenju sa navedenim podacima iz literature, može se zaključiti da među izolatima iz agroindustrijskog otpada ispitanim u ovoj disertaciji ima onih koji poseduju značajan potencijal za suzbijanje *P. aphanidermatum*. Pored smanjenja prečnika kolonije fitopatogena, u slučaju izolata K7/1 došlo je i do prerastanja micelije *P. aphanidermatum*, a u testu sa izolatom K11/1 pojavila se zona inhibicije rasta *P. aphanidermatum* od 2 mm. Izolati K16/2 i 19/5 nisu doveli do inhibicije rasta micelije *P. aphanidermatum* u konfrontacijskom testu. (Tabela 7)

Izolat K16/2 je doveo do inhibicije rast *B. cinerea*, samo jedne od tri ispitivane fitopatogene vrste. Izolati K7/1, 10/5 i A/5 pokazali antagonizam prema sva tri fitopatogena, dok su preostala dva izolata, 10/5 i 19/5, inhibirali rast dva od tri ispitivana fitopatogena. U konfrontacijskom testu u najvećoj meri je inhibiran rast *F. oxysporum* u kombinaciji sa izolatom 19/5 (90%), a veoma visok procenat inhibicije vrste *P. aphanidermatum* postignut je u prisustvu izolata A/5 (81%). *B. cinerea* je u najvećoj meri inhibiran od strane izolata K7/1, za 77%.

Izvršeno je određivanje stepena antagonizma prema klasifikaciji **Sookchaoy i sar. (2009)**. Od selektovanih izolata, tri su ispoljila visoku i veoma visoku antagonističku aktivnost prema *P. aphanidermatum* (K7/1, 10/5 i A/5), tri prema *B. cinerea* (K7/1, 10/5 i 19/5), a jedan izolat (19/5) je pokazao veoma visoku antagonističku aktivnost prema *F. oxysporum*. Umeren antagonistički efekat pokazao je izolat K11/1 prema *B. cinerea*, dok je u ostalim kombinacijama prema ovoj klasifikaciji zastupljena slaba antagonistička aktivnost.

I pored brzog rasta *P. aphanidermatum*, najveći procenat inhibicije rasta postignuti je kod ove fitopatogene vrste, a najniži kod *F. oxysporum*.

Pošto je svaki od pomenutih šest izolata gljiva doveo do inhibicije rasta od preko 50% ili do prerastanja kolonije kod bar jedne od ispitivanih fitopatogena, navedeni izolati su odabrani za dalje faze istraživanja. Kao prvi korak izvršena je njihova identifikacija.

### **5.3. Identifikacija i karakterizacija gljiva iz agroindustrijskog otpada**

Pre daljih istraživanja koja se odnose na antagonizam selektovanih izolata gljiva prema odabranim fitopatogenim vrstama, važno je izvršiti njihovu identifikaciju i karakterizaciju. U tom cilju izvršeno je ispitivanje morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika izolata, primenjene su i molekularne metode identifikacije i izvršeno je kvalitativno ispitivanje enzimske aktivnosti.

Dobro poznavanje opštih svojstava izolata neophodno je kao putokaz za načine njihove uspešne primene. Primena konvencionalnih metoda se i dalje smatra nezamenljivim za potpuno proučavanje zajednica gljiva, naročito imajući u vidu da se pomoću njih dobijaju čiste kulture koje se mogu zatim i detaljnije okarakterisati (**Anastasi i sar. 2005**). Molekularne metode svakako predstavljaju važnu dopunu koja doprinosi preciznosti identifikacije i upoznavanju sa diverzitetom.

#### **5.3.1. Morfološke, odgajivačke i ekološke karakteristike**

Morfološka svojstva predstavljaju važan parametar u identifikaciji i karakterizaciji gljiva. Prvi korak u identifikaciji gljiva je karakterizacija rasta na različitim hranljivim podlogama, koja podrazumeva posmatranje oblika, veličine, izgleda ivica, konzistencije i pigmentacije kolonija sa obe strane, kao i eventualna pigmentacija podloge i prisustvo eksudata.

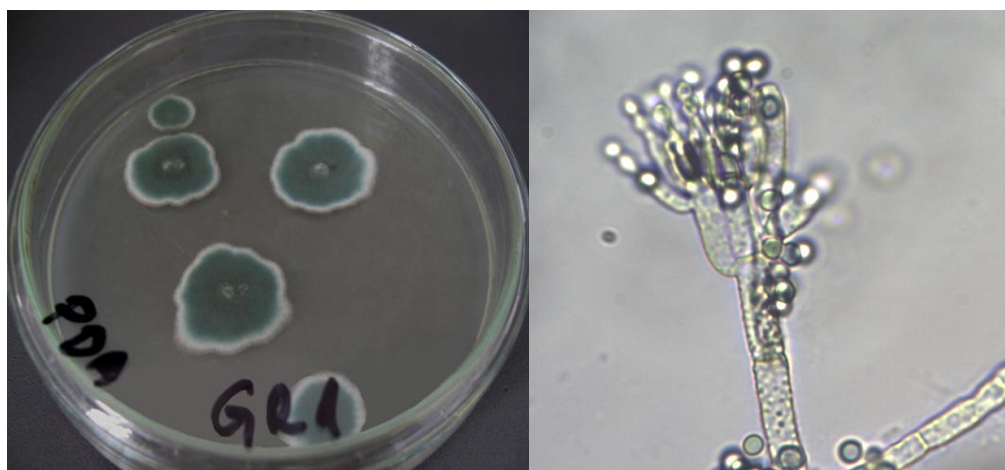
U cilju morfološke identifikacije opisan je izgled kolonija nakon petodnevne inkubacije na tri hranljive podloge, kao i mikromorfološke karakteristike izolata posmatranjem nativnog preparata pripremljenog od micelije koja je razvijena na PDA polozi. Među posmatranim mikromorfološkim svojstvima za najvažniji parameter je uzet izgled sporonosnih hifa i spora.

Pored posmatranja navedenih karakteristika kolonija na tri hranljive podloge (SB, SA i ČA) prema metodama **Samson i sar. (2000)**, posebno su utvrđene i makromorfološke karakteristike izolata na PDA podlozi u cilju praćenja eventualne



kontaminacije tokom rada u narednim fazama istraživanja koje su prevashodno podrazumevale gajenje na ovoj hranljivoj podlozi.

### 5.3.1.1. Morfološke karakteristike izolata K7/1



Slika 8. Morfološke karakteristike kolonija izolata K7/1 iz komine grožđa (levo) i mikrografija nativnog preparata: konidiofora sa grananjem i sporama, naziru se zidovi karakteristične ornamentacije (desno)

Tabela 8. Morfološke karakteristike kolonija izolata K7/1 na različitim hranljivim podlogama

	<b>Sabouraud-ov agar</b>	<b>Sladni agar</b>	<b>Čapekov agar</b>
<b>Izgled kolonija izolata na podlozi</b>	zelene kolonije belog oboda i nepravilnih ivica, kolonije ispučene u centru	kolonije su blago nabrane, ispučene u centru, sa koncentričnim krugovima u kojima se od centra ka ivici smenjuju boje redosledom: svetlo zelena, tamno zelena, svetlo zelena, mrka i beli obod kolonija	zelene kolonije sa belim ivicama, izdignute u centru
<b>Prosečan prečnik</b>	34 mm	30 mm	28 mm

Tabela 9. Morfološke karakteristike kolonija izolata K7/1 na PDA podози

Makromorfološke karakteristike	Izgled na PDA
Prosečan prečnik	25 mm
Boja kolonija	Zelena sa beličastim centrom i obodom
Konzistencija	Baršunasta, kolonije blago izdignute u centru
Izgled ivica	Talasaste ivice čini sloj bele supstratne micelije debljine 1-2 mm
Boja sa donje strane Petri kutije	Beličasta do svetlo zelena
Prisustvo eksudata	Nema eksudata

Mikroskopskim pregledom preparata izolata K7/1 uočene su konidiofore sa dva stepena grananja, stipe karakteristično ornamentisane, metule grubih zidova koje na krajevima nose fialide flašičastog oblika, u grupama se nalazi po pet do sedam flašičastih filaida. Konidije su okrugle, glatkih zidova, zelenkaste, raspoređene u kratkim lancima prosečnog prečnika 4  $\mu\text{m}$ .

#### 5.3.1.2. Morfološke karakteristike izolata K11/1



Slika 9. Morfološke karakteristike kolonija izolata K11/1 iz komine grožđa (levo) i mikrografija nativnog preparata: konidiofora sa grananjem i sporama (desno)

Tabela 10. Morfološke karakteristike kolonija izolata K11/1 na različitim hranljivim podlogama

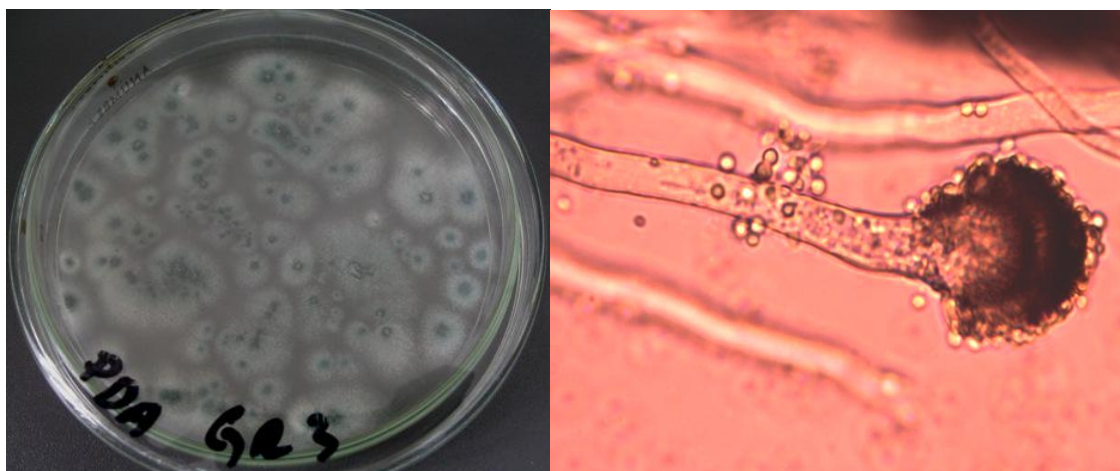
	<b>Sabouraud-ov agar</b>	<b>Sladni agar</b>	<b>Čapekov agar</b>
<b>Izgled kolonija izolata na podlozi</b>	zelene nabrane kolonije belih ivica sa blago izdignutim centrom, kapljice bezbojnog eksudata	kolonije su belog oboda, mrke u centru oko koga se nalazi zeleni pojas sa koncentrično postavljenim kapljicama bezbojnog eksudata	žutozelene kolonije koje su po površini blago mrke, sa belim obodom i krupnim kapljicama (3 mm) eksudata
<b>Prosečan prečnik</b>	20 mm	19 mm	8 mm

Tabela 11. Morfološke karakteristike kolonija izolata K11/1 na PDA podlozi

<b>Makromorfološke karakteristike</b>	<b>Izgled na PDA</b>
<b>Prosečan prečnik</b>	11 mm
<b>Boja kolonija</b>	Zelena, beli obod, u centru manja mrka zona
<b>Konzistencija</b>	Baršunasta, kolonije izdignute u centru
<b>Izgled ivica</b>	Ivice čini sloj bele supstratne micelije prečnika do 1 mm
<b>Boja sa donje strane Petri kutije</b>	Svetlo do jarko žuta, u centru tamnija, starije kolonije boje podlogu u žuto
<b>Prisustvo eksudata</b>	Kapljice žutog eksudata

Mikroskopskim pregledom preparata izolata K11/1 uočene su konidiofore sa više stepeni grananja, triverticilatne sa cilindričnim metulama koje nose tri do šest grupisanih flašičastih fialida. Na fialidama se nalaze okrugle konidije, svetlo zelene boje i glatkih zidova čiji prosečan prečnik je 2,9  $\mu\text{m}$ .

## 5.3.1.3. Morfološke karakteristike izolata K16/2



Slika 10. Morfološke karakteristike kolonija izolata K16/2 iz komine grožđa (levo) i mikrografija nativnog preparata: konidiofora sa vezikulom, fialidama i sporama (desno)

Tabela 12. Morfološke karakteristike kolonija K16/2 na različitim hranljivim podlogama

	<b>Sabouraud-ov agar</b>	<b>Sladni agar</b>	<b>Čapekov agar</b>
<b>Izgled kolonija izolata na podlozi</b>	zelene kolonije rasute svuda po površini Petri kutije, sa nejasnim ivicama, pojedinačnim belim hifama na površini kolonija	zelene kolonije rasute svuda po površini Petri kutije, sa blago izdignutim beličastim centrom	kolonije izolata su zelene, praškastog oboda, izdignute u centru
<b>Prosečan prečnik</b>	10 mm	14 mm	19 mm

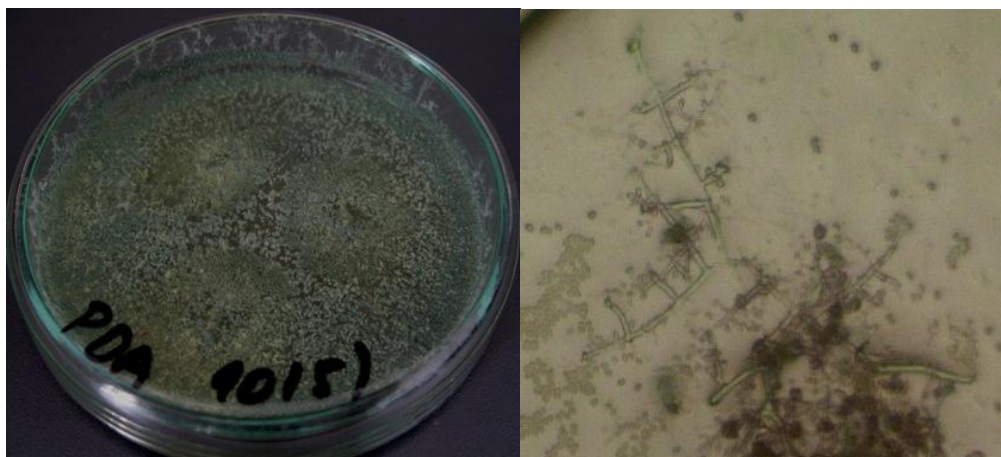
Tabela 13. Morfološke karakteristike kolonija izolata K16/2 na PDA podozi

<b>Makromorfološke karakteristike</b>	<b>Izgled na PDA</b>
<b>Prosečan prečnik</b>	14 mm
<b>Boja kolonija</b>	Zelene, ivica beličasta
<b>Konzistencija</b>	Praškasto-filamentozna, kolonije rasute svuda po površini Petri kutije
<b>Izgled ivica</b>	Nejasne ivice čini bela supstratna micelija sitnozrnaste konzistencije
<b>Boja sa donje strane Petri kutije</b>	Svetlo zelena
<b>Prisustvo eksudata</b>	Nema kapljica eksudata

Mikroskopskim pregledom preparata izolata K16/2 uočene su nebojane konidiofore, glatkih zidova, pri vrhu zelene, tamnije u blizini vezikule. Vezikule nose jedan red relativno kratkih zeleno obojenih fialida. Fialide su međusobno zbijene i

grupisane samo na gornjem delu vezikule. Konidije su grubih zidova, svetlo zelene, okrugle do blago elipsoidne, poređane u lancima, prečnika oko 2,7  $\mu\text{m}$ .

#### 5.3.1.4. Morfološke karakteristike izolata K10/5



Slika 11. Morfološke karakteristike kolonija izolata 10/5 iz komposta od džibre (levo) i mikrografija nativnog preparata: konidiofore sa granjem pod pravim uglom (desno)

Tabela 14. Morfološke karakteristike kolonija izolata 10/5 na različitim hranljivim podlogama

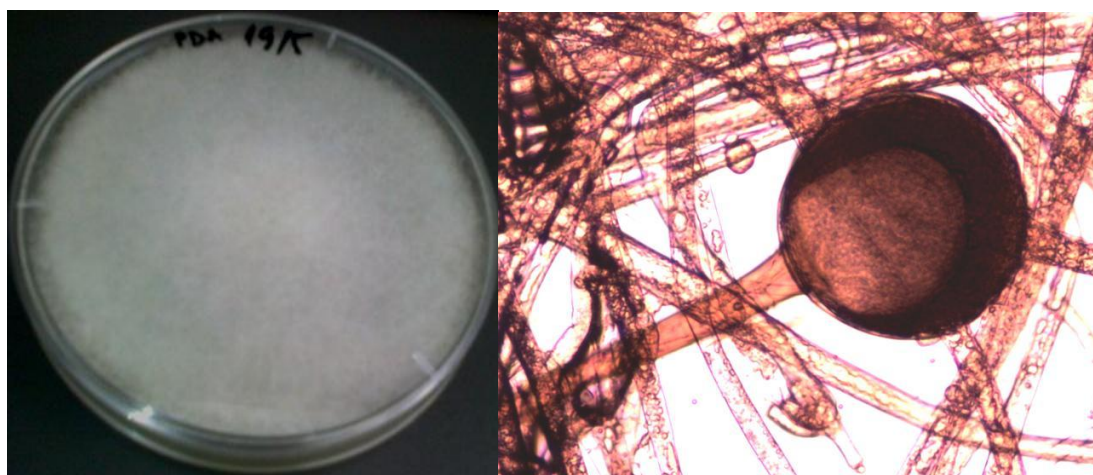
	<b>Sabouraud-ov agar</b>	<b>Sladni agar</b>	<b>Čapekov agar</b>
<b>Izgled kolonija izolata na podlozi</b>	kolonije žutozelene sa koncentričnim krugovima u kojima se smenjuju boje od centra ka obodu redosledom: u centru ispupčene žute, zatim maslinasto zelena, sledi zona sa dosta kapljica eksudata (prečnik kapljica oko 1 mm), podloga obojena u jarko žuto.	kolonije sa koncentričnim krugovima u kojima se smenjuju boje od centra ka obodu: žutozelena, pojas sa beličastim koncentrično postavljenim lopticama veličine oko 3 mm, tamno zelena, podloga obojena u jarko žuto.	formira tamno zelene kolonije koje rastu po ivici posude, gušće bliže ivici, dok je u centru veoma slab rast, ne boji podlogu
<b>Prosečan prečnik</b>	Kolonije ispunile Petri kutiju	Kolonije ispunile Petri kutiju	Kolonije ispunile Petri kutiju

Tabela 15. Morfološke karakteristike kolonija izolata 10/5 na PDA podozi

<b>Makromorfološke karakteristike</b>	<b>Izgled na PDA</b>
<b>Prosečan prečnik</b>	85 mm
<b>Boja kolonija</b>	Žutozelena, pojedinačne bele hife na površini
<b>Konzistencija</b>	Paučinasta, filamentozna
<b>Izgled ivica</b>	Filamentozne, micelija se penje uz zidove suda
<b>Boja sa donje strane Petri kutije</b>	Jarko žuta, boji i podlogu
<b>Prisustvo eksudata</b>	Nema kapljica eksudata

Mikroskopskim pregledom preparata izolata 10/5 uočene su konidiofore koje se granaju pod uglom od oko 90°. Dolazi i do sekundarnog grananja, a ogranci su jednake debljine kao i konidiofora od koje potiču i nose fialide koje su pojedinačne, negrupisane, sa nešto užom osnovom u odnosu na središnji deo. Spore su svetlo zeleno obojene, okrugle do elipsoidne, prečnika oko 4 $\mu$ m.

#### 5.3.1.5. Morfološke karakteristike izolata K19/5



Slika 12. Morfološke karakteristike kolonija izolata 19/5 iz komposta od džibre (levo) i mikrografija nativnog preparata: sporangiofora sa sporangijom (desno)

Tabela 16. Morfološke karakteristike izolata 19/5 na različitim hranljivim podlogama

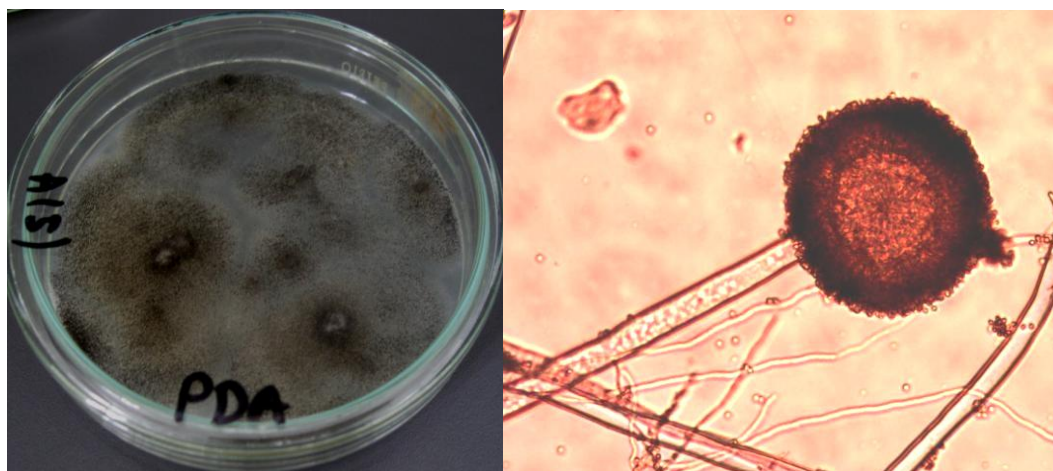
	<b>Sabouraud-ov agar</b>	<b>Sladni agar</b>	<b>Čapekov agar</b>
<b>Izgled kolonija izolata na podlozi</b>	kolonija bela, vatasta, brzo ispunjava celu Petri kutiju do poklopca kolonije su na početku skroz bele, a zatim se javljaju krupne crne sporangije po površini	kao i na Sabouraud-ovom agaru	kao i na prethodne dve podloge, osim što je na Čapekovom agaru micelija oskudnija, značajno manje gustine
<b>Prosečan prečnik</b>	Kolonije ispunile Petri kutiju	Kolonije ispunile Petri kutiju	Kolonije ispunile Petri kutiju

Tabela 17. Morfološke karakteristike kolonija izolata 19/5 na PDA podozi

<b>Makromorfološke karakteristike</b>	<b>Izgled na PDA</b>
<b>Prosečan prečnik</b>	85 mm
<b>Boja kolonija</b>	Bela sa vidljivim crnim sporangijama
<b>Konzistencija</b>	Gusta, vatasta
<b>Izgled ivica</b>	Kolonija na ivici uz zidove suda sa gušće raspoređenim sporangijama u odnosu na centralni deo
<b>Boja sa donje strane Petri kutije</b>	bela
<b>Prisustvo eksudata</b>	Nema kapljica eksudata

Mikroskopskim pregledom preparata izolata 19/5 uočene su hife diferentovane u rizoide svetlo braon boje. Sporangiofore su samostalne ili u grupama, braon obojene, glatkih zidova. Sporangije okrugle, mlađe su nešto svetlije od sporangiofora, kasnije tamno braon do crne boje, glatkih zidova. Spore tamno braon do crne boje, veličine 5-10  $\mu\text{m}$ .

## 5.3.1.6. Morfološke karakteristike izolata A/5



Slika 13. Morfološke karakteristike kolonija izolata A/5 iz komposta od džibre (levo) i mikrografija nativnog preparata: konidiofora sa fialidama i sporama (desno)

Tabela 18. Morfološke karakteristike izolata A/5 na različitim hranljivim podlogama

	<b>Sabouraud-ov agar</b>	<b>Sladni agar</b>	<b>Čapekov agar</b>
<b>Izgled kolonija izolata na podlozi</b>	ivice kolonija su znatno izdignute u odnosu na centralni deo. Obod kolonije je bele boje, u centralnom delu su vidljive crne spore	kolonije u centru su braon, a bliže ivici crne boje	beličasta supstratna micelija iznad koje su vidljive crne spore
<b>Prosečan prečnik</b>	30 mm	41 mm	20 mm

Tabela 19. Morfološke karakteristike kolonija izolata A/5 na PDA podlozi

<b>Makromorfološke karakteristike</b>	<b>Opis</b>
<b>Prosečan prečnik</b>	45 mm
<b>Boja kolonija</b>	Bela supstratna micelija sa manje crnih konidiofora u odnosu na ostale hranljive podloge
<b>Konzistencija</b>	Sitno zrnasta
<b>Izgled ivica</b>	Uz ivicu je uska zona supstratne bele tanje micelije
<b>Boja sa donje strane Petri kutije</b>	Bela
<b>Prisustvo eksudata</b>	Nema kapljica eksudata



Mikroskopskim pregledom preparata izolata A/5 uočene su providne konidiofore se završavaju orkuglom do blago elipsoidnom vezikulom svetlo braon boje. Na vezikuli se nalazi jedan red svetlo braon obojenih fialida. Spore su braon do crne obojene, prosečnog prečnika 4  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.1.7. Rast izolata pri različitim temperaturama

U odnosu na rast na ispitivanim temperaturama, između izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada ustanovljeno je postojanje razlika (Tabela 20).

Tabela 20. Rast izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada pri različitim temperaturama

Oznaka izolata	4°C	10°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C
<b>K7/1</b>	-	+/-	+	+	-	-	-	-	-
<b>K11/1</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<b>K16/2</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>10/5</b>	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>19/5</b>	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<b>A/5</b>	-	-	+	+	+	+	+	-	-

Rast odabranih izolata pri različitim temperaturama je značajan sa aspekta povezivanja prisustva određenih gljiva u kompostu sa diverzitetom gljiva u početnom materijalu, odnosno agroindustrijskom otpadu. Ispitivani izolati su pokazali različitu osetljivost prema višim temperaturama. Među izolatima koji rastu na višim temperaturama izdvajaju se izolat K16/2 iz komine grožđa i A/5 iz komposta od džibre, koji rastu na temperaturi od 45°C, a izolat K16/2 je rastao i na 50°C. Najosetljiviji su se pokazali izolati iz komine grožđa K7/1 i K11/1 koji nisu rasli na ispitivanim temperaturama višim od 30°C. Izolati 10/5 i 19/5 su rasli na 40°C, dok nije bilo rasta pri višim temperaturama. Ni jedan od izolata se nije razvijao na 4°C, dok je na 10°C samo izolat K7/1 ispoljio slab rast (Tabela 20).

Termotolerantni izolati (K16/2 i A/5) imaju više šansi za preživljavanje temperatura kompostiranja, ali u zavisnosti od primenjene tehnike kompostiranja i ostali mogu preživeti u spoljašnjim slojevima, a zatim rekolonizovati kompost (Avilés i sar., 2011).

## 5.3.1.8. Rast izolata pri različitim pH vrednostima

Izolati gljiva iz agroindustrijskog otpada su generalno otporni na niske pH vrednosti, mada postoje i određene razlike između ispitivanih izolata (Tabela 21). Minimalna pH vrednost pri kojoj se razvijaju izolati varirala je između pH 2,0 i 3,0. Izolat koji se pokazao kao najosetljiviji na niske pH vrednosti je izolat iz komine grožđa K16/2 koji je od ispitivanih pH vrednosti rastao pri pH 3,5 i višim, a pri pH 3,0 su se razvile veoma oskudne kolonije.

Tabela 21. Rast izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada pri različitim pH vrednostima

Oznaka izolata	pH 1,5	pH 2,0	pH 2,5	pH 3,0	pH 3,5	pH 5,0	pH 7,0
<b>K7/1</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>K11/1</b>	-	-	-	+	+	+	+
<b>K16/2</b>	-	-	-	+/-	+	+	+
<b>10/5</b>	-	-	+/-	+	+	+	+
<b>19/5</b>	-	-	+	+	+	+	+
<b>A/5</b>	-	+	+	+	+	+	+

Izolati koji su se pokazali kao najotporniji na niske pH vrednosti su izolat iz komine grožđa K7/1 i izolat iz komposta od džibre A/5 koji su rasli pri pH 2,0. Na pH 2,5 su rasla još dva izolata iz komposta od džibre: izolat 19/5 i izolat 10/5 koji je imao slab rast.

## 5.3.1.9. Identifikacija na osnovu morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika

Na osnovu ispitanih morfoloških i ekoloških karakteristika izvršena je identifikacija izolata gljiva i svrstani su u šest grupa (Tabela 22).

Uočeno je da dva izolata pokazuju sličnost sa vrstama roda *Penicillium* (K7/1 i K11/1).

Pretpostavka je da jedan od ovih izolata (K7/1) na osnovu morfoloških karakteristika kolonija pri rastu na specifičnim podlogama, kao i mikromorfoloških i ekoloških karakteristika pripada *Penicillium roqueforti* grupi. *P. roqueforti* je grupa od tri vrste saprofitnih gljiva, veoma rasprostranjenih u organskoj materiji koja se razlaže, u supstratima sa visokim sadržajem organskih kiselina, visokim sadržajem ugljen-dioksida i niskim sadržajem kiseonika (Samson i sar., 2000). *P. roqueforti* vrsta se

koristi se kao starter kultura za proizvodnju nekih vrsta sira, koristi se za proizvodnju aroma, a neke vrste iz *roqueforti* grupe produkuju i mikotoksine (**O'Brien i sar., 2008**).

**Raper i sar., (1968)** opisuju kolonije *P. roqueforti* na ČA agaru kao baršunaste sa prilično glatkom površinom i širokim, belim ivicama, paučinaste hife radijalno se šire po površini i neposredno ispod površine podloge. Zelena površina konidija neravnomerno pokriva hife. Na ivicama se uočavaju bele nijanse, plavo-zelene i druge nijanse zelene boje. Sa poledine se uočava zelena, plavičasto zelena do crna boja. Vrste *roqueforti* grupe međusobno je teško razlikovati, ali **O'Brien i sar. (2008)** navode nekoliko makromorfoloških karakteristika koje se mogu koristiti kao taksonomski kriterijum za razlikovanje. Među njima je rast na SA podlozi, gde se *P. roqueforti* odlikuje nešto tamnije zelenom bojom kolonija i paučinastim ivicama, dok kod *P. paneum* vrste kolonije imaju svetlije zelenu boju i celovitije ivice. Prema navedenim karakteristikama izolat K7/1 je bliži vrsti *P. paneum*, ali kako u istraživanjima nije bilo moguće uključiti referentne sojeve sa kojima bi se izvršilo poređenje, dalja identifikacija potvrđena je molekularnim metodama.

Još teže je razlikovati mikromorfološke karakteristike pojedinih vrsta *roqueforti* grupe. Najčešće su prisutne triverticilatne metličaste konidiofore, sa stipama i ramima grube teksture. Metule nose flašičaste filaide sa okruglim zelenim do plavičasto zelenim konidijama glatkih zidova i veličine 2,5 do 5 $\mu$ m (**O'Brien i sar., 2006**).

Drugi izolat roda *Penicillium* (K11/1) na osnovu morfoloških karakteristika okarakterisan je kao *P. chrysogenum*.

Vrsta *P. chrysogenum* je već dugo proznata po produkciji antibiotika penicilina. Prisutan je u različitim supstratima, zemljištu, rizosferi biljaka (**Murali i sar., 2013**), a opisan je i kao kontaminant hrane i unutrašnjeg prostora (vlažan građevinski materijal, prašina) (**Houbraken i sar., 2012**). Morfološke karakteristike kolonija su opisane od strane **Raper i Thom (1949)** - kolonije su sitne, blede plavozelene i sa starenjem postaju tamnije. Stvaraju aromatičan miris, blago voćni. Slično dobijenim rezultatima u okviru disertacije, u radu **Tiwari i sar. (2011)** kolonije *P. chrysogenum* na PDA su umerenog rasta, zelene sa belim centrom, a žute sa donje strane podloge, dok na ČA formira žute kolonije sa obe strane, a oblik spora opisuju kao elipsoidan. Izgled konidiofora (triverticilatne), stipa (glatkih zidova) filaida (flašičaste sa cilindričnim

donjim delom i krakim vratom) i konidija (okrugle, glatkih zidova) odgovara opisu datom od strane **Frisvald i Samson (2004)** za *P. chrysogenum*.

Dva izolata identifikovana su kao vrste roda *Aspergillus* (K16/2, A/5).

Izolat K16/2 je identifikovan kao *Aspergillus fumigatus*. *A. fumigatus* je veoma rasprostranjena gljiva u vazduhu, zemljištu, otpadnom organskom materijalu i u kompostu. Raste na temperaturama preko 50°C, alergen je i patogen je kod imunokompromitovanih ljudi (**Tekaia i Latge, 2005; Latge, 1999**). **Afzal i sar. (2013)** izvršili su morfološku identifikaciju *Aspergillus* vrsta iz zemljišta posmatrajući karakteristike rasta na SA i ČA agaru. Kolonije *A. fumigatus* opisuju kao plavo sive na sladnom agaru nakon sedam dana rasta na sladnom i sive na čapekovom agaru. Jedna od osnovnih karakteristika ove vrste je raspored fialida koje se nalaze na gornjoj trećini vezikule, paralelno postavljene jedna uz drugu. Konidije su raspoređene u dugim lancima, zelene, grubih zidova i prečnika 2,5-3µm (**Ellis i sar, 2007**), što je u potpunosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Izolat A/5 identifikovan je kao *Aspergillus* sp., sekcija *Nigri*.

*Aspergillus*, sekcija *Nigri* predstavlja važnu grupu gljiva u biotehnologiji, medicinskoj mikrobiologiji i mikrobiologiji hrane. **Raper i Fennell (1965)** svrstali 15 vrsta u *Aspergillus niger* grupu koja uključuje sve aspergiluse sa crnim konidijama. **Varga i sar. (2011)** izdvojili su 26 vrsta u okviru sekcije *Nigri*. Ukazali su na potrebu preciznije molekularne identifikacije vrsta sekcije imajući u vidu da neke mogu proizvoditi mikotoksine, a usled primene samo morfološke identifikacije i tek skorijih saznanja o diverzitetu vrsta u okviru sekcije se koriste u biotehnologiji, najčešće u proizvodnji limunske kiseline. U standardnim ključevima za morfološku identifikaciju uglavnom je opisana vrsta *A. niger*, koja na ČA stvara kolonije sa belom do žutom osnovom supstratnog micelijuma na kome se nalazi gust tamno braon do crn sloj loptastih vrhova konidiofora. Krupne vezikule nose radijalno postavljene fialide na kojima nastaju konidije grubih zidova i prečnika 3,5-5 µm (**Ellis i sar., 2007**), što odgovara svojstvima izolata A/5.

Izolat 10/5 na osnovu morfoloških karakteristika kolonija pri rastu na specifičnim podlogama, kao i mikromorfoloških i ekoloških karakteristika pripada rodu *Trichoderma*, sekciji *Longibrachiatum*.

Vrste roda *Trichoderma* nalaze se u komercijalnim kompostima za gajenje pečurki i predstavljaju jedan od indikatora kvaliteta komposta (**Wuest i Bengtson, 1982**). Pored toga, nalaze se u gotovo svim zemljištima, neke kolonizuju koren i poznate su po efektu na suzbijanje prouzrokovača bolesti biljaka, proizvode spektar hidrolitičkih enzima, a neke su oportunistički patogeni (**Kubicek i Harman, 1998**).

Predstavnici roda *Trichoderma* podeljeni su u sekcije, a svaku sekciju čine vrste srodnih morfoloških karakteristika. Jedna od sekcija je i *Longibrachiatum* koja se karakteriše svetlim žutozelenim pigmentom koji je vidljiv sa donje strane podloge i slabo razgranatim konidioforama na kojima je veliki broj pojedinačnih negrupisanih fialida (**Bissett, 1984; 1991**). Ove vrste rastu brzo, sporulišu i na temperaturama višim od 35°C, a na PDA stvaraju pigment koji difunduje u podlogu, dok konidiofore nastaju na oskudnoj vazdušnoj miceliji i na hifama formiranim u vidu malih pamučastih loptica (**Samuels i sar., 2012**). Glavna osa konidiofore je duga, sa oskudnijim sekundarnim grananjem i kratkim ograncima, fialide su često pojedinačne, negrupisane, konidije najčešće glatke (**Kubicek i Harman, 1998**).

Izolat 19/5 je identifikovan kao predstavnik roda *Rhizopus*, vrsta *R. oryzae*.

Većina sojeva *R. oryzae* izolovana je kao aktivna komponenta u proizvodnji tradicionalnih fermentisanih proizvoda u Indoneziji, Kini i Japanu (**Schipper, 1984**). Gljive roda *Rhizopus* mogu da sintetišu različite ekstracelularne enzime, kao što je endoglukonaza koja može da konvertuje celuloznu biomasu iz različitih otpadnih materijala (**Karmakar i Ray, 2011**), što objašnjava zastupljenost izolata u kompostu od agroindustrijskog otpada.

Klasifikacija roda *Rhizopus* na osnovu morfoloških i odgajivačkih karakteristika se zasniva na temperaturi rasta, veličini sporangija i sporangiofora, grananju rizoida i klasifikuje sve vrste u tri osnovne grupe: *stolonifer* - grupa, *R. oryzae* i *microsporus* grupa (**Schipper, 1984**). Navedene tri grupe se mogu pomoću ključa predloženog od strane **Schipper (1984)** razlikovati, dok je nešto teže međusobno razlikovati predstavnike unutar grupe. Jedan od načina razlikovanja je i određivanje maksimalne temperature rasta, koja je kod vrsta grupe *stolonifer* 36°C, dok vrste grupe *microsporus* rastu i na temperaturama višim od 45°C. Maksimalna temperatura rasta izolata 19/5 je 40°C (Tabela 20), što odgovara grupi *oryzae* koje se karakterišu dobrim rastom na 37°C, ali ne rastu na 45°C. Kolonije *R. oryzae* se odlikuju brzim rastom, prekrivaju celu

površinu agara, imaju guste paučinaste kolonije, bele, sive i žućkaste boje, sa rizoidima braon boje (Ellis, 1997). Razlikovanje pojedinih srodnih vrsta u okviru grupe je teško izvršiti na osnovu morfoloških karakteristika. Jedan od predloženih načina je i klasifikacija na osnovu metabolita, tačnije produkcije organskih kiselina (mlečne i fumarne) (Abe i sar. 2007), a savremene molekularne metode svakako doprinose preciznijoj identifikaciji.

Tabela 22. Rezultati identifikacije gljiva iz agroindustrijskog otpada zasnovani na morfološkim, odgajivačkim i ekološkim karakteristikama

Izolat	Taksonomska pripadnost
K7/1	<i>Penicillium roqueforti</i> grupa
K11/1	<i>Penicillium chrysogenum</i>
K16/2	<i>Aspergillus fumigatus</i>
10/5	<i>Trichoderma</i> sp., sekcija <i>Longibrachiatum</i>
19/5	<i>Rhizopus oryzae</i>
A/5	<i>Aspergillus</i> sp., sekcija <i>Nigri</i>



Slika 14. Kolekcija gljiva iz agroindustrijskog otpada, antagonista fitopatogenih gljiva, na kosom agaru (s leva na desno izolati K7/1, K11/1, K16/2, 10/5, A/5 i 19/5)

Izvršena identifikacija na osnovu morfoloških i ekoloških karakteristika dalje je potvrđena molekularnom identifikacijom nakon amplifikacije odgovarajućih genskih regiona i njihovog sekvencioniranja.

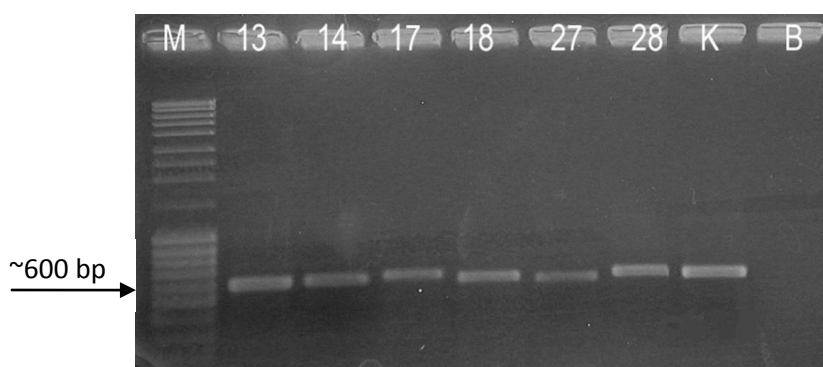
### 5.3.2. Molekularna identifikacija

Molekularne metode primenjene su radi lakše i preciznije identifikacije odabranih izolata gljiva. Pored jednostavnosti i brzine, prednost molekularnih metoda je i u mogućnosti razlikovanja morfološki sličnih izolata.

Primenjena metoda ekstrakcije DNK je bila uspešna. Kod svih šest izolata dobijena je odgovarajuća količina ukupne DNK koja je bila intaktna i pogodna za dalja ispitivanja.

Metoda lančane reakcije polimeraze praćena sekvencioniranjem dobijenih produkata i poređenjem obrađenih sekvenci sa sekvencama u GenBank bazi podataka uspešno je primenjena u identifikaciji ispitivanih izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada.

Nakon ekstrakcije DNK primenjena je amplifikacija ITS regiona. ITS region je visoko varijabilan između različitih vrsta nekih rodova, a sa druge strane konzervativan na nivou vrste, tako da je primena ITS1/ITS4 para univerzalnih prajmera predstavljala početni korak.



Slika 14. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M - Mass Ruler™ DNA Ladder, Mix (Fermentas Life Sciences, Litvanija), 13 - izolat K7/1, 14 - izolat K11/1, 17 – izolat K16/2, 18 – izolat 10/5, 27 – izolat 19/5, 28 – izolat A/5, B – negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom)

Pomoću ITS1/ITS4 para prajmera dobijeno šest ITS produkata (Slika 14) koji su poslani na sekvencioniranje. Identifikacija je izvršena višestrukim uparivanjem dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka, a konsenzus sekvence su deponovane u bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (Tabela 23).

Tabela 23. Pregled sekvenci ispitivanih izolata iz agroindustrijskog otpada dobijenih tokom ispitivanja

Oznaka izolata	Vrsta/rod	GenBank pristupni broj		
		ITS	TEF-1 $\alpha$	$\beta$ -tubulin
K7/1	<i>Penicillium paneum</i>	KF267253	/	/
K11/1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KF413577	/	KF516018
K16/2	<i>Aspergillus fumigates</i>	KF267254	/	/
10/5	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	KF267252	KF267251	/
19/5	<i>Rhizopus oryzae</i>	KF986610	/	/
A/5	<i>Aspergillus</i> sp.	KF991390	/	KJ469441

BLAST analizom sekvenci amplifikovanih produkata tri izolata su uspešno identifikovana do nivoa vrste i to izolat K7/1 kao *Penicillium paneum*, K16/2 kao *Aspergillus fumigatus* i 19/5 kao *Rhizopus oryzae*. Na taj način uspešno je izvršena njihova molekularna identifikacija, dok je u cilju identifikacije ostalih izolata primenjeno sekvenciranje dodatnih regiona (TEF-1 $\alpha$  region u slučaju izolata 10/5 i  $\beta$ -tubulin region kod izolata K11/1 i A/5).

#### 5.3.2.1. Molekularna identifikacija izolata K7/1

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije ITS regiona genoma izolata K7/1 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata K7/1, dužine 523 bp pokazala je da izolat K7/1 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti, 99-100% i 99-100% pokrivenosti sa 30 izolata vrste *Penicillium paneum*, jednim izolatom *Penicillium aurantiogriseum* i jednim izolatom *Penicillium venetum*.

Navedeni izolati potiču iz različitih sredina kao što su: morski sediment (HQ703579.1), skladišteni plodovi kivija (JQ422609.1, JQ422610.1), tradicionalni fermentisani napici iz Kine (JN226992.1, JN226989.1, JN226983.1, JN226928.1), Fuji jabuka iz Kine (JX241662.1), silaža (GU936118.1), Jezera Antarktika (HQ533839), bioaerosol u farmi svinja (FJ613112.1), neki su kontaminanti u arheološkim nalazištima u Japanu (AB479311.1, AB479312), dok su preostali izolati nepoznatog porekla.

Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanjem morfoloških karakteristika izolata iz komine grožđa K7/1 koje odgovaraju vrsti *P. paneum*.



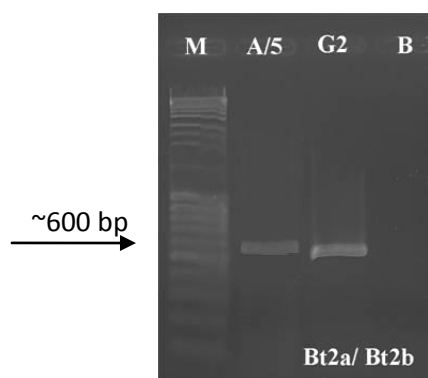
*Penicillium roqueforti* grupa je reklasifikovana nedavno na osnovu molekularnih karakteristika i profila sekundarnih metabolita, a *P. paneum* je definisan kao nova vrsta u okviru ove grupe (Boysen i sar., 1996; Samson i sar., 2004).

### 5.3.2.2. Molekularna identifikacija izolata K11/1

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije ITS regiona genoma izolata K11/1 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata K11/1, dužine 515 bp je pokazala da izolat G2 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100%) sa 46 izolata iz GenBank baze podataka koji pripadaju različitim vrstama *Penicillium* sp. i to: 19 izolata *Penicillium* sp., 13 izolata *Penicillium chrysogenum*, šest izolata *Penicillium commune*, četiri izolata *Penicillium dipodomyicola*, dva izolata *Penicillium citrinum*, jednim izolatom *Penicillium rubens* i jednim izolatom *Penicillium vinaceum* koji potiču iz različitih sredina.

Kako se pokazalo da sekvence ITS regiona nisu dovoljno diskriminatorne da bi se izolat K11/1 identifikovao do nivoa vrste, primenjeno je umnožavanje  $\beta$ -tubulin regiona, sekvencioniranje dobijenog produkta i višestruko poređenje obrađene sekvence sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka.



Slika 15. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera Bt2a/Bt2b. Kolone: M - Mass Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder, Mix (Fermentas Life Sciences, Litvanija), A/5 – izolat A/5, G2 – izolat K11/1, B- negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom)

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije  $\beta$ -tubulin regiona genoma izolata K11/1 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence dobijenog produkta dužine 439 bp pokazala je da izolat K11/1 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (99-100%) uz 99-100% pokrivenosti sa 19 izolata vrste *Penicillium chrysogenum* koji potiču iz različitih delova sveta, a 100% identičnosti sa pet izolata iste vrste, među kojima su KF225098.1, KF225057.1, KF225056.1 i EU128571.1, EU128560.1 nepoznatog porekla.

Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima ispitivanja morfoloških karakteristika izolata iz komine grožđa K11/1.

*P. chrysogenum* nalazi se u sekciji *Chrysogena* roda *Penicillium*, a vrsta prema svojim morfološkim, ekološkim, odgajivačkim karakteristikama kao i sastavu ekstralita i  $\beta$ -tubulin sekvencama, pokazuje najveću srodnost sa *P. dipodomys*, *P. flavigenum* i *P. nalgiovense* (Fisvald i Samson, 2004).

#### 5.3.2.3. Molekularna identifikacija izolata K16/2

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije ITS regiona genoma izolata K16/2 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata K16/2, dužine 599 bp pokazala je da izolat K16/2 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100%) uz 99-100% pokrivenosti sa 15 izolata vrste *Aspergillus fumigatus* dostupnih u GenBank bazi podataka koji potiču iz različitih delova sveta, od navedenog broja 100% nukleotidne identičnosti sa šest izolata vrste *A. fumigatus* čiji su GenBank pristupni brojevi: JQ966581.1, HE864321.1, GU594751.1, GU594751.1, EU664468.1 i EU664467.1. Među izolatima se nalaze klinički izolati (JQ966581.1, HE864321.1), ali i izolati iz zemljišta (EU664468.1 i EU664467.1), dok su preostala dva nepoznatog porekla.

Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima ispitivanja morfoloških karakteristika izolata iz komine grožđa K16/2.

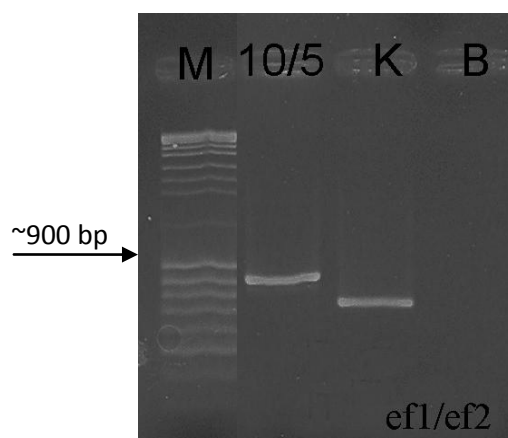
Molekularne metode omogućile su razdvajanje *A. fumigatus* na više srodnih vrsta sekcije *Fumigati*. Izdvojene su posebne vrste *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis* i *A. novofumigatus*. Vrsta *A. fumigatus* se pored razlika u sekvencama  $\beta$ -tubulin regiona,

razlikuje od drugih vrsta iz sekcije *Fumigati* i prema rezultatima analize ekstroлита jer proizvodi čitav niz metabolita koji nisu detektovani kod ostale tri vrste, kao što su gliotoksin, pseurotin, verukologen, fumigalin i drugi (Hong i sar., 2005).

#### 5.3.2.4. Molekularna identifikacija izolata 10/5

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije ITS regiona genoma izolata 10/5 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata 10/5, dužine 578 bp pokazala je da izolat 10/5 ima najviši stepen nukleotidne indetičnosti identičnosti (99-100%) sa 96 izolata koji pripadaju različitim vrstama *Trichoderma* sp. i *Hypocrea* sp. i potiču iz različitih sredina, dostupnih u GenBank bazi podataka. Od navedenih izolata, devet su izolata *Trichoderma* sp., jedan izolat *Hypocrea* sp., 69 izolata *Trichoderma longibrachiatum*, tri izolata vrste *Hypocrea orientalis*, po dva izolata vrsta: *Trichoderma viride*, *Hypocrea koningii*, *Hypocrea pseudokoningii*, *Hypocrea rufa*, *Trichoderma harzianum*, po jedan izolat vrsta *Hypocrea jecorina* i *Hypocrea lixii*.



Slika 16. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ef1/ef2. Kolone: M - Mass Ruler™ DNA Ladder, Mix (Fermentas Life Sciences, Litvanija), 10/5 – izolat 10/5, K – TEF-1 $\alpha$  fragment izolata 3-13 *Pinus-Fusarium* sp., B- negativna kontrola (PCR smeša sa RNase-free vodom)

Identifikacija izolata 10/5 do nivoa vrste je završena PCR metodom uz pomoć prajmera ef1/ef2, koji omogućavaju umnožavanje TEF-1 $\alpha$  regiona, sekvenciranjem dobijenog produkta i višestrukim poređenjem dobijene sekvence sa sekvencama u GenBank bazi podataka. Nakon ekstrakcije DNK i PCR reakcije vizuelizacijom na

agaroznom gelu je potvrđeno da je dobijen fragment očekivane dužine oko 900 bp koji je sekvencioniran. BLAST analiza obrađene sekvence produkta dužine 760 bp pokazala je da izolat 10/5 ima najviši stepen sličnosti (99-100%) sa 15 izolata vrste *Trichoderma longibrachiatum*. Sekvenca izolata je pokazala 100% sličnosti sa sekvencama 4 izolata vrste *T. longibrachiatum* dostupne u GenBank bazi podataka: izolatom iz mora DQ125467.1. izolatom iz zemljišta u Kanadi EU338335.1, izolatom iz rizosfere koji je opisam kao antagonista *Fusarium sambucinum* EU401627 (Ru i Di, 2012) i izolatom iz supstrata za gajenje pečuraka EU918159.1.

Prva molekularna filogenetska analiza sekcije *Longibrachiatum* (Kuhls i sar., 1997) je bazirana na ITS regionu rRNK. Iako se ovaj region smatra za univerzalni *barcode* lokusom za gljive, nije moguće razdvojiti sve srodne vrste u mnogim rodovima filamentoznih gljiva uključujući i rod *Trichoderma* (Gazis i sar., 2011). Druzhinina i sar. (2012) izvršili su filogenetsku analizu sekcije *Longibrachiatum* pomoću sekvenci više gena uključujući i TEF-1 $\alpha$  i definisali 26 vrsta sekcije.

#### 5.3.2.5. Molekularna identifikacija izolata 19/5

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije ITS regiona genoma izolata 19/5 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata 19/5, dužine 551 bp pokazala je da izolat 19/5 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100%) sa 26 izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, od kojih je jedan izolat *Rhizopus* sp., 22 izolata vrste *Rhizopus oryzae*, dva izolata *Amylomyces rouxii* i jedan izolat *Rhizopus stolonifer*. Među navedenim izolatima nalaze se gljive izolovane iz zemljišta, tradicionalnih azijskih fermentisanih proizvoda, klinički izolati i izolati nepoznatog porekla.

Dobijeni rezultati se poklapaju sa identifikacijom izolata na osnovu morfoloških, ekoloških i odgajivačkih karakteristika.

Iako se klasifikacija prema Schipper (1984) prema kojoj se rod *Rhizopus* deli na grupu *stolonifer*, grupu *microsporus* i *R. oryzae*, smatra za standardnu klasifikaciju vrsta u okviru roda *Rhizopus*, primenom molekularnih metoda (pomoću ITS, Tef-1 $\alpha$ , aktin i laktat dehidrogenaza B gena) kao i na osnovu razlika u produkciji kiselina izvršena je reklasifikacija kojom je izdvojena vrsta srodna *R. oryzae* – *R. delmar* (Abe i sar., 2007).

#### 5.3.2.6. Molekularna identifikacija izolata A/5

Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije ITS regiona genoma izolata A/5 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence ITS produkta izolata A/5, dužine 586 bp pokazala je da izolat A/5 ima najviši stepen nukleotidne identičnosti (100%) sa 31 sekvencom izolata dostupnih u GenBank bazi podataka od kojih je tri izolata *Aspergillus* sp., 14 izolata vrste *Aspergillus tubigensis*, 12 izolata vrste *Aspergillus niger*, dva izolata vrste *Aspergillus awamori*. Među gljivama sa identičnom ITS sekvencom nalaze se izolati iz zemljišta, fermentisanog crnog čaja, žitarica, klinički izolati i izolati nepoznatog porekla.

Sve vrste sa kojima izolat pokazuje visok stepen sličnosti na osnovu primenjene molekularne metode pripadaju rodu *Aspergillus*, sekciji *Nigri*, tako da je dobijeni rezultat identifikacije izolata iz komposta od džibre A/5 u skladu sa rezultatima morfološke identifikacije.

Kako se pokazalo da sekvence ITS regiona nisu dovoljno diskriminatorne da bi se izolat A/5 identifikovao do nivoa vrste, u pokušaju da se postigne preciznija identifikacija primenjeno je umnožavanje  $\beta$ -tubulin regiona, sekvencioniranje dobijenog produkta i višestruko poređenje obrađene sekvence sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. Elektroforetska analiza produkta dobijenog nakon amplifikacije  $\beta$ -tubulin regiona genoma izolata A/5 pokazala je da je dobijen fragment očekivane dužine od oko 600 bp. Reakcija je bila bez nespecifičnih bendova.

BLAST analiza sekvence dobijenog produkta dužine 524 bp je pokazao najviši stepen nukleotidne identičnosti (99%) sa 12 sekvenci izolata iz baze podataka od kojih je pet izolata vrste *Aspergillus foetidus*, tri izolata vrste *Aspergillus piperis*, dva izolata vrste *Aspergillus acidus*, 1 izolatom vrste *Aspergillus tubigensis* i jednim izolatom vrste *Aspergillus kawachii*. Izolati potiču iz fermentisanog crnog čaja ili su nepoznatog porekla.

Izolati iz GenBank baze podataka sa kojima se poklapa sekvenca  $\beta$ -tubulin regiona izolata A/5 pripadaju rodu *Aspergillus*, sekciji *Nigri*, ali je u za preciznije razlikovanje potrebno izvršiti umnožavanje i sekvencioniranje dodatnih regiona genoma.

*Aspergillus* sekcija *Nigri* (Gams i sar., 1985) predstavlja vaznu grupu gljiva u biotehnologiji, medicinskoj mikrobiologiji prehranenoj tehnologiji. S obzirom na to da ih je veoma teško razlikovati na osnovu fenotipskih karakteristika, veliku ulogu u njihovoj identifikaciji imaju molekularne metode. Varga i sar. (2011) navode da sekcija *Nigri* sadrži ukupno 26 srodnih vrsta.

Svi rezultati molekularne identifikacije gljiva izolovanih iz agroindustrijskog otpada su bili u skladu sa identifikacijom izolata zasnovanom na morfološkim i ekološkim karakteristikama. U slučaju izolata K11/1, K16/2 i 19/5 molekularna identifikacija potvrdila je pretpostavke o pripadnosti odgovarajućim vrstama zasnovane na rezultatima ispitivanja morfoloških i ekoloških karakteristika, dok je u slučaju izolata K7/1 i 10/5 na osnovu molekularnih metoda izvršena preciznija identifikacija do nivoa vrste (Tabela 23). Iako su rezultati molekularne identifikacije potvrdili rezultat identifikacije soja A/5 na osnovu morfoloških, odgajivačkih i ekoloških karakteristika, potrebna su dalja istraživanja kako bi se odredila pripadnost vrsti u okviru roda *Aspergillus*, sekcija *Nigri*.

Izolat K7/1 koji je pokazao morfološku sličnost sa *Penicillium roqueforti* grupom je identifikovan kao *P. paneum*, a izolat 10/5 za koji je pretpostavljeno da pripada rodu *Trichoderma* sekciji *Longibrachiatum* potvrđena je pripadnost vrsti *T. longibrachiatum*. Rezultat ove faze su identifikovani sojevi rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* koji su dalje korišćeni za nastavak istraživanja.

#### 5.3.2.7. Potencijal selektovanih i identifikovanih vrsta za korišćenje u biološkoj kontroli

U postupku molekularne identifikacije izolati koji su odabrani kao antagonisti fitopatogena su identifikovani kao *P. paneum*, *P. chrysogenum*, *A. fumigatus*, *T. longibrachiatum*, *R. oryzae* i *Aspergillus* sp. Na osnovu do sada objavljenih radova o ovim vrstama može se steći uvid u potencijal njihove upotrebe u biološkoj kontroli.

Vrsta *P. paneum* je od skoro izdvojena iz *roqueforti* grupe, stoga do nema većeg broja radova o ovoj vrsti. Podatak prisustvu *P. paneum* u komini od grožđa je od značaja sa bezbedonosnog aspekta. *P. paneum* stvara sekundarne metabolite kao što je patulin koji su štetni po zdravlje ljudi i životinja, a detektovani su kod sojeva izolovanih iz silaže i žitarica (O'Brien i sar., 2006). Podaci iz literature mogu dati pretpostavke koje se odnose na mehanizme antagonizma ove gljive prema fitopatogenim gljivama. *P.*

*paneum* u gustim suspenzijama inhibira sopstvenu sporulaciju usled delovanja isparljivog inhibitora koji sama gljiva produkuje (1-okten-3-ol) (Chitarra i sar., 2004). Autori navode da ovo jedinjenje može imati uticaja i na rast drugih gljiva iz različitih rodova i ističu potrebu za istraživanjem u smeru primene navedenog metabolita u prevenciji kvarenja hrane i suzbijanja bolesti biljaka.

Antagonizam *P. chrysogenum* prema *F. oxysporum* je potvrđen u radu Youssff (1960), ali je mehanizam ostao nepoznat. Pojava bolesti paradajza uzrokovana ovim patogenom bila je značajno redukovana primenom filtrata tečne kulture *P. chrysogenum*, a kako je u *in vitro* ogledima dokazan antagonizam dve gljive, smatra se da antifungalne komponente filtrata doprinose ovom efektu.

Upotreba suve micelije *P. chrysogenum*, sporednog produkta iz farmaceutske industrije postignuto je suzbijanje uvenuća dinje izazvane *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, ali se ovakav efekat pripisuje indukciji rezistencije, jer je ekstrakt micelije *in vitro* bio bez ikakvog efekta na rast *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (Dong i Cohen, 2001). Jednak efekat je imao dodatak suve micelije *P. chrysogenum* na indukciju rezistencije Bt-transgenog pamuka prema *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* i *Verticillium dahliae* (Chen i sar., 2006).

Antibakterijski metaboliti produkovani od strane *P. chrysogenum* su već dugo poznati, ali u poslednje vreme istraživanja su usmerena i na njegovu antifungalnu aktivnost. Niskomolekularni protein PAF (*Penicillium antifungal protein*), bogat cisteinom i lizinom koji stvara *P. chrysogenum* ispoljava antifungalnu aktivnost koja je potvrđena prema više filamentoznih gljiva *in vitro*, uključujući i biljne patogene kao što je *B. cinerea* (Marx i sar., 2008; Kaiserer i sar., 2003). Pored PAF proteina niske molekulske mase, sojevi *P. chrysogenum* produkuju i glukooksidazu koja takođe ima antifungalni efekat i značajan je mehanizam u interakciji između gljiva. Pod uticajem ovog enzima dolazi do oslobađanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji uzrokuje oksidativni stres (Leiter i sar., 2004).

Rezultati selekcije antagonista fitopatogenih gljiva prikazani u poglavlju 5.2. potvrđuju antifungalni efekat *P. chrysogenum*.

*Aspergillus fumigatus* je jedna od najčešćih gljiva kontaminenata životne sredine. Jedna je od najzastupljenijih vrsta u agroindustrijskom otpadu i kompostu, a opisan je i kao oportunistički humani patogen i alergen (Chaudhary i Marr, 2011) pa

stoga treba imati u vidu da je njegovo prisustvo u otpadu značajno sa aspekta predviđanja bezbedonosnih mera tokom kompostiranja. **Rajavaram i sar. (2010)** su ispitivali prisustvo termofilnih gljiva u različitom otpadnom materijalu i među dobijenim rezultatima navode prisustvo vrste *A. fumigatus* u gotovo svakom od ispitivanih uzoraka.

Prisustvo *A. fumigatus* u komini grožđa nije neočekivano s obzirom da je u pitanju veoma rasprostranjena vrsta koja ima mogućnost korišćenja različitih izvora ugljenika i sposobnost da preživi uslove kompostiranja (**Tekaia i Latge, 2005**). Zastupljenost ove vrste u komini grožđa je već potvrđena na osnovu sekvencioniranja ITS regiona u radu **Ntougias i sar. (2010)**.

*A. fumigatus* je u manjoj meri izučavan sa aspekta interakcija sa drugim gljivama, iako novija istraživanja ukazuju neki metaboliti ove vrste (fumagilin, helvolinska i 1,2-dihidrohovelinska kiselina) pokazuju antifungalno dejstvo prema lipofilnim kvascima (**Kang i sar., 2013**). Rezultat koji potvrđuje prisustvo *A. fumigatus* u otpadu je u skladu sa literaturom, a antagonizam ove vrste prema fitopatogenima doprinosi objašnjenju složenih procesa koji se dešavaju u okviru zajednice gljiva u agroekosistemu.

Selektovani izolati iz komine grožđa su identifikovani kao: *P. paneum*, *P. chrysogenum* i *A. fumigatus*, a većina izolata iz polazne kolekcije takođe pripada ovim rodovima. Rodovi gljiva *Aspergillus* i *Penicillium* su ekološki, ekonomski i medicinski važni rodovi (**Asan, 2004**). Diverzitet gljiva u komini grožđa je objavljen u radu **Ntougias i sar. (2010)**, dok su diverzitet gljiva u kompostu i kompostnom ličatu komine grožđa opisali **Santos i sar. (2008)**. Značajno prisustvo *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta koje je potvrđeno u navedenim radovima je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja u okviru disertacije, a smatra se da je posledica hemijskog sastava komine (veća količina šećera i nizak sadržaj celuloze) (**Santos i sar., 2008; Diáñez i sar., 2007**).

Rod *Trichoderma* je ekonomski značajan, neke vrste ovog roda se koriste u poljoprivredi kao biopseticidi i biofertilizatori a rod *T. reesei* se koristi i za proizvodnju bioenergije (**Druzhinina, 2011**).

*T. longibrachiatum* se pominje u literaturi kao patogen kod imunokompromitovanih ljudi (**Kredics i sar., 2004**). Identifikovana je kao uzročnik većine mikoza koje su izazvale vrste roda *Trichoderma*. Ujedno je veoma



rasprostranjena u različitim uzorcima iz životne sredine širom sveta, ali veza između kliničkih i divljih sojeva još uvek nije razjašnjena (**Druzhinina i sar., 2008**). *T. longibrachiatum* uz druge vrste roda *Trichoderma* pominje i kao kontaminant u odgajalištima pečurki (**Castle i sar., 1998**).

I pored navedenih štetnih efekata, zastupljena su istraživanja koja ukazuju na potencijal primene ove vrste u biotehnologiji, bioremedijaciji i suzbijanju biljnih patogena. Potencijal vrste za primenu u biotehnologiji je u produkciji različitih hidrolitičkih enzima kao što su hitinaze (**Kovacs i sar., 2004**), lipaze (**Gochev i sar., 2012**), celulaze i hemicelulaze (**Royer i Nakas, 1989**). **Rosales i sar. (2012)** ukazuju na mogućnosti primene *T. longibrachiatum* izolovane iz otpada zagađenog policikličnim aromatičnim jedinjenjima (PAH) i teškim metalima i identifikovane na osnovu sekvence ITS regiona u degradaciji PAH-ova.

Rod *Trichoderma* je poznat po sojevima koji su antagonisti fitopatogenim gljivama. Među vrstama koji ispoljavaju ovo svojstvo nalazi se i *T. longibrachiatum*. *T. longibrachiatum* pokazala je antagonizam prema više fitopatogenih gljiva među kojima su: *Botrytis fabae* (**Sahile i sar., 2011; Bendahmane, 2012**), *B. cinerea* (**Bendahmane, 2012**), *Fusarium sambucinum* (**Ru i Di, 2012**), *Rhizoctonia solani* (**Sreenivasaprasad i Manibhushanrao, 1994**) i *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (**Meraj-ul-Haque and Nandkar, 2012**). U radu **Mustafa i sar., (2009)** *T. longibrachiatum* je u dual testu ispoljila antagonizam prema *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *R. solani*, *F. solani*, *Botrydipodia theobronae*, *Alternaria alternata*, a u najvećoj meri (za oko 50%) inhibiran je rast *F. oxysporum* i *A. alternata*. Ispitana je aktivnost celulaza *T. longibrachiatum* i efekat prema *Pythium ultimum*, kao i mogućnost hipercelulolitičkih transformanata *T. longirachiatum* na suzbijanje bolesti krastavca uzrokovane *P. ultimum* (**Migheli i sar., 1994**).

Navodi iz literature o antagonizmu koji ova vrsta ispoljava prema fitopatogenim, kao i korisnim gljivama su u skladu sa odabirom izolata 10/5 kao antagoniste prema *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum*.

*R. oryzae* je rasprostranjen u različitim materijalima, između ostalih i u kompostu (**Anastasi, 2005**). Nalazi upotrebu u biotehnologiji, prevashodno u produkciji hidrolitičkih enzima i organskih kiselina. Izazivač je truleži plodova voća i povrća nakon berbe (**Snowdon, 2010**), a dobro se razvija i u agroindustrijskom otpadu koji se

pokazao kao pogodna sirovina za razvoj *R. oryzae* u cilju produkcije mlečne kiseline (Saito i sar., 2004), fumarne kiseline i hitina (Liao, 2005) kao i hidrolitičkih enzima kao što su celulaze (Mukherjee i sar., 2011).

Produkcija enzima, kiselina kao i brz rast *R. oryzae* koji omogućava kompeticiju sa fitopatogenim gljivama mogu dati preliminarno objašnjenje mehanizma antagonizma koji je ispoljen tokom selekcije izolata 19/5, ali bi navedene pretpostavke trebalo potvrditi daljim istraživanjima.

Sekcija *Nigri* je svakako sekcija koja ima značajnu upotrebu u biotehnologiji usled produkcije enzima (amilaze, lipaze) i organskih kiselina (limunska, glukonska) (Varga i sar., 2000). Kandidati su za genetsku manipulaciju u biotehnologiji, imajući u vidu da *A. niger* ima status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) od strane FDA (Food and Drug Administration, USA).

Izolat A/5 se kao i neki predstavnici sekcije *Nigri* karakteriše stvaranjem kiselina, imajući u vidu da je pH filtrata tečne kulture nakon sedam dana gajenja iznosila 3.65 što može biti jedan od mehanizama antagonizma soja prema biljnim patogenima.

Može se reći da vrste antagonista iz agroindustrijskog otpada poseduju različit potencijal kada je u pitanju suzbijanje biljnih patogena. U nekim slučajevima se doprinos daljeg istraživanja antagonizma ogleda u fundamentalnom objašnjenju interakcija koje se dešavaju u prirodi, dok neke vrste imaju potencijal i za praktičnu primenu, naročito u smeru proizvodnje antifungalnih metabolita.

### 5.3.3. Enzimska karakterizacija gljiva iz agroindustrijskog otpada

Uz identifikaciju vrsta u sklopu istraživanja zajednice gljiva, neophodno je izvršiti funkcionalnu analizu kako bi se bolje razumeli procesi u kojima gljive učestvuju i razmotrile mogućnosti njihove primene. Taksonomski diverzitet gljiva uglavnom se odražava i na raznovrstan metabolički diverzitet (**Anastasi i sar., 2004**). U funkcionalnu karakterizaciju spada i detekcija enzimske aktivnosti. Imajući u vidu ulogu koji filamentozne gljive imaju u transformacijama tokom kompostiranja agroindustrijskog otpada, očekivano je da se među izolatima dobijenim iz takvih sredina nađu sojevi sa visokom produkcijom hidrolitičkih enzima. Iz agroindustrijskog otpada je izolovano više gljiva koje karakteriše produkcija hidrolitičkih enzima među kojima su predstavnici rodova *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* i *Alternaria* (**Al-Mahrđi i sar., 2012**).

Većina brzih testova enzimske aktivnosti detektuje kataboličku aktivnost mikroorganizama, dok je samo nekoliko pogodno za detekciju puteva sinteze (**Bascomb i Manafi, 1998**). API ZYM sistem je semikvantitativna metoda dizajnirana za detekciju 19 enzimskih reakcija. Koristi se u taksonomiji, prevashodno različitih grupa bakterija, ali i eukariotskih organizama među kojima su gljive (**Estrada i sar., 1997**), jer može detektovati enzimsku aktivnost u različitim tečnostima i suspenzijama pa i filtratima kultura gljiva.

Rezultati enzimske karakterizacije filtrata tečnih kultura izolata odgajenih na PDB medijumu pomoću API ZYM-a pokazali su da među ispitivanim izolatima postoje određene sličnosti, ali i razlike u enzimskoj aktivnosti.

U slučaju kisele fosfataze i Naftol-AS-BI-fosfohidrolaze, reakcija je bila pozitivna kod svih ispitivanih izolata, dok ni jedan izolat nije imao pozitivnu reakciju na  $\beta$ -glukuronidazu,  $\alpha$ -manozidazu i  $\alpha$ -fukozidazu. Aktivnosti ostalih enzima razlikovale su se zavisno od ispitivanog izolata (Tabela 24).

Tabela 24. Rezultati ispitivanja enzimske aktivnosti izolata pomoću API ZYM-a

	<b>K7/1</b>	<b>K11/1</b>	<b>K16/2</b>	<b>10/5</b>	<b>19/5</b>	<b>A/5</b>
<b>Alkalna fosfataza</b>	-	+++	+++	-	+++	+++
<b>Esteraza (C4)</b>	+++	+++	+++	++	-	-
<b>Esteraza lipaza (C8)</b>	++	+++	-	++	++	-
<b>Lipaza (C14)</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Leucin arilamidaza</b>	++	+++	-	++	-	-
<b>Valin arilamidaza</b>	-	+++	-	+	+	-
<b>Cistin arilamidaza</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Trispin</b>	-	-	-	+	++	-
<b><math>\alpha</math>-himotripsin</b>	-	-	+	-	+	-
<b>Kisela fosfataza</b>	+++	+++	+++	++	+++	+++
<b>Naftol-AS-BI-fosfohidrolaza</b>	++	+++	+++	++	+++	+++
<b><math>\alpha</math>-galaktozidaza</b>	-	-	+++	-	-	+++
<b><math>\beta</math>-galaktozidaza</b>	-	-	-	+	-	+
<b><math>\beta</math>-glukuronidaza</b>	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-glukozidaza</b>	-	++	-	-	-	-
<b><math>\beta</math>-glukozidaza</b>	-	-	-	++	++	-
<b>N-acetil-<math>\beta</math>-glukozaminidaza</b>	-	+	+++	++	-	++
<b><math>\alpha</math>-manozidaza</b>	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-fukozidaza</b>	-	-	-	-	-	-

Jedan od mehanizama antagonizma gljiva iz agroindustrijskog otpada prema fitopatogenim gljivama može biti i delovanje hidrolitičkih enzima, kao što je N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaza, koja učestvuje u degradaciji hitina (**Parham i Deng, 2000**). Stoga je od posebnog interesa bila aktivnost N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze koja je detektovana kod izolata K11/1, K16/2, 10/5 i A/5, a najjaču enzimsku aktivnost pokazao je izolat K16/2. Izolat sa najjačom aktivnošću N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze identifikovan je kao *A. fumigatus*, a dobijeni rezultat je u skladu sa istraživanjima koja potvrđuju produkciju ovog enzima od strane *A. fumigatus* (**Escott i sar., 1998**).



Slika 16. API ZYM test nakon inkubacije sa tečnim kulturama izolata: K7/1, K11/1, K16/2, 10/5, 19/5 i A/5 (odozgo na dole).

Pored N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze od značaja je i produkcija drugih hidrolitičkih enzima, kao što je  $\beta$ -glukozidaza koja učestvuje u degradaciji ćelijskog zida gljiva (Mucha i sar., 2006), a čija aktivnost je detektovana u filtratu tečnih kultura izolata 10/5 i 19/5. Izolat 19/5 je identifikovan na osnovu morfoloških, ekoloških i molekularnih karakteristika kao *R. oryzae*. Enzimska karakterizacija izolata potvrđuje podatke iz literature koji ukazuju da su sojevi ove vrste poznati po produkciji  $\beta$ -glukozidaze (Takii i sar., 2005; Karmakar i Ray, 2011). Izolat 10/5 identifikovan je kao *T. longirachiatum*. Sandhu i Sidhu (1985) su ispitali produkciju  $\beta$ -glukozidaze od strane soja *T. longirachiatum* i uticaj različitih faktora na enzimsku aktivnost, među njima i uticaj glukoze prisutne u medijumu. Dok se u prisustvu celuloznog izvora ugljenika 70% stvorene  $\beta$ -glukozidaze nalazi u filtratu tečne kulture, u prisustvu glukoze se taj udeo smanjuje na 30%.

Većina enzima kojima su odgovorni za hidrolizu složenih organskih jedinjenja su inducibilni enzimi. Stvaraju se u prisustvu određenog supstrata što uglavnom

predstavlja vid adaptacije mikroorganizama na raspoložive izvore esencijalnih nutrijenata (**Roberts i sar., 1995**). Imajuću u vidu da su predstavljeni rezultati u okviru ove faze istraživanja zasnovani na gajenju izolata na PDB podlozi, dobijeni podaci samo ukazuju na potencijal produkcije enzima od strane izolata koji dolazi do punog izražaja podešavanjem uslova gajenja i dodatkom određenog izvora ugljenika u hranljivu podlogu.

#### **5.4. Uticaj metabolita izolata gljiva iz agroindustrijskog otpada na rast fitopatogena**

Rast fitopatogenih gljiva kontroliše se primenom različitih sintetičkih fungicida, ali njihova upotreba ima sve više ograničenja, prvenstveno zbog negativnog uticaja fungicida na životnu sredinu i zdravlje ljudi ali i pojave rezistentnih sojeva fitopatogenih gljiva. Postoji potreba za novim prirodnim fungicidima i uspešno se poslednjih godina intenzivno istražuju različite metode biološke kontrole (**Montealegre i sar. 2003; Li i sar., 2012**). Na taj način upotreba prirodnih fungicida postaje deo integralnog pristupa upravljanju suzbijanju prouzrokovača bolesti u poljoprivredi i širom sveta.

Industrija hrane, poljoprivreda i farmaceutska industrija istražuju sposobnosti biosinteze sekundarnih antimikrobnih metabolita, najčešće filamentoznih gljiva, što često daje uspešne rezultate zahvaljujući njihovoj metaboličkoj raznovrsnosti. Veliki broj ekstrakata gljiva i/ili ekstracelularnih produkata poseduje antimikrobnu aktivnost, što se uglavnom odnosi na *Aspergillus* i *Penicillium* vrste (**Lopes i sar., 2013**). Gljive iz rodova *Penicillium* i *Aspergillus* poznate su po produkciji antibiotika (**Diáñez i sar., 2007**) i hidrolitičkih enzima (**Khokhar i sar., 2011**), pa se može očekivati da različiti metaboliti prisutni u filtratima tečnih kultura ovih gljiva mogu uticati na suzbijanje rasta fitopatogena. Na osnovu rezultata dosadašnjih faza istraživanja u okviru ove disertacije, izdvojeno je šest izolata prema svom delovanju na tri ispitivana fitopatogena, od kojih četiri pripadaju pomenutim rodovima poznatim po produkciji antimikrobnih metabolita.

Antagonizam izolata iz agroindustrijskog otpada prema fitopatogenim vrstama posmatran je i kroz uticaj sirovog filtrata tečne kulture izolata na rast fitopatogenih izolata, a na taj način se zapravo posmatra uticaj ekstracelularnih metabolita. Pri ispitivanju uticaja filtrata tečne kulture izolata iz agrondistrijskog otpada na rast

fitopatogene vrste razmatrano je da li se i kako inhibitorni efekat menja pri primeni različitih koncentracija i različitih načina sterilizacije. Ispitivanje uticaja dva načina sterilizacije, autoklaviranjem i mikrobiološkom filtracijom, doprinosi objašnjenju prirode metabolita, odnosno utvrđuje prisustvo termostabilnih aktivnih materija.

Stvaranje određenih ekstracelularnih metabolita koje gljive mogu da produkuju može biti indukovano različitim faktorima. Cilj ove faze je bio i da se utvrdi uticaj filtrata dvojnih tečnih kultura izolata i određene fitopatogene vrste na inhibiciju rasta iste te fitopatogene vrste. Na taj način može se steći uvid u indukciju pojačanog stvaranja metabolita koji antagonistički deluju na fitopatogenu vrstu usled prethodne izloženosti izolata fitopatogenoj vrsti prilikom rasta u tečnoj dvojnjoj kulturi.

Rezultati konfrontacijskog testa uključuju i mehanizme koji zahtevaju kontakt dve micelije i mogu zajedno sa rezultatima ove faze dati sliku interakcije između gljiva i biti putokaz za dalja istraživanja.

#### **5.4.1. Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium paneum* (izolata K7/1) na rast fitopatogena**

Filtrati gljive *P. paneum* (izolata K7/1) različito su uticali na rast *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidemratum*. Kod pojedinih fitopatogenih vrsta je uočena inhibicija rasta ali i stimulacija (Grafikon 1, 2 i 3).

##### Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium paneum* (izolata K7/1) na rast *Botrytis cinerea*

Dunnet-ov test pokazao je da je na nivou značajnosti od 0,05 najveći broj filtrata *P. paneum*, izolata K7/1 u različitom stepenu doveo do statistički značajne inhibicije rasta *B. cinerea*. Osim ovakvog rezultata, do stimulacije rasta fitopatogene gljive je došlo kod 1% filtrata čiste i dvojne kulture sterilisane filtracijom, a 50% K7/1a nije značajno uticao na rast.

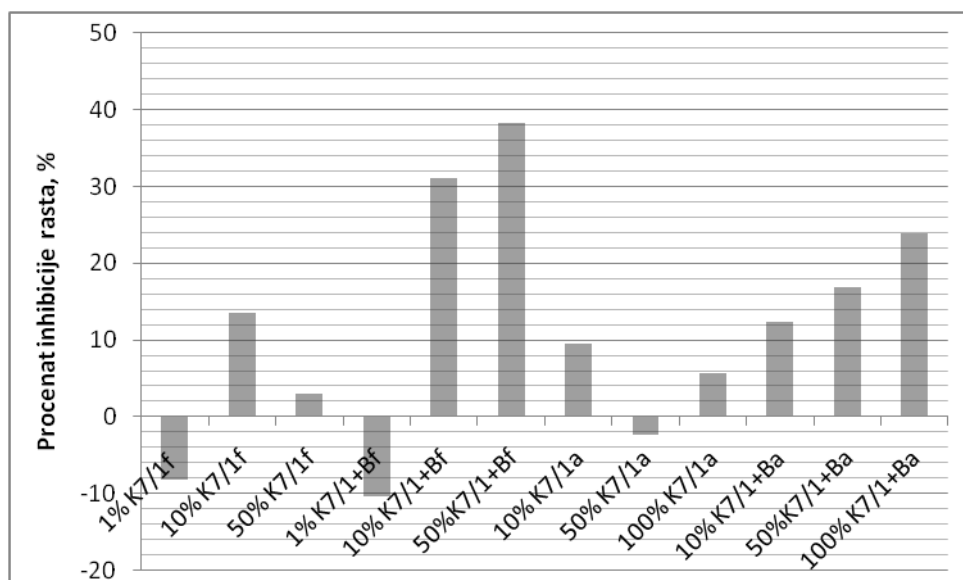
Najveći procenat inhibicije rasta *B. cinerea* imao je filtrat dvojne tečne kulture sterilisan filtracijom (K7/1+Bf). Procenat inhibicije rasta *B. cinerea* je u slučaju ovog filtrata pri koncentraciji od 50% iznosio 38,6% (Grafikon 1).

Analiza varijanse pokazala je da se pri ispitivanju uticaja metabolita sadržanih u filtratu tečne kulture izolata K7/1 na rast *B. cinerea* kao značajan faktor na nivou 0,05

javlja: koncentracija, način sterilizacije i izloženost izolata fitopatogenoj gljivi u dvojnoj tečnoj kulturi, a između faktora postoji interakcija prvog reda (Prilog 8.2.).

Kod filtrata čiste kulture procenat inhibicije bio je značajno viši koncentracije od 10% u odnosu na 50%. Ovaj zaključak odnosi se na filtrate sterilisane filtracijom, dok kod autoklaviranih 50% K7/1a čak nije pokazao značajan uticaj na rast. U slučaju dvojnih kultura, uticaj koncentracije je bio obrnut, odnosno viša koncentracija (50%) je imala jači inhibični efekat.

Autoklavirani filtrati su doveli do značajno nižeg procenta inhibicije *B. cinerea*, kako u slučaju dvojnih, tako i u slučaju čistih kultura pri koncentracijama 10% i 50%. Filtrati dvojne kulture doveli su do većeg stepena inhibicije u odnosu na filtrate čiste kulture, što se odrazilo kod obe poređene koncentracije (10% i 50%) i oba načina sterilizacije (filtriranje i autoklaviranje).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta.

Grafikon 1. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K7/1





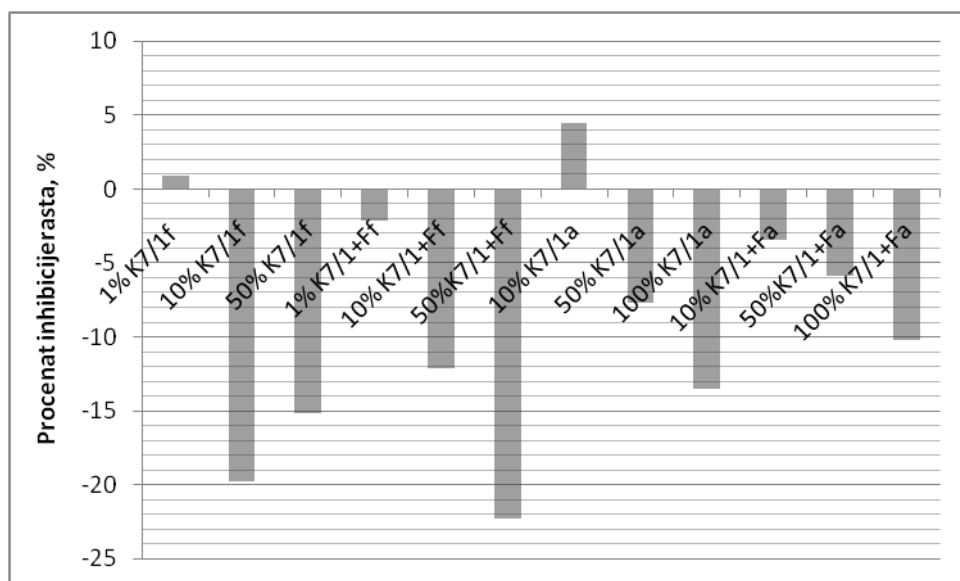
Slika 17. Morfološke promene *Botrytis cinerea* u prisustvu filtrata *Penicillium paneum*, izolata K7/1 (levo: kolonija *Botrytis cinerea* na PDA; desno: kolonija *Botrytis cinerea* na PDA sa dodatkom autoklaviranog filtrata izolata K7/1)

Pored promena u prečniku micelije *B. cinerea*, na podlogama koje sadrže filtrate izolata K7/1 je došlo i do promene u gustini i boji micelije (Slika 17). Micelija *B. cinerea* je bila vidno ređa i tamnija u odnosu na miceliju na kontroli. Nakon presejavanja kolonija blede boje na PDA i inkubacije razvijena je micelija pigmentacije i gustine kao i na kontrolnoj Petri kutiji, što ukazuje da je prisustvo filtrata u hranljivoj podlozi faktor koji je doveo do morfološke promene.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium paneum* (izolata K7/1) na rast *Fusarium oxysporum*

Nasuprot inhibiciji rasta *B. cinerea* pod uticajem filtrata *P. paneum* (izolat K7/1), najveći broj primenjenih tretmana stimulisao je rast *F. oxysporum* (Grafikon 2).

Filtrati tečne kulture izolata K7/1 doveli su do statistički značajne stimulacije rasta *F. oxysporum* osim u slučaju: 1% K7/1f, 1% K7/1+Ff, 10% K7/1a, 10% K7/1+Fa i 50% K7/1+Fa koji nisu imali statistički značajan uticaj na rast na nivou značajnosti 0,05. Stimulacija rasta je iznosila do 22,3% u slučaju 50% filtrata K7/1+Ff. (Grafikon 2).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 2. Procentat inhibicije rasta *Fusarium oxysporum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K7/1

Analiza varijanse i LSD vrednosti su dati u prilogima 8.3 i 8.1, ali s obzirom da je kod većine filtrata došlo do stimulacije rasta nisu razmatrana detaljnija poređenja pojedinih tretmana na rast *F. oxysporum*.



Slika 18. Morfološke promene *F. oxysporum* u prisustvu filtrata *Penicillium paneum*, izolata K7/1 (gore desno: kolonija *F. oxysporum* na PDA, ostale petri kutije sadrže PDA sa dodatkom filtrata)

Pored promena u prečniku micelije došlo je i do drugih morfoloških promena *F. oxysporum* (Slika 18). Osim 1% filtrata K7/1f, u slučaju svih drugih ispitivanih koncentracija primećen je uticaj na gubitak pigmenta *F. oxysporum*. Kolonije su bile blede, a potpuno bez ružičastog pigmenta pri 100% K7/1a, a u prisustvu 10% K7/1f su imale gušću miceliju po ivicama, sa više belih vazdušnih hifa. Nakon presejavanja

kolonija blede boje na PDA i inkubacije razvijena je micelija uobičajene pigmentacije i gustine.

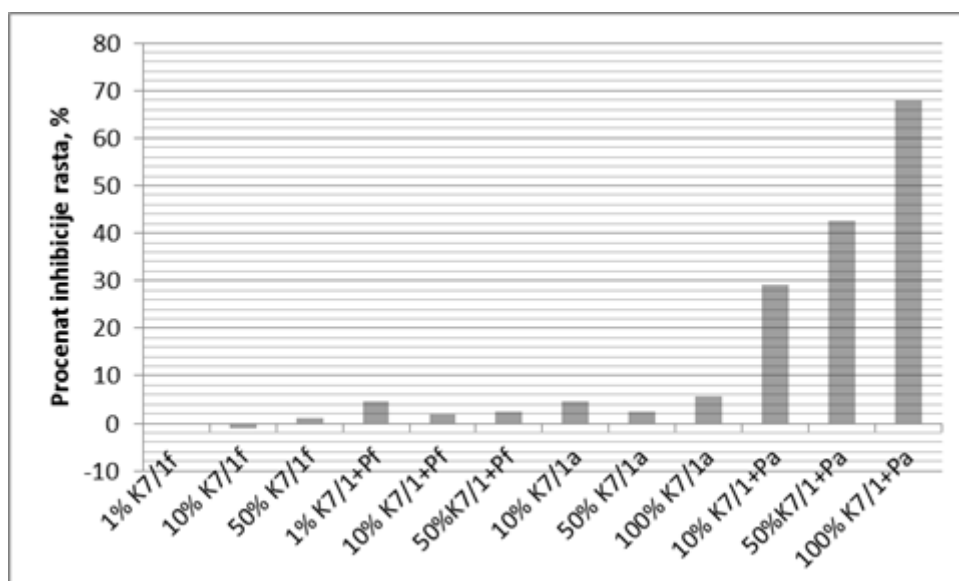
#### Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium paneum* (izolata K7/1) na rast *Pythium aphanidermatum*

Filtrati tečne kulture *P. paneum* (izolata K7/1) nisu uticali na rast *P. aphanidermatum* ili je dolazilo do inhibicije rasta (Grafikon 3).

Do značajne inhibicije rasta fitopatogene gljive *P. aphanidermatum* na nivou statističke značajnosti  $p=0,05$  doveli su autoklavirani filtrati dvojne kulture K7/1+Pa u svim ispitivanim koncentracijama. Pored autoklaviranih filtrata dvojne kulture statistički značajan uticaj na rast imali su 100% autoklavirani filtrat čiste kulture K7/1a (5,7%), zatim 1% K7/1+Pf i 10% K7/1a, oba sa relativno niskim procentom inhibicije od 4,5% (Grafikon 3).

Analiza varijanse pokazala je da se pri ispitivanju uticaja metabolita sadržanih u filtratu tečne kulture izolata K7/1 na rast *P. aphanidermatum* kao značajan faktor na nivou 0,05 javljaju: koncentracija, način sterilizacije i izloženost izolata fitopatogenu u dvojnoj tečnoj kulturi, kao i da postoji interakcija prvog i drugog reda između faktora (Prilog 8.4.).

Procenti inhibicije rasta u prisustvu autoklaviranog filtrata dvojne kulture se statistički značajno razlikuju u zavisnosti od primenjene koncentracije. Ovi filtrati su inhibirali rast od 29% pri 10% K7/1+Pa do 67,8% koliko je iznosio procenat inhibicije rasta na 100% autoklaviranom filtratu dvojne kulture (Grafikon 3).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 3. Procenat inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K7/1

Osim promena u prečniku kolonija, nije došlo do drugih morfoloških promena *P. aphanidermatum* na podlogama sa dodatim filtratima.

#### Potencijal metabolita *Penicillium paneum* (izolata K7/1) u suzbijanju fitopatogena

*P. paneum*, izolat K7/1 je odabran u konfrontacijskom testu jer je pokazao antagonistički efekat prema sva tri ispitivana fitopatogena. Tokom konfrontacijskog testa izolat je doveo do smanjenja veličine kolonija fitopatogena u odnosu na kontrolu, dok je u slučaju *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum* došlo i do prerastanja kolonija fitopatogena od strane micelije izolata.

Prerastanje je izostalo u kombinaciji sa *B. cinerea*, ali su filtrati tečnih kultura izolata *P. paneum* K7/1 imali najveći efekat baš kod ove fitopatogene gljive, što ukazuje na prevashodni uticaj indirektnih mehanizama antagonizma koji uključuju delovanje ekstracelularnih metabolita sadržanih u filtratu tečne kulture. Najveći inhibični uticaj je imao filtrat dvojne kulture K7/1+Bf koji je pri 50% inhibirao rast za 38,6%, a prisustvo *B. cinerea* u dvojnoj kulturi je uglavnom uticalo na povećanje procenta inhibicije u odnosu na filtrate dvojne kulture. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da izolat K7/1 produkuje ekstracelularne metabolite koji imaju inhibični uticaj na *B. cinerea* i da je produkcija ovih metabolita u određenoj meri indukovana prethodnim izlaganjem izolata prisustvu *B. cinerea* u dvojnoj tečnoj kulturi. Filtrati su

imali oslabljen inhibitorni uticaj ukoliko su sterilisani autoklaviranjem, ali su ipak zadržali statistički značajno delovanje, što ukazuje na prisustvo kako termostabilnih, tako i termolabilnih komponenata u filtratu tečne kulture.

Iako je *P. paneum*, K7/1 u konfrontacijskom testu uticao na inhibiciju rasta *F. oxysporum*, filtrati tečne kulture nisu imali značajan inhibitorni efekat. Došlo je do stimulacije rasta fitopatogene gljive, ali i promena u pigmentaciji. Rezultati koji se odnose na promenu prečnika *F. oxysporum* usled dodatka filtrata u podlogu, navode na pretpostavku da su direktni vidovi antagonizma koji zahtevaju kontakt dvaju micelija zapravo verovatni mehanizam inhibicije do koje je došlo u konfrontacijskom testu. Međutim, prema podacima iz literature promene u pigmentaciji ipak mogu ukazati na fiziološke promene koje mogu da se odraze i na aktivnost patogena prema biljkama. **Duarte i Archer (2003)** ispitivali su produkciju sekundarnih metabolita *Fusarium solani* f. sp. *piperis* koji mogu dovesti do pojave oboljenja kod biljaka. Izolati koji su proizveli crvene pigmente u tečnoj kulturi su bili mnogo efikasniji u produkciji biološki aktivnih filtrata tečne kulture odnosu na one koji su imali roze pigmentaciju ili nisu stvarali pigment što sugerise na vezu pigmentacije sa toksikogenom aktivnošću. Pigmentacija ukazuje na određene fiziološke promene, ali njihov uticaj na patogenost izolata još nije potpuno ispitan.

*P. aphanidermatum* je bio inhibiran od strane filtrata izolata K7/1 do 67,8% u odnosu na kontrolu u prisustvu autoklaviranog 100% filtrata dvojne kulture. Interesantno je da su najveći inhibitorni uticaj imali upravo autoklavirani filtrati dvojne kulture, dok isti filtrati sterilisani mikrobiološkom filtracijom nisu imali efekta. Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se pretpostaviti da su se metaboliti koji su nastali u dvojnoj tečnoj kulturi *P. aphanidermatum* i *P. paneum* K7/1 tokom autoklaviranja transformisali i nastali toksični metaboliti koji inhibiraju *P. aphanidermatum*. Ako se izuzme uticaj jedinjenja koji nastaju prilikom autoklaviranja, visok procenat inhibicije u konfrontacijskom testu i izostanak inhibicije kod filtrata tečnih kultura navode na zaključak o značajnom udelu direktnih vidova mehanizma u interakciji *P. paneum*, izolata K7/1 i *P. aphanidermatum*.

#### **5.4.2. Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium chrysogenum* (izolata K11/1) na rast fitopatogena**

Filtrati *P. chrysogenum* (izolata K11/1) različito su uticali na *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidemratum*, odnosno uočen je spektar delovanja od inhibicije čak do stimulacije rasta (Grafikon 4, 5 i 6).

##### Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium chrysogenum* (izolata K11/1) na rast *Botrytis cinerea*

Ispitivani filtrati tečne kulture *P. chrysogenum* (izolata K11/1) su doveli do različitog stepena inhibicije rasta *B. cinerea*, a u nekim slučajevima došlo je i do stimulacije rasta (Grafikon 4).

Svi ispitivani filtrati su pokazali statistički značajan uticaj na rast *B. cinerea*, osim 10% K11/1a.

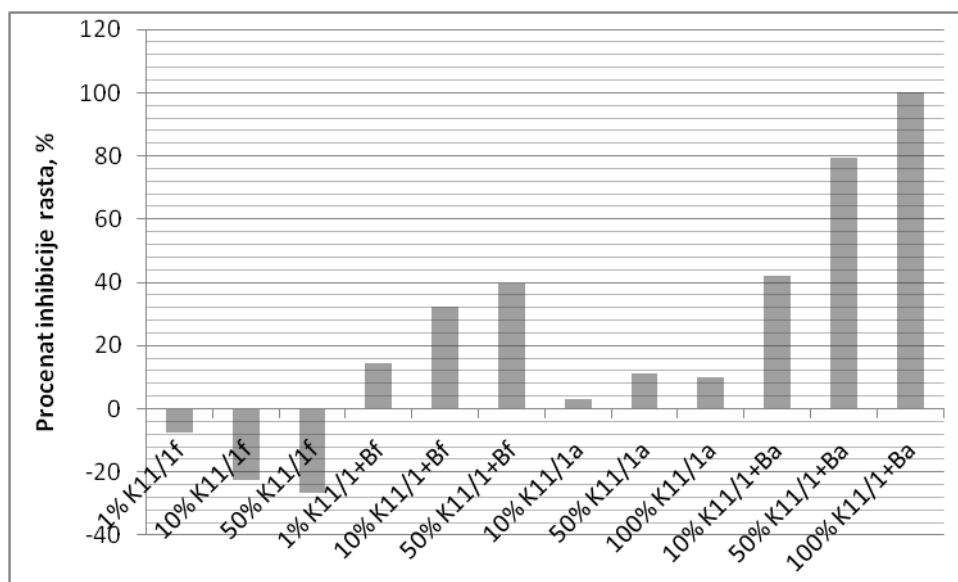
Kada su u pitanju filtrati sterilisani filtracijom, samo filtrati dvojne kulture ispoljili su inhibitoran uticaj, dok su filtrati čiste kulture delovali stimulatивно na rast fitopatogena. Filtrati čiste kulture statistički značajno su inhibirali rast samo nakon sterilizacije autoklaviranjem kod koncentracija od 50% i 100%.

Analiza varijanse pokazala je da se pri ispitivanju uticaja metabolita sadržanih u filtratu tečne kulture izolata K11/1 na rast *B. cinerea* kao značajan faktor na nivou 0,05 javljaju: koncentracija, način sterilizacije i izloženost izolata fitopatogenu u dvojnoj tečnoj kulturi (Prilog 8.5.), pri čemu postoji interakcija prvog reda između faktora.

Izražen je uticaj izlaganja izolata fitopatogenoj gljivi u dvojnoj kulturi na inhibiciju rasta koja je bila veća u odnosu na inhibiciju usled prisustva filtrata čiste kulture. Način sterilizacije je uticao tako da su filtrat čiste kulture koji nije ispoljavao aktivnost nakon sterilizacije filtriranjem doveo do inhibicije nakon autoklaviranja (50% K7/1a), dok je kod filtrata dvojne kulture značajno povišen procenat inhibicije nakon autoklaviranja na nivou značajnosti 0,05, nezavisno od primenjene koncentracije (Prilog 8.5).

Uticaj primenjene koncentracije uočava se kod filtrata dvojne kulture. Uticaj filtrata dvojne kulture je bio značajniji pri 50% u odnosu na 10% koncentraciju, bez obzira na primenjen način sterilizacije.

Efekat 50% autoklaviranog filtrata dvojne kulture (K11/1+Ba) bio je približno dvostruko veći u odnosu na isti 50% filtrat sterilisan filtracijom. Najviši inhibitorni efekat imao je 100% autoklavirani filtrat dvojne kulture (K11/1+Ba), koji je u potpunosti inhibirao rast fitopatogene gljive (100%) (Grafikon 4).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 4. Procentat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K11/1

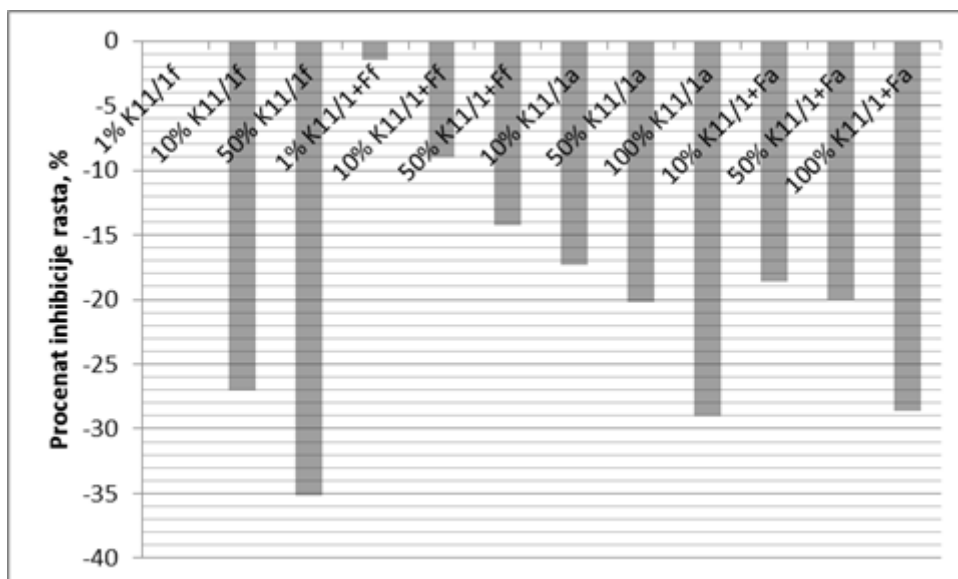
Osim promena u prečniku kolonija, odnosno brzini porasta nisu primećene morfološke promene kod *B. cinerea* u prisustvu filtrata izolata K11/1.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium chrysogenum* (izolata K11/1) na rast *Fusarium oxysporum*

Filtrati *P. chrysogenum* (izolata K11/1) su uglavnom doveli su do stimulacije rasta *F. oxysporum* (Grafikon 5).

Statistička obrada podataka pokazala je da su svi ispitivani filtrati izolata K11/1 osim 1% filtrata K11/1f i K11/1+Bf doveli do značajne stimulacije rasta *F. oxysporum* na nivou značajnosti 0,05. Najveći procenat stimulacije rasta je nastao pod uticajem 50% filtrata K11/1f iznosio je 35,2% (Grafikon 5).

Analiza varijanse i LSD vrednosti su dati u prilogima 8.6 i 8.1, ali s obzirom da je kod većine filtrata došlo do stimulacije rasta nisu razmatrana detaljnija poređenja i procena uticaja pojedinih tretmana na rast *F. oxysporum*.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 5. Procenat inhibicije rasta *Fusarium oxysporum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K11/1

Filtrati K11/1a i K11/1+Fa su pri koncentracijama 10% i višim uticali na gubitak pigmenta *F. oxysporum*, dok je u slučaju sirovih filtrata sterilisanih filtracijom ova promena zabeležena samo u prisustvu filtrata dobijenog iz čiste tečne kulture – K11/1f. Nakon presejavanja kolonija blede boje na PDA i inkubacije razvijena je micelija uobičajene pigmentacije.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Penicillium chrysogenum* (izolata K11/1) na rast *Pythium aphanidermatum*

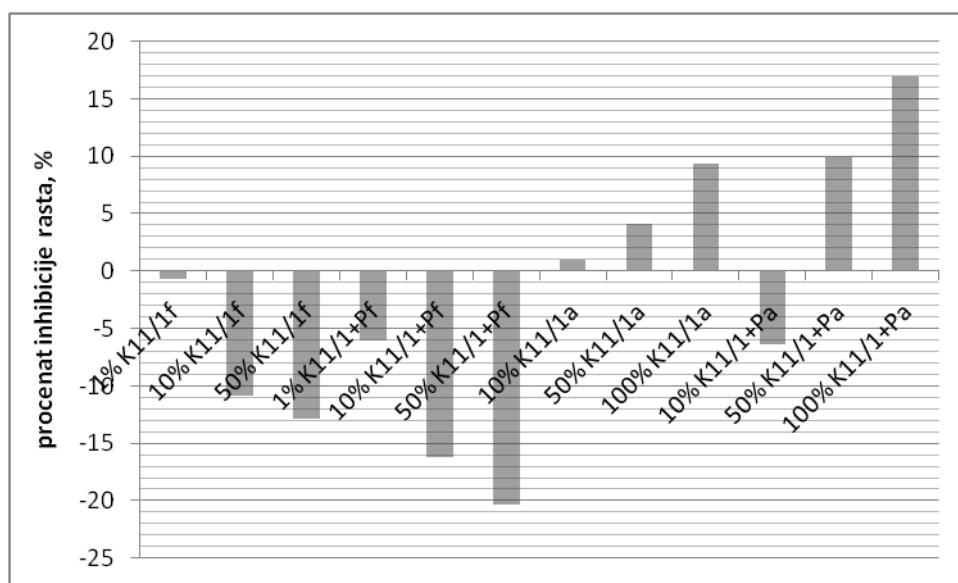
Ispitivani filtrati *P. chrysogenum* (izolata K11/1) su u različitom stepenu inhibirali ili stimulisali rast *P. aphanidermatum* (Grafikon 6).

Filtrat tečne kulture izolata K11/1 doveo je do statistički značajne inhibicije rasta *P. aphanidermatum* u slučaju svih autoklaviranih filtrata, osim 10% i 50% filtrata K11/1a koji nisu imali značajan uticaj na rast fitopatogena i 10% filtrata K11/1+Pa odgajenog u dvojnjoj kulturi, koji je doveo do stimulacije rasta. 100% filtrat K11/1+Pa je doveo do najveće inhibicije u odnosu na kontrolu od 17% (Grafikon 6).

Filtrati tečne kulture koji su sterilisani filtracijom su osim 1% filtrata čiste kulture (K11/1f) koji nije imao značajnog uticaja na rast, doveli do stimulacije rasta koja je iznosila do 20,1% u slučaju 50%-nog filtrata K11/1+B (Grafikon 6).



Iz rezultata koji jasno ukazuju da su samo autoklavirani 100% filtrati i 50% autoklavirani filtrat dvojne kulture imali značajno inhibitorno dejstvo, kao i rezultata trofaktorijalne analize varijanse (Prilog 8.7) može se zaključiti da je prisustvo fitopatogena u dvojnoj kulturi uticalo na stvaranje veće količine antifungalnih jedinjenja kod filtrata sterilisanih autoklaviranjem i da je procenat inhibicije direktno zavisao i od primenjene koncentracije filtrata (viši je što je viša koncentracija filtrata).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 6. Procenat inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K11/1

Osim promena u prečniku kolonija, nisu primećene druge morfološke promene kod *P. aphanidermatum* u prisustvu filtrata izolata K11/1.

#### Potencijal metabolita *Penicillium chrysogenum* (izolata K11/1) u suzbijanju fitopatogena

Metaboliti *P. chrysogenum*, izolata K11/1, od ispitivanih fitopatogena poseduju najveći potencijal u inhibiciji rasta *B. cinerea*, na šta ukazuju rezultati konfrontacijskog testa, ali i rezultati ispitivanja uticaja metabolita sadržanih u filtratima tečnih kultura.

S obzirom na to da su filtrati dvojne kulture *P. chrysogenum*, izolata K11/1 pokazali značajan efekat prema *B. cinerea* koji je izostao u slučaju čiste kulture izolata, može se reći da je odlučujući faktor koji opredeljuje stvaranje inhibitornih ekstracelularnih metabolita izolata zapravo indukcija određenih mehanizama usled prisustva fitopatogene gljive u dvojnoj tečnoj kulturi. Veći procenat inhibicije rasta *B.*

*cinerea* imali su autoklavirani filtrati što može ukazati na nastanak dodatnih toksičnih jedinjenja tokom autoklaviranja. Prerastanje micelije *B. cinerea* od strane izolata K11/1 u konfrontacijskom testu i uticaj ekstracelularnih metabolita na rast gljive ukazuje na udruženo delovanje više mehanizama.

Dok je kod *B. cinerea* u najvećoj meri inhibitorni efekat indukovao prisustvom patogena u tečnoj kulturi, rast *F. oxysporum* je bio stimulisan u slučaju svih primenjenih varijanti filtrata, dok je jedino došlo do izostanka formiranja uobičajene pigmentacije fitopatogene gljive. Rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenih u konfrontacijskom testu u kome takođe nije došlo do inhibicije rasta *F. oxysporum*, već samo do promene u pigmentaciji pri dodiru dve kolonije. Navedena promena uslovljena je prisustvom metabolita *P. chrysogenum*. Iako je opšte poznato da pigmenti gljiva služe kao zaštita od UV zračenja, putevi sinteze i uloga pigmenata *F. oxysporum* nije u potpunosti razjašnjenja. Na sintezu utiče više faktora kao što su količina azota i pH vrednost, a istraživanja ukazuju na povezanost pigmenta sa brojnim biološkim procesima kao što su vakuolacija i starenje, a pigmenti imaju i ulogu antibiotika koja se ispoljava prema oomicetama, nematodama i protozoama (**Wiemann i sar., 2009**).

U slučaju *P. aphanidermatum* značajniji efekat postignut je autoklaviranim ekstraktima, kao i u slučaju *B. cinerea*, ali su isključivo autoklavirani filtrati doveli do inhibicije rasta. *P. paneum*, izolat K11/1, nije u konforntacijskom testu doveo do značajne inhibicije rasta *P. aphanidermatum*. Zona inhibicije rasta koja se javila pri dodiru dve kolonije i izostanak uticaja na prečnik *P. aphanidermatum* ukazuju na stvaranje određenih aktivnih metabolita od strane izolata, ali ne dovoljno aktivnih da dođe do značajnije inhibicije. Za sada se može se pretpostaviti da inhibitorni efekat koji se javlja nakon autoklaviranja filtrata potiče od jedinjenja koja nastaju tokom autoklaviranja.

Mogućnost produkcije antimikrobnih jedinjenja od strane *P. chrysogenum* odgajanog na agroindustrijskom otpadu kao jedinom izvoru nutrijenata ispitana je u radu **Lopes i sar. (2013)**. Filtrat tečne kulture inhibirao je rast *F. oxysporum*, ali ovakav efekat nije postignut gajenjem na otpadu od grožđa za razliku od surutke koja se pokazala kao podesniji medijum. Ovakav efekat ukazuje na zavisnost produkcije antifungalnih metabolita od supstrata i na potrebu daljih istraživanja koja bi omogućila da se potencijal izolata maksimalno iskoristi.

### 5.4.3. Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus fumigatus* (izolata K16/2) na rast fitopatogena

Filtrati *A. fumigatus* (izolat K16/2) različito su uticali na rast *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum*, odnosno uočena je inhibicija i stimulacija rasta (Grafikon 7, 8 i 9).

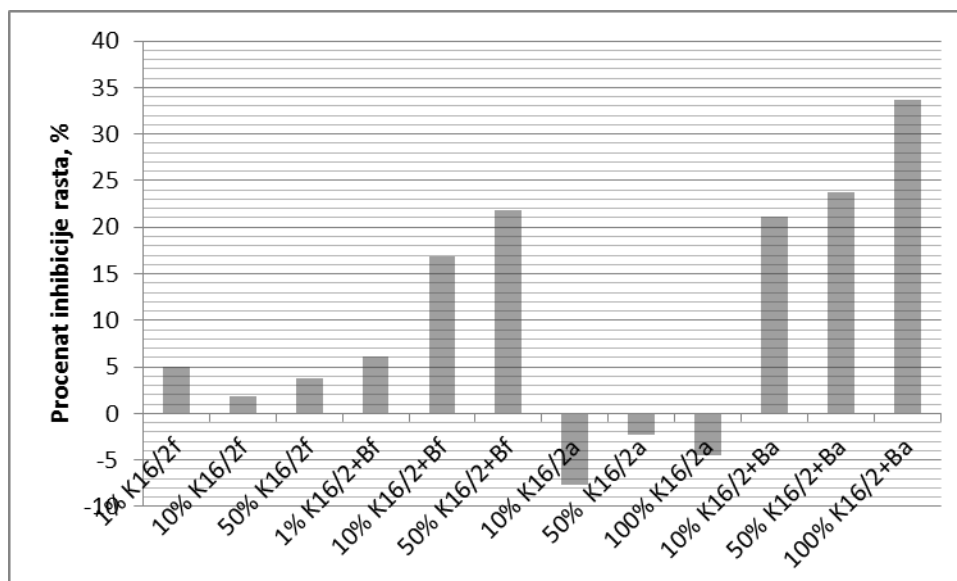
#### Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus fumigatus* (izolata K16/2) na rast *Botrytis cinerea*

Najveći broj primenjenih filtrata *A. fumigatus* (izolat K16/2) su u većem ili manjem stepenu inhibirali rast *B. cinerea* (Grafikon 7).

Svi filtrati dvojnih kultura izolata K16/2 i *B. cinerea* su statistički značajno inhibirali rast fitopatogena na nivou značajnosti od 0,05, a procenat inhibicije je iznosio do 33,7% koliko je iznosio procenat inhibicije u slučaju 100% autoklaviranog filtrata dvojne kulture (K16/2+Ba) (Grafikon 7). Od filtrata čiste kulture, statistički značajan inhibitorski uticaj ispoljio je samo 1% filtrat K16/2f, dok je 10% K16/2a je uzrokovao stimulaciju rasta *B. cinerea*, a ostali ispitivani filtrati nisu imali statistički značajnog uticaja na rast.

Analiza varijanse i poređenje pojedinih tretmana putem LSD vrednosti (Prilog 8.1 i 8.8.) pokazala je da su filtrati dvojnih kultura imali značajno viši inhibitorski efekat od filtrata čiste kulture nezavisno od primenjenog načina sterilizacije, a takav efekat raste sa porastom koncentracije pa je značajno viši kod 50% u odnosu na 10% filtrat.

Filtrat dvojne kulture u većoj meri je inhibirao rast nakon sterilizacije autoklaviranjem (u slučaju koncentracija 10 i 50%).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 7. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K16/2

Osim promene prečniku kolonija, nisu primećene druge morfološke promene kod *B. cinerea* u prisustvu filtrata izolata K16/2.

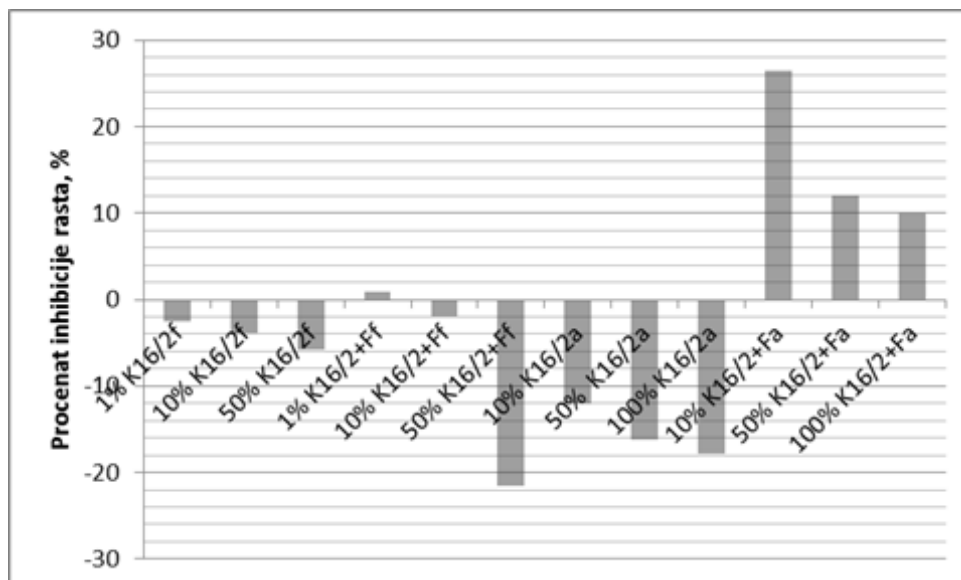
#### Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus fumigatus* (izolata K16/2) na rast *Fusarium oxysporum*

Među primenjenim tretmanima – filtrarima tečne kulture *A. fumigatus* (izolat K16/2) bilo je onih koji stimulišu i onih koji inhibiraju rast *F. oxysporum* (Grafikon 8).

Do statistički značajne inhibicije rasta *F. oxysporum* došlo je samo u slučaju autoklaviranog filtrata dvojne kulture (K16/2+Fa). U ostalim slučajevima je došlo do stimulacije rasta ili primenjeni filtrati nisu imali uticaja na rast *F. oxysporum*. Autoklavirani filtrati čiste kulture K7/1a u svim koncentracijama doveli su do stimulacije rasta. Filtrati tečnih kultura sterilisani filtracijom nisu imali statistički značajnog efekta na rast *F. oxysporum* osim u slučaju 50% filtrata K16/2+Ff koji je doveo do povećanja prečnika micelije za 21,5% u odnosu na kontrolu i 10% i 50% filtrata K16/2f koji su u manjoj meri stimulisali rast (Grafikon 8).

Analiza varijanse i LSD vrednosti dati su u prilogima 8.9 i 8.1, ali s obzirom da je kod većine filtrata izostao efekat inhibicije rasta nisu razmatrana detaljnija poređenja tretmana osim razlika u delovanju različitih koncentracija filtrata dvojne kulture sterilisanih autoklaviranjem.

Filtrati su delovali tako da je jači inhibitorni efekat imao filtrat primenjen u nižoj koncentraciji. Tako je filtrat K16/2+Fa u najvećoj meri inhibirao rast fitopatogene gljive pri koncentraciji od 10% - za 26,5% (Grafikon 8).



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 8. Procenat inhibicije rasta *Fusarium oxysporum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K16/2

Filtrat čiste tečne kulture izolata K16/2 nije uticao na promenu u morfologiji *F. oxysporum*, dok je filtrat dvojne tečne kulture K16/2+Ff uticao na pojavu tamnije ljubičaste pigmentacije pri koncentraciji od 10% i pojavu bledih kolonija sa manje pigmenta u odnosu na kontrolu pri koncentraciji od 50%. Filtrat K16/2a pri koncentraciji od 10% indukovao je delimičan gubitak pigmenta *F. oxysporum*. Ista promena je zabeležena pri rastu *F. oxysporum* u prisustvu filtrata K16/2+Fa, ali pri višim koncentracijama. Pri 50% ovog filtrata, kolonije su bile blede ružičaste, a potpuno bele u prisustvu 100% K16/2+Fa. Nakon presejavanja kolonija blede ili ljubičaste boje na PDA i inkubacije razvijena je micelija uobičajene pigmentacije.

Iako nije očekivan rezultat da filtrat tečne kulture koji nije imao antifungalnu aktivnost deluje inhibitorno nakon autoklaviranja, ovakvi primeri se mogu naći u literaturi. U istraživanjima **Verdejo-Lucas i sar. (2009)** ispitivan je uticaj filtrata tečnih kultura gljiva na nematodu *Tylenchulus semipenetrans*. Filtrat tečne kulture izolata *Talaromyces cyanescens* je pokazao značajnu aktivnost nakon autoklaviranja, dok pre

autoklaviranja nije ispoljio efekat. Autori ističu da je rezultat neočekivan i ne daju objašnjenje ovakvog rezultata.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus fumigatus* (izolata K16/2) na rast *Pythium aphanidermatum*

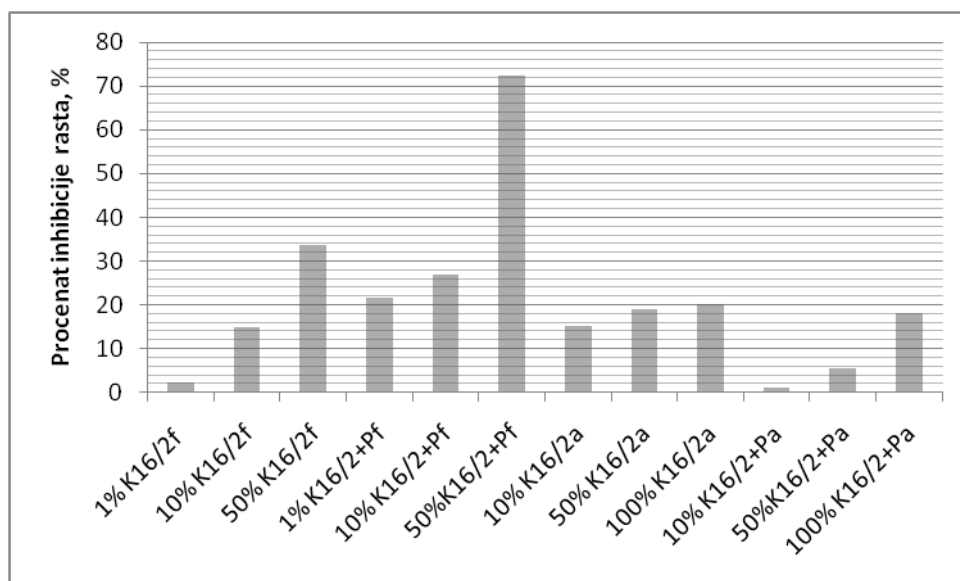
Filtrati *A. fumigatus* (izolat K16/2) su u različitom procentu inhibirali rast *P. aphanidermatum* (Grafikon 9).

Do statistički značajne inhibicije rasta doveli su svi primenjeni tretmani osim 1% K7/1f, 10% K7/1+Pa i 50% K7/1+Pa koji nisu imali značajan uticaj na rast *P. aphanidermatum* na nivou značajnosti 0,05

Najveći procenat inhibicije rasta *P. aphanidermatum* pokazao je filtrat dvojne kulture sterilisan filtracijom K16/2+Pf koji je pri koncentraciji od 50% inhibirao rast ove fitopatogene vrste za 72,5%. Uticaj iste koncentracije filtrata sterilisanog autoklaviranjem (50% K16/2+Pa) na rast *P. aphanidermatum* nije bio statistički značajan. Filtrat čiste tečne kulture izolata K16/2 sterilisan filtracijom inhibirao je rast *P. aphanidermatum* za 33,1% pri koncentraciji 50%, dok je autoklavirani filtrat K16/2a pri istoj koncentraciji uticao na smanjenje prečnika micelije za 18,5% (Grafikon 9).

Na osnovu analize varijanse i poređenja pomoću odgovarajućih LSD vrednosti (Prilog 8.10 i 8.1) može se zaključiti da kod filtrata sterilisanih filtracijom, filtrati dvojne kulture pokazuju viši inhibitorni efekat u odnosu na čistu kulturu što se ispoljilo kako kod koncentracije od 10%, tako i pri 50% filtrata. Kod autoklaviranih filtrata je obrnuto, odnosno filtrati čiste kulture pri pomenutim koncentracijama imaju značajno viši inhibitorni efekat u poređenju sa filtratima dvojne kulture. Filtrati sterilisani filtracijom imali su jači inhibitorni efekat u odnosu na filtrate sterilisane autoklaviranjem, osim u slučaju 10% filtrata čiste kulture (K16/2f i K16/2a) između čijeg delovanja nije bilo statistički značajne razlike.

Takođe, inhibitorni efekat je bio viši kod koncentracija od 50% u odnosu na 10%, osim u slučaju autoklaviranih filtrata čiste kulture (K16/2f i K16/2a), između čijeg delovanja nije bilo statistički značajne razlike.



Grafikon 9. Procenat inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata K16/2

Osim promene prečniku kolonija, nisu primećene druge morfološke promene kod *P. aphanidermatum* u prisustvu filtrata izolata K16/2.

#### Potencijal metabolita *Aspergillus fumigatus* (izolata K16/1) u suzbijanju fitopatogena

Najveći uticaj filtrata *A. fumigatus*, izolata K16/2 određen je kod *P. aphanidermatum* i iznosio je do 72,5%.

Micelija *B. cinerea* bila je redukovanih dimenzija, a došlo je i do prerastanja od strane micelije izolata K16/2 u konfrontacijskom testu. Rezultati ogleda u kome je ispitivan uticaj ekstracelularnih metabolita izolata na *B. cinerea* ukazuju na kontakt gljive sa fitopatogenom kao važan faktor u indukciji stvaranja antifungalnih metabolita. Naime, prisustvo *A. fumigatus*, izolata K16/2 u tečnoj kulturi je značajno uticalo na stvaranje antifungalnih jedinjenja od strane izolata, a efekat filtrata dvojne kulture pojačan je nakon autoklaviranja.

*F. oxysporum* je u konfrontacijskom testu imao izmenjenu morfologiju u prisustvu izolata, što se ponovilo i u prisustvu filtrata tečne kulture. Inhibicija rasta je izostala osim u prisustvu autoklaviranih filtrata dvojne kulture, gde je najverovatnije došlo do nastanka toksičnih metabolita tokom autoklaviranja, ali je došlo do reverzibilnih morfoloških promena koje ukazuju na fiziološke promene pri rastu na podlozi sa dodatim filtratom.

U konfrontacijskom testu izvedenom sa *P. aphanidermatum* i *A. fumigatus*, K16/2, došlo je do mutualističke inhibicije, dok su filtrati izolata K16/2 ipak imali značajan inhibitorni efekat na rast fitopatogena. Visok inhibitorni efekat u prisustvu filtrata dvojne kulture ukazuje na indukciju stvaranja antifungalnih metabolita prisustvom fitopatogena, a značajno smanjenje istog efekta nakon autoklaviranja ukazuje na prisustvo pretežno termolabilnih metabolita u filtratu. Ukoliko se ovakav rezultat uporedi sa uticajem filtrata izolata na *B. cinerea*, može se zaključiti da su antoginisti mogu imati različite mehanizme delovanja koje ispoljavaju prema različitim fitopatogenima, što ide u prilog tvrdnji o specifičnosti interakcija između mikroorganizama.

#### **5.4.4. Uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na rast fitopatogena**

Filtrati *T. longibrachiatum* (izolata 10/5) su različito uticali na *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidemraturum*, odnosno uočena je inhibicija i stimulacija rasta (Grafikon 10, 11 i 12).

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na rast *Botrytis cinerea*

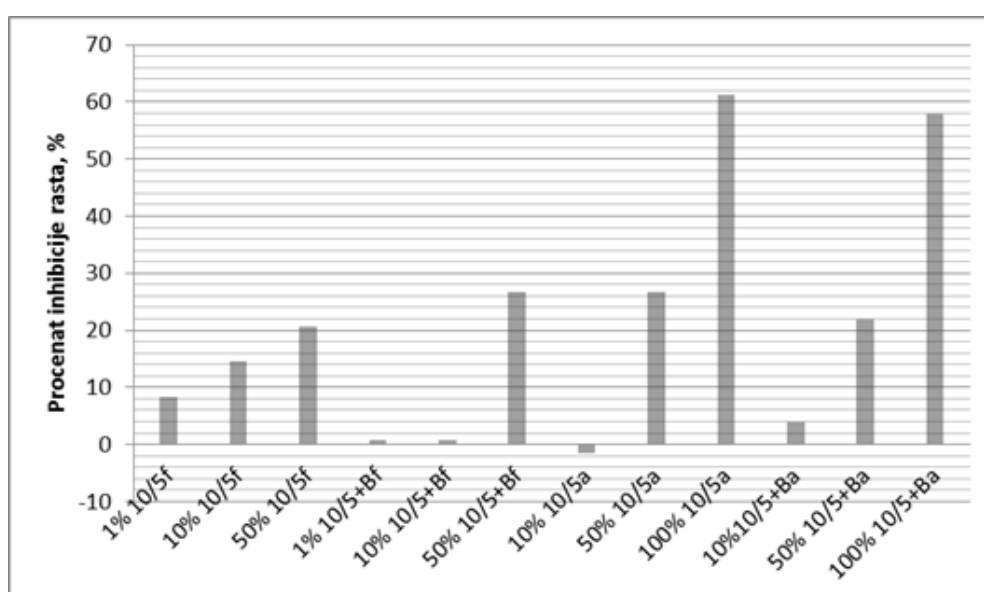
Većina ispitivanih filtrata tečne kulture *T. longibrachiatum* (izolata 10/5) dovelo je do inhibicije rasta *B. cinerea* (Grafikon 10).

Tretmani koji nisu statistički značajno uticali na rast *B. cinerea* na nivou značajnosti od 0,05 su: 1% i 10% 10/5+Bf i 10% 10/5a. Rast *B. cinerea* bio je u najvećoj meri inhibiran u slučaju koncentracije 100% 10/5a filtrata, procenat inhibicije iznosio je 61,3%. Inhibicija od preko 50% javila se i kod primene 100% autoklavirane dvojne kulture izolata 10/5 sa *B. cinerea* (10/5+Ba) – 57,8% (Grafikon 10).

Analiza varijanse je pokazala da se pri ispitivanju uticaja metabolita sadržanih u filtratu tečne kulture izolata K11/1 na rast *B. cinerea* kao značajan faktor na nivou 0,05 javljaju: koncentracija, način sterilizacije i izloženost izolata fitopatogenu u dvojnoj tečnoj kulturi, a između faktora su zastupljene interakcije prvog i drugog reda (Prilog 8.11.).



Nakon poređenja pojedinačnih rezultata dobija se veoma heterogena slika. Inhibicija usled dodatka filtrata dvojne kulture je pri koncentraciji od 50% bila niža u odnosu na inhibiciju uzokovanu filtratom čiste kulture iste koncentracije u slučaju autoklaviranih filtrata, dok je u slučaju filtriranih veći procenat inhibicije izazvao 50% 10/5+Bf u odnosu na 10% 10/5f. Pri koncentraciji od 10% je obrnut slučaj. Autoklavirani filtrati dvojne kulture imali su neznatan inhibitorski uticaj na *B. cinerea*, ali je kod filtrata čiste kulture inhibitorski efekat izostao. Kod filtriranih filtrata 10% filtrat dvojne kulture nije imao uticaja na rast, dok je isti filtrat čiste kulture doveo do inhibicije rasta.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 10. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata 10/5

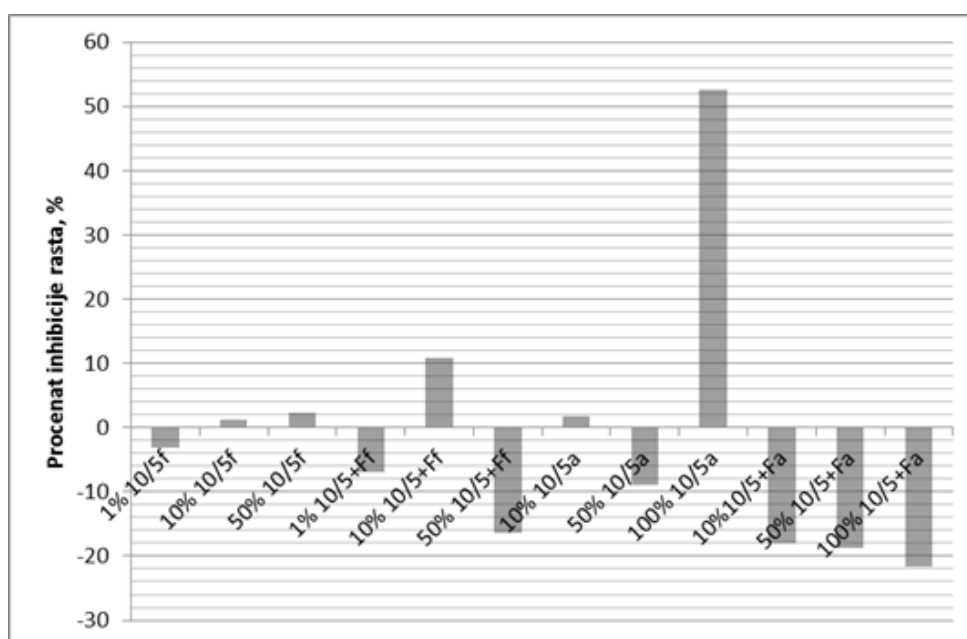
Autoklavirani filtrati pri koncentracijama višim od 10% uticali su na pojavu ređe micelije *B. cinerea* u odnosu na gustinu micelije na kontrolnim Petri kutijama. Nakon presejavanja kolonija sa ređom micelijom na PDA i inkubacije razvijena je micelija normalne gustine.

Uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na rast *Fusarium oxysporum*

U slučaju dva tretmana došlo je do statistički značajne inhibicije *F. oxysporum* (10% 10/5+Ff i 100% 10/5a), dok je kod ostalih primenjenih filtrata *T. longibrachiatum*, izolat 10/5, došlo do stimulacije rasta ili tretmani nisu imali uticaja na rast fitopatogena.

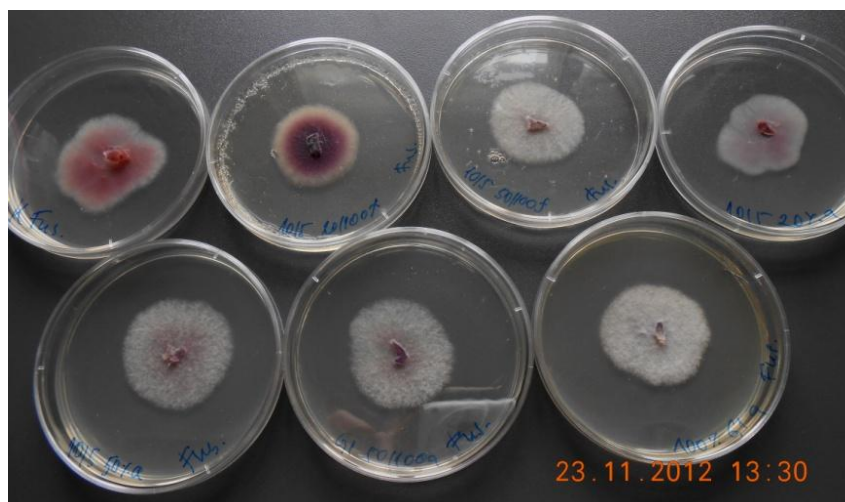
Najveći uticaj na rast gljive *F. oxysporum* imao je agarizovani auoklavirani filtrat 10/5a (100%) koji je doveo do smanjenja prečnika micelije za 52,6% u odnosu na kontrolu (Grafikon 11). Niže ispitivane koncentracije istog filtrata nisu pokazale inhibitorni efekat, dok je prisustvo autoklaviranog filtrata dobijenog iz dvojne tečne kulture (10/5+Fa) uticalo na povećanje prečnika micelije u odnosu na kontrolu.

Analiza varijanse i LSD vrednosti su dati u priložima 8.13 i 8.1, ali s obzirom na rezultate koji ukazuju na inhibitorni efekat samo dva ispitivana tretmana nisu razmatrana detaljnija poređenja.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 11. Procenat inhibicije rasta *Fusarium oxysporum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata 10/5



Slika 19. Morfološke promene micelije *Fusarium oxysporum* u prisustvu različitih koncentracija filtrata *Trichoderma longibrachiatum*, izolat 10/5 (gore levo: kolonija *F. oxysporum* na PDA, ostale petri kutije sadrže PDA sa dodatkom filtrata)

Filtrat 10/5f u koncentraciji od 50% uticao je na gubitak ružičastog pigmenta fitopatogene gljive *F. oxysporum* (Slika 19). Na 100%-nom agarizovanom filtratu (10/5a), *F. oxysporum* je takođe formirao bele kolonije. Nakon presejavanja izmenjenih kolonija na PDA i inkubacije razvijena je micelija normalne pigmentacije.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na rast *Pythium aphanidermatum*

Filtrati tečne kulture *T. longibrachiarum* (izolat 10/5) su imali inhibitoran efekat na *P. aphanidermatum* kod polovine ispitivanih tretmana, dok ostali nisu imali statistički značajan uticaj na rast fitopatogena na nivou značajnosti 0,05 (Grafikon 12).

Filtrati čiste i dvojne kulture sterilisani filtracijom imali su statistički značajan inhibitorni efekat pri koncentracijama od 10 i 50%. Autoklavirani filtrati dvojne kulture su pri istim koncentracijama doveli do značajne inhibicije, dok se ostali primenjeni tretmani nisu razlikovali od kontrole.

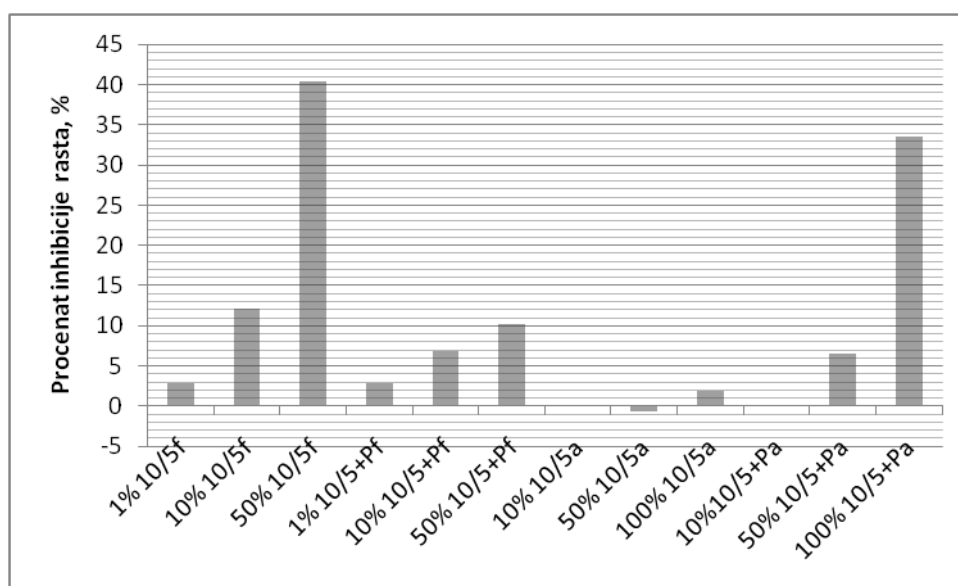
Najveći inhibitorni uticaj imao je filtrat 10/5f koji je inhibirao rast *P. aphanidermatum* za 40,4% pri koncentraciji od 50%, dok isti filtrat sterilisan autoklaviranjem (10/5a) nije prouzrokovao statistički značajnu inhibiciju rasta ispitivanog fitopatogena (Grafikon 12).

Na osnovu analize varijanse (Prilog 8.14) i poređenja tretmana pomoću LSD vrednosti (Prilog 8.1) izvršeno je razmatranje uticaja faktora na inhibitorni efekat filtrata na *P. aphanidermatum*.

Filtrati dvojne kulture su značajno slabije uticali na inhibiciju rasta *P. aphanidermatum* u odnosu na filtrate čiste kulture u slučaju sterilizacije filtracijom. U slučaju autoklaviranih filtrata, procenat inhibicije je bio viši kada je primenjen filtrat dvojne kulture, kod koncentracija koje su dovele do statistički značajne inhibicije.

Autoklaviranje je u značajnoj meri redukovalo inhibitorni efekat filtrata čiste kulture, a aktivnost filtrata dvojne kulture je redukovana autoklaviranjem samo u slučaju 10% filtrata, dok između 50% nije bilo statistički značajne razlike.

Uticaj koncentracije se kod čistih kultura ispoljio samo u slučaju filtrata sterilisanih filtracijom u korist 50% koncentracije, dok se kod filtrata dvojne kulture ovakav efekat ispoljio samo kod autoklaviranih filtrata.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 12. Procenat inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata 10/5

Filtrirani i autoklavirani filtrati čiste kulture 10/5 uticali su pri koncentracijama 10% i višim na morfologiju kolonija *P. aphanidermatum* u smislu pojave ređe micelije koja po obodu raste uz podlogu, sa manje vazdušnih hifa. Ova promena je bila najizraženija u slučaju 100%-nih 10/5a i 10/5+Pa filtrata. Nakon presejavanja izmenjenih kolonija na PDA i inkubacije razvijena je micelija normalne gustine.

Potencijal metabolita *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) u suzbijanju fitopatogena

Usled rezultata konfrontacijskog testa gde je došlo do smanjenja micelije *B. cinerea* za 68% usled prisustva izolata 10/5, ali i pojave zone inhibicije rasta fitopatogene gljive, pretpostavlja se značaj indirektnih mehanizama antagonizma, te je očekivan rezultat inhibicija rasta usled prisustva filtrata tečne kulture izolata. Međutim, prilikom posmatranja rezultata ispitivanja faktora koji utiču na inhibitorni uticaj filtrata izolata 10/5 teško da se mogu uočiti univerzalne zakonitosti. Uticaj prisustva *B. cinerea* u dvojnoj tečnoj kulturi je bio različit u zavisnosti od primenjene koncentracije i načina sterilizacije.

Promene u radijalnom rastu *F. oxysporum* su primećene u konfrontacijskom testu sa izolatom 10/5, ali se efekat filtrata u većoj meri ispoljavao kao promena u pigmentaciji kolonije, osim kada je u pitanju 100% 10/5a koji je doveo do inhibicije rasta. Prema **Sharma (2011)** jedan od veoma važnih mehanizama antagonizma *Trichoderma sp.* prema *F. oxysporum* je mikoparazitizam, koji zahteva direktan kontakt dve micelije, a važnu ulogu u suzbijanju rasta *F. oxysporum* imaju signalni molekuli koji se luče u prisustvu antagonista. Značaj kontakta dva mikroorganizma u složenoj interakciji u kojoj se ispoljavaju mehanizmi napada odbrane od strane oba učesnika objašnjava izostanak inhibicije pri primeni filtrata tečne kulture.

Kolonija *P. aphanidermatum* bila je smanjenog prečnika u konfrontacijskom testu sa izolatom 10/5, a do značajne inhibicije su doveli i filtrati tečnih kultura što ukazuje na značajno delovanje ekstracelularnih metabolita. Procenat inhibicije rasta *P. aphanidermatum* na podlogama sa dodatim filtratima redukovano je ukoliko se izolat 10/5 razvijao u prisustvu ovog fitopatogena u odnosu na filtrate čiste kulture izolata, kod filtrata sterilisanih autoklaviranjem. Aktivni metaboliti sadržani u filtratu čiste kulture su se pokazali kao termolabilni, dok se može pretpostaviti da je tokom autoklaviranja filtrata dvojne kulture došlo do stvaranja dodatnih antifungalnih metabolita. Iako je procenat inhibicije rasta *P. aphanidermatum* bio značajan, postignut je nešto slabiji efekat u odnosu na rezultate sa potvrđeno efikasnijim sojevima, na primer sojem *T. viride* i *T. harzianum* u radu **Mishra (2010)**. Filtrat tečne kulture najefikasnijih sojeva je pri koncentraciji od 20% inhibirao rast *P. aphanidermatum* za 30,2-38,6%.

Rezultati koji ukazuju na najmanji uticaj filtrata na *F. oxysporum* su u skladu sa literaturom. **Kucuk i Kivanc (2003)** ispitivali su efekat filtrata tečne kulture izolata *T. harzianum* na rast fitopatogenih gljiva. Među ispitivanim fitopatogenima su *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* i *Drechslera sorokiniana*, a rezultati ukazuju da su biljni patogeni *Fusarium* spp. pokazali u odnosu na ostale veći stepen rezistencije na odabrane isolate *T. harzianum*. Među njima *F. oxysporum* je bio najotporniji na prisustvo filtrata. Međutim, istraživanja ukazuju da se modifikovanjem uslova gajenja u velikoj meri može uticati na pojačanu inhibitrnu aktivnost filtrata. Tako su filtrati tečne kulture *T. viride* u kojima je indukovana sinteza proteaza, celulaza i hitinaza modifikovanjem hranljive podloge imali su značajno inhibitorno dejstvo na *F. oxysporum*. 10% filtrat tečne kulture u kojoj je indukovano stvaranje hitinaze inhibirao je rast *F. oxysporum* za 46,95% (**Terna i sar, 2013**). Ovaj rezultat ukazuje na mogućnosti uspešnije primene selektovanih sojeva i postizanja značajnije inhibicije promenom medijuma za gajenje.

Stvaranje antifungalnih metabolita je indukovano i prisustvom ciljanog mikroorganizma. Pojačano stvaranje enzima zaduženih za hidrolizu ćelijskog zida od strane *Trichoderma* sojeva u prisustvu gljive na kojoj inače ostvaruju parazitizam (*Lentinus edodes*) potvrđeno je u radu **Hatvani i sar. (2002)** kako na tečnoj tako i na čvrstoj hranljivoj podlozi. Još jedan značajan rezultat ovog istraživanja je da prisustvo filtrata tečne kulture u podlozi utiče na stvaranje enzima lakaze od strane *L. edodes*, a komponente koje imaju ovakav efekat pokazale su se kao termostabilne, a proizvode se i u čistoj kulturi, odnosno nisu indukovane prisustvom *L. edodes*. Rezultati ukazuju na kompleksnost interakcija i udeo kako enzimskih tako i drugih neisparljivih metabolita u interakciji dve gljive.

#### **5.6.5. Uticaj filtrata tečne kulture *Rhizopus oryzae* (izolata 19/5) na rast fitopatogena**

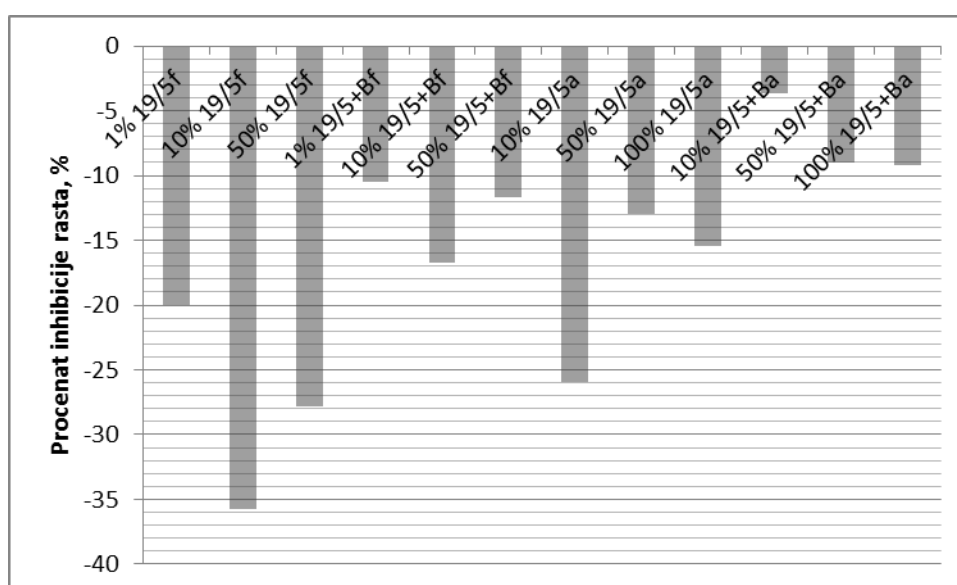
Filtrati *R. oryzae* (izolata 19/5) su slično delovali na *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidemratum*, odnosno u najvećem broju slučajeva uočena je stimulacija rasta fitopatogena u prisustvu filtrata (Grafikon 13, 14 i 15).

### Uticaj filtrata tečne kulture *Rhizopus oryzae* (izolata 19/5) na rast *Botrytis cinerea*

Filtrati tečne čiste kulture izolata 19/5 i dvojne kulture 19/5+F doveli su do stimulacije rasta *B. cinerea* pri primenjenim koncentracijama. Jedini filtrat koji nije imao statistički značajan uticaj na rast *B. cinerea* je 10% 19/5+Ba.

Najveće povećanje prečnika fitopatogene gljive određeno je pri rastu na 10% 19/5f, rast je stimulisan za 35,8% u odnosu na prečnik na kontroli (Grafikon 13).

Analiza varijanse i LSD vrednosti su dati u priložima 8.15 i 8.1, ali s obzirom na rezultate koji ukazuju na izostanak inhibitornog efekta kod svih ispitivanih tretmana, nisu razmatrana detaljnija poređenja.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 13. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata 19/5

Prilikom rasta *B. cinerea* na PDA podlozi sa 10% i više filtrata primećena je promena u morfologiji kolonija. Micelija *B. cinerea* je na ovim podlogama bila značajno ređa u odnosu na kolonije na kontrolnim Petri kutijama. Promena je primećena na svim Petri kutijama u kojima je podloga sa navedenom koncentracijom filtrata, nezavisno od toga da li je u pitanju filtrat sterilisan autoklaviranjem ili filtracijom. Nakon presejavanja kolonija sa izmenjenom micelijom na PDA i inkubacije razvijena je micelija normalne gustine.

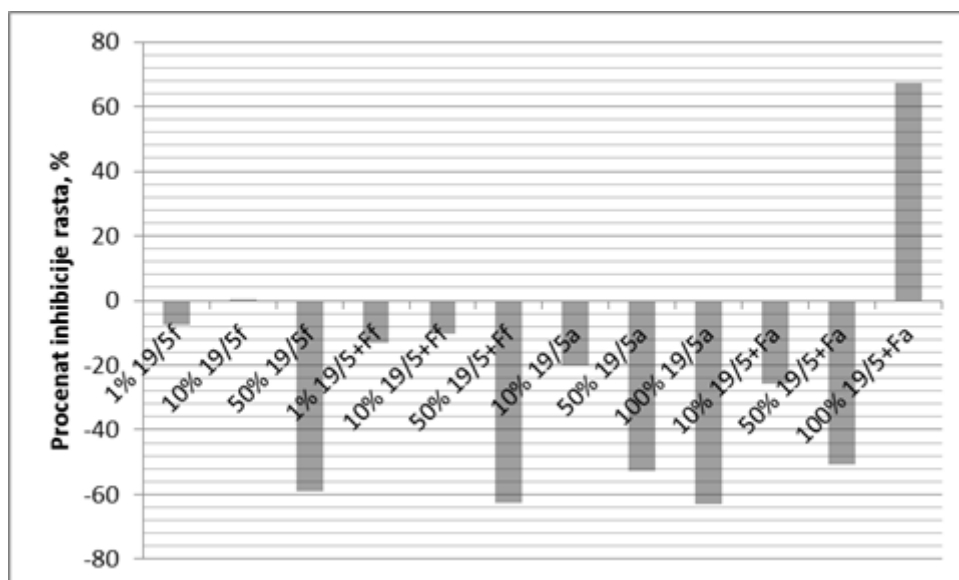
Uticaj filtrata tečne kulture *Rhizopus oryzae* (izolata 19/5) na rast *Fusarium oxysporum*

Ispitivani filtrati su doveli do stimulacije rasta *B. cinerea*, a kod jednog od tretmana je došlo do inhibicije (Grafikon 14).

Filtrati u koncentracijama od 1% i 10% sterilisani filtracijom (19/5f i 19/5+Ff) nisu imali statistički značajnog uticaja na rast *F. oxysporum*.

Jedino je filtrat 19/5+Fa u koncentraciji 100% inhibirao rast *F. oxysporum*, a procenat inhibicije je iznosio 67,5% (Grafikon 14).

Analiza varijanse i LSD vrednosti dati su u prilogima 8.16 i 8.1, ali s obzirom na rezultate koji ukazuju na izostanak inhibitornog efekta kod svih ispitivanih tretmana osim agarizovanog autoklaviranog filtrata dvojne kulture, nisu razmatrana detaljnija poređenja.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 14. Procenat inhibicije rasta *Fusarium oxysporum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata 19/5

Filtrat 19/5f pri koncentraciji 50% uticao je na gubitak crvenog pigmenta *F. oxysporum*, dok je ista koncentracija 19/5+Ff filtrata uticala na pojavu kolonija tamno ljubičaste boje. Kolonije razvijene pri različitim koncentracijama 19/5+Fa takođe su imale izraženiju ljubičastu pigmentaciju u odnosu na one koje su se razvile na podlogama koje sadrže filtrat 19/5a. Kolonije *F. oxysporum* razvijene u prisustvu 50% 19/5a filtrata su bile bele boje sa veoma malo ljubičastog pigmenta. Kolonije razvijene na 100% filtratu 19/5+Fa imale su veoma oskudnu bezbojnu miceliju. Nakon

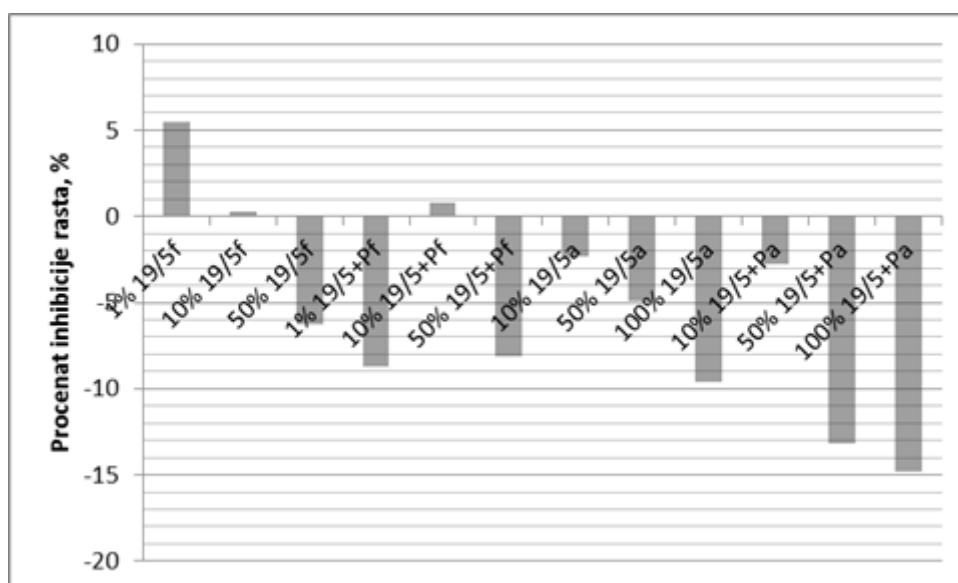


presejavanja kolonija izmenjene morfologije na PDA i inkubacije razvijena je micelija pigmentacije kao i na kontrolnim Petri kutijama.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Rhizopus oryzae* (izolata 19/5) na rast *Pythium aphanidermatum*

Filtrati izolata 19/5 nisu doveli do smanjenja prečnika kolonija *P. aphanidermatum*, osim na podlogama koje su sadržale 1% 19/5f filtrata gde je doslo do statistički značajne inhibicije od 5,5%. Većina ispitivanih filtrata je dovela do povećanja prečnika kolonija, a najveći procenat stimulacije rasta je iznosio 14,8%, na 100% 19/5+Pa. (Grafikon 15).

Analiza varijanse i LSD vrednosti su dati u priložima 8.17 i 8.1, ali s obzirom na rezultate koji ukazuju na izostanak inhibitornog efekta kod svih ispitivanih tretmana osim 1% 19/5f koji je doveo do slabog procenta inhibicije, nisu razmatrana detaljnija poređenja.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 15. Procenat inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata 19/5

Iako je 100% agarizovani autoklavirani filtrat 10/5 uticao da kolonije *P. aphanidermatum* imaju značajno veći prečnik u odnosu na kolonije na PDA, njihova morfologija je bila izmenjena. Micelija je bila veoma tanka sa retkim hifama koje rastu

uz podlogu. Nakon presejavanja izmenjenih kolonija na PDA i inkubacije razvijena je micelija uobičajene gustine.

#### Potencijal metabolita *Rhizopus oryzae* (izolata 19/5) u suzbijanju fitopatogena

Izolat 19/5 se u konfrontacijskom testu usled brzog rasta pokazao kao dobar kompetitor i nije doveo do inhibicije rasta samo u slučaju *P. aphanidermatum* koji se takođe odlikuje brzim rastom. U slučaju *B. cinerea* došlo je do potpunog prerastanja kolonije fitopatogene gljive od strane izolata, dok je kod *F. oxysporum* izolat doveo do potpune inhibicije rasta. S obzirom da filtrati izolata nisu doveli do inhibicije rasta fitopatogena, može se zaključiti da su direktni vidovi mehanizma zaduženi za rezultat u konfrontacijskom testu i da ne dolazi do efekta ekstracelularnih jedinjenja izolata na rast fitopatogena. Međutim, kod sva tri ispitivana fitopatogena došlo je do reverzibilnih morfoloških promena usled prisustva filtrata tečne kulture izolata koje mogu odražavati fiziološke promene koje nastaju kao odgovor na prisustvo određenih metabolita.

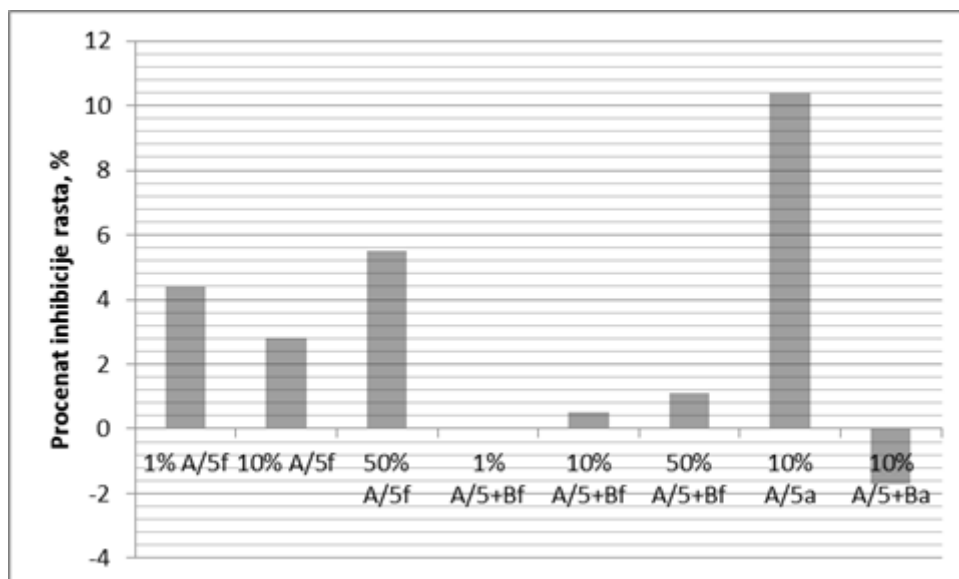
#### **5.4.6. Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus* sp. (izolata A/5) na rast fitopatogena**

Ispitivane koncentracije filtrata izolata A/5 se razlikuju od koncentracija filtrata ostalih gljiva, jer zbog kisele reakcije tečne podloge nakon inkubacije i razvića gljive nije bilo moguće istu agarizovati u slučaju koncentracija viših od 10% kod sirovih filtrata sterilisanih autoklaviranjem. Iz ovog razloga je i statistička obrada podataka podrazumevala dvofaktorijalnu analizu varijanse sa vrednostima rasta gljive pri dodatku različitih filtrata koncentracije 10%. Umesto tri faktora tako su posmatrana dva – način sterilizacije i prisustvo fitopatogene gljive u tečnoj kulturi.

Filtrati *Aspergillus* sp., izolata A/5, su u različitoj meri inhibirali rast *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *P. aphanidermatum* (Grafikon 16, 17 i 18).

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus* sp. (izolata A/5) na rast *Botrytis cinerea*

Dunnnett-ov test pokazao je da samo jedan tretman ima značajan uticaj na rast *B. cinerea* na nivou značajnosti 0,05. U pitanju je 10% autoklavirani filtrat čiste kulture (A/5a) koji je inhibirao rast za 10,4% (Grafikon 16). Ostali tretmani nisu se statistički značajno razlikovali od kontrole na nivou 0,05. S obzirom na navedeni rezultat, nisu razmatrana detaljnija poređenja tretmana.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 16. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata A/5

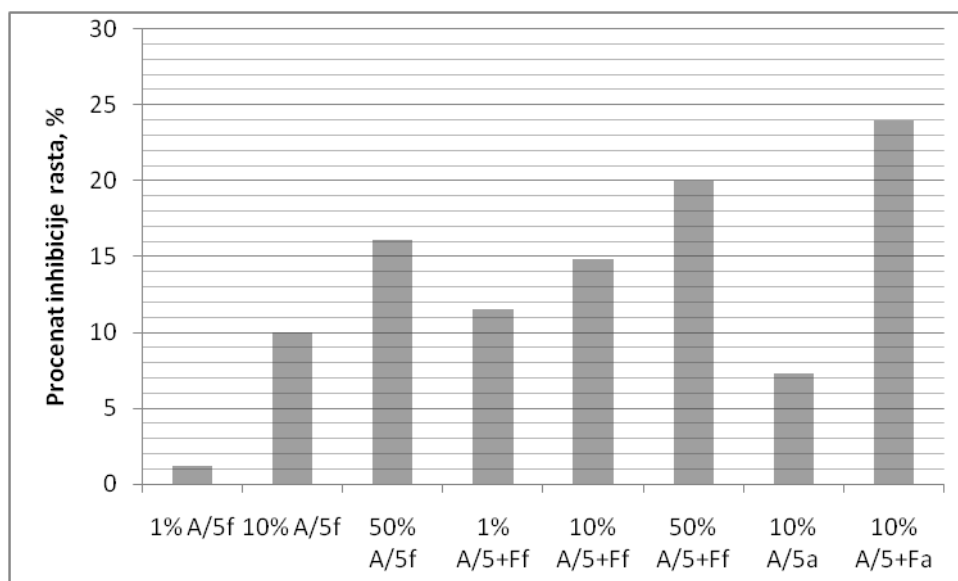
Nisu primećene morfološke promene pri rastu *B. cinerea* u prisustvu različitih koncentracija filtrata izolata A/5.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus* sp. (izolata A/5) na rast *Fusarium oxysporum*

Svi tretmani osim 1% A/5f imali su statistički značajan uticaj na rast *F. oxysporum* na nivou značajnosti 0,05. Filtrati su u različitom stepenu inhibirali rast fitopatogene gljive, a najviši procenat inhibicije rasta imao je 10% A/5+Fa filtrata koji je iznosio 23,9% (Grafikon 17).

Analiza varijanse (Prilog 8.19) pokazala je da je prisustvo *F. oxysporum* u dvojnoj tečnoj kulturi značajan faktor. Dvojna tečna kultura je pri koncentraciji 10% pokazala statistički značajno veći procenat inhibicije u odnosu na čistu kulturu, što se ispoljilo kako kod autoklaviranih, tako i kod filtrata sterilisanih filtracijom.

Način sterilizacije uticao je tako da su autoklavirani filtrati dvojne kulture imali značajniji inhibitorni efekat u odnosu na isti tretman sa filtratom sterilisanim filtracijom, dok kod čiste kulture ne postoji značajna razlika između filtrata sterilisanih na različite načine.



Grafikon 17. Procenat inhibicije rasta *Fusarium oxysporum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata A/5

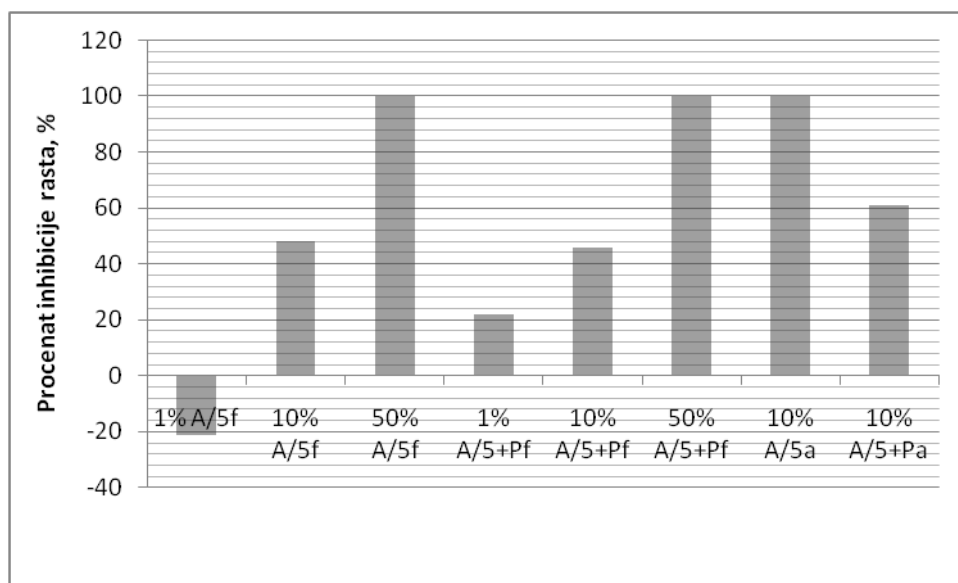
Pored promena u prečniku micelije *F. oxysporum* kod svih primenjenih tretmana je došlo i do morfoloških promena u izgledu kolonije, tako da je u manjoj ili većoj meri primećen gubitak crvenog pigmenta. Nakon presejavanja izmenjenih kolonija na PDA i inkubacije razvijena je micelija pigmentacije kao i na kontrolnim Petri kutijama.

#### Uticaj filtrata tečne kulture *Aspergillus* sp. (izolata A/5) na rast *Pythium aphanidermatum*

Svi ispitivani tretmani su pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu na nivou statističke značajnosti od 0,05. Osim 1% A/5f koji je stimulisao rast *P. aphanidermatum*, svi ostali filtrati doveli su do inhibicije rasta. Inhibicija rasta bila je najviša (100%) u slučaju oba 50% filtrata sterilisanih filtracijom (A/5f i A/5+Pf), kao i 10% autoklaviranog filtrata čiste kulture (Grafikon 18).

Dvofaktorijalna analiza varijanse sa tretmanima koncentracije 10% je pokazala da je značajan faktor kako način sterilizacije tako i prisustvo *P. aphanidermatum* u dvojnoj kulturi, a zastupljena je i interakcija ova dva faktora (Prilog 8.20). Poređenjem putem odgovarajućih LSD vrednosti (Prilog 8.1), može se zaključiti da je procenat inhibicije rasta je bio viši u slučaju autoklaviranih filtrata u odnosu na filtrirane i u slučaju dvojne i u slučaju čiste kulture. Filtrat čiste kulture je u većoj meri inhibirao rast u odnosu na filtrat dvojne kulture pri koncentraciji od 10% kod autoklaviranih filtrata,

dok kod filtriranih nije bilo statistički značajne razlike između filtrata dvojne i čiste kulture.



\*negativne vrednosti odnosi se na stimulaciju rasta

Grafikon 18. Procentat inhibicije rasta *Pythium aphanidermatum* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture izolata A/5

Osim promene u prečniku micelije, nisu primećene druge morfološke promene na kolonijama *P. aphanidermatum* u prisustvu filtrata izolata A/5.

#### Potencijal metabolita *Aspergillus* sp. (izolata A/5) u suzbijanju fitopatogena

Rezultati uticaja filtrata izolata na *B. cinerea* zajedno sa rezultatima konfrontacijskog testa u kome je došlo do inhibicije rasta *B. cinerea*, ali i prerastanja kolonije fitopatogene gljive od strane izolata A/5 ukazuju na značaj direktnih mehanizama antagonizma (kompeticije i mikoparazitizma) u interakciji ove dve gljive.

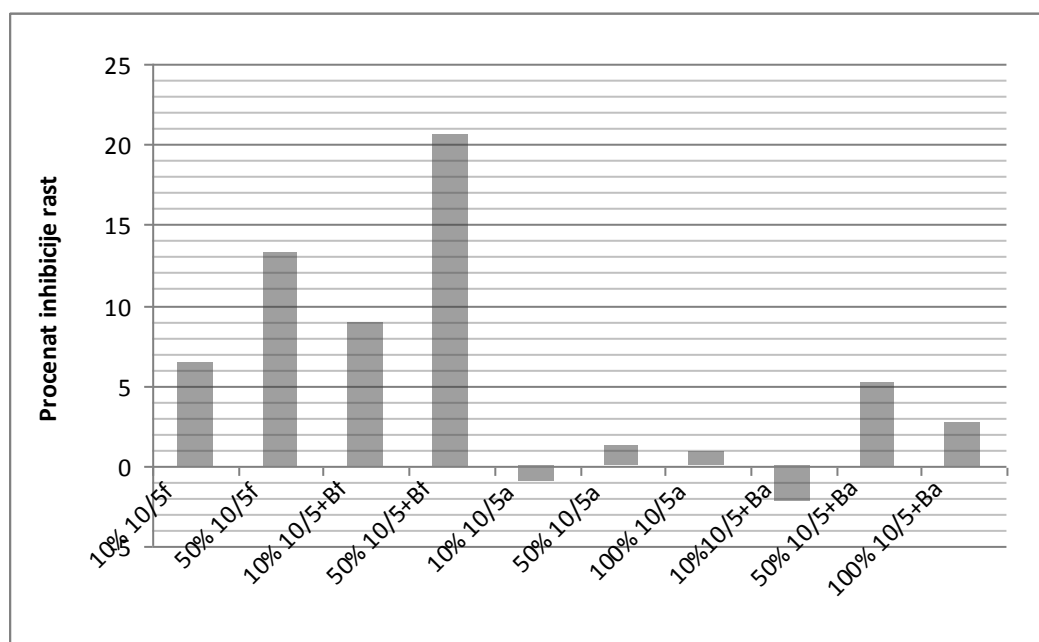
Izolat je doveo do inhibicije rasta *F. oxysporum* u konfrontacijskom testu, kao i morfoloških primena, a dobijeni filtrati su takođe imali značajan inhibitorni uticaj, što ukazuje na značaj sinteze ekstracelularnih metabolita na interakciju ove dve gljive. Stvaranje inhibitornih metabolita je indukovano prisustvom *F. oxysporum* u tečnoj kulturi, a inhibitorni efekat je pojačan nakon primenjenog autoklaviranja.

*P. aphanidermatum* se pokazao kao najosetljiviji fitopatogen na prisustvo filtrata izolata A/5. Ovaj rezultat je u skladu sa konfrontacijskim testom u kome je došlo do inhibicije rasta *P. aphanidermatum* za 81%. Do inhibicije je došlo u jednakoj meri

prilikom primene filtrata dvojne i čiste kulture sterilisane filtracijom, a tokom autoklaviranja filtrata došlo je do transformacija koje su imale za rezultat još izraženiji inhibični efekat.

#### 5.4.7. Uticaj filtrata tečne dvodnevnne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na rast *Botrytis cinerea*

Za ogled je odabrana kombinacija kod koje se pokazalo da autoklavirani filtrat sedmodnevne kulture u većoj meri utiče na inhibiciju rasta patogena. Kako su rezultati prethodnog ogleda pokazali da autoklavirani filtrat kulture izolata 10/5 ima značajno inhibično dejstvo na rast *B. cinerea*, a istraživanja antagonizma **Prapagdee i sar. (2008)** ukazuju na to da sekundarni metaboliti nastali u stacionarnoj fazi rasta mogu biti odgovorni za ovakav rezultat, ogled je ponovljen sa kulturom starom dva dana, a rezultati su prikazani u Grafikonu 19.



\*negativne vrednosti odnose se na stimulaciju rasta

Grafikon 19. Procenat inhibicije rasta *Botrytis cinerea* u prisustvu sterilnih filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) stare dva dana

Statistički značajan inhibični uticaj na rast *B. cinerea* na nivou značajnosti od 0,05 imali su filtrati sterilisani filtracijom: 50% 10/5f i 50% 10/5+Bf i 10% 10/5+Bf. Svi primenjeni autoklavirani filtrati, kao i 10% 10/5f nisu imali značajnog uticaja na rast fitopatogene gljive. Najveći procenat inhibicije iznosio je 20,7% u slučaju 50%

10/5+Bf (Grafikon 19), što je nešto niže od rezultata dobijenog nakon sedmodnevne inkubacije sa istom vrstom i koncentracijom filtrata.

Analiza varijanse (Prilog 8.12) potvrdila je da su način sterilizacije, koncentracija i prisustvo *B. cinerea* u dvojnjoj kulturi statistički značajani faktori pri ispitivanju uticaja filtrata tečne kulture (Prilog 8.12)

Način sterilizacije uticao je u smislu gubitka antifungalne aktivnosti filtrata prilikom autoklaviranja. To znači da u trajanju od 48h časova ne dolazi do stvaranja termostabilnih antifungalnih jedinjenja koja su imala udela u interakciji dve gljive nakon sedmodnevne inkubacije

Pri obe ispitivane koncentracije filtrat 10/5+Bf ima značajno veći inhibicioni uticaj u odnosu na filtrat 10/5f, tako da prisustvo *B. cinerea* i u ovako kratkom periodu u nekoj meri indukuje stvaranje antifungalnih metabolita od strane *T. longibrachiatum*, izolat 10/5.

Procenti inhibicije rasta bili su viši u tretmanima sa 50% filtrata u odnosu na tretmane sa 10%, kako kod filtrata čistih, tako i kod filtrata dvojnih kultura sterilisanih filtracijom.

Nisu primećene morfološke promene pri rastu *B. cinerea* u prisustvu različitih koncentracija filtrata dvodnevne tečne kulture izolata 10/5.

**Prapagdee i sar. (2008)** su ispitivali antagonizam aktinomicete *Streptomyces hygroscopicus* na fitopatogene gljive i došli do rezultata koji ukazuju na razlike u delovanju filtrata tečne kulture koji se dobija u eksponencionalnoj i stacionarnoj fazi rasta. U eksponencionalnog rasta nastaju filtrati koji gube inhibicioni efekat prilikom termičkog tretmana ili tretiranja proteinazom K, dok u filtrati kulture u stacionarnoj fazi rasta ne gube značajno na aktivnosti nakon istog tretmana. Autori pripisuju ovakav efekat prisustvu termostabilnih komponenata koje nastaju u stacionarnoj fazi rasta, dok su za delovanje filtrata eksponencionalne faze zaduženi metaboliti proteinske prirode – hidrolitički enzimi. Enzimi *Trichoderma* spp. navode se kao značajan mehanizam u suzbijanju *B. cinerea*. Pri tom proteaze imaju poseban značaj jer imaju dvostruko delovanje – utiču na klijanje spora i degradiraju enzime patogena zadužene za nekrozu tkiva (**Elad i Kapat, 1999**).

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije koji ukazuju na razlike u antifungalnoj aktivnosti filtrata sedmodnevne i dvodnevne kulture izolata 10/5 prema *B. cinerea*.

Dobijeni rezultati istraživanja potvrđuju specifičnost interakcija između gljiva. Pored specifičnosti međusobnih interakcija, specifičan je i uticaj različitih faktora koji utiču na ispoljeni antagonizam. Pri tom jedan isti izolat može imati različito inhibitorno dejstvo i ispoljiti različite mehanizme antagonizma prema različitim fitopatogenim gljivama. Iz toga se može doneti zaključak da se aktivnost laboratorijski potvrđenih antagonista i biokontrolnih agenasa mora ispitivati pojedinačno za svakog ciljanog fitopatogena što je od višestrukog značaja za uspešnu aplikaciju, selekciju i razmatranje različitih faktora koji utiču na interakciju dve gljive.

#### **5.5. *In vivo* uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na fitopatogene**

Kompost i agroindustrijski otpad dodati poljoprivrednom zemljištu značajno doprinose biodiverzitetu zemljišta delujući kao svojevrsni inokulum. Istraživanja koja govore o mikrobiološkoj prirodi suzbijanja biljnih patogena prilikom dodatka komposta u zemljište sugerišu da je ovakav material pogodan za izolaciju i selekciju potencijalnih antagonista. Nakon serije *in vitro* ogleda neophodno je ispitati efikasnost selektovanih antagonista i u uslovima staklenika.

Značajno veći broj radova je objavljen na temu antagonizma prema fitopatogenim gljivama *in vitro*. Jedan od razloga neuspešnosti laboratorijski potvrđenih sojeva u uslovima staklenika i polja je činjenica da je biološka kontrola zemljišnih fitopatogena kompleksna jer se bolest dešava u veoma dinamičnom okruženju – rizosferi koju odlikuje brza promenljivost i intenzivna mikrobiološka aktivnost (Handelsman i Stabb, 1996).

Cilj ove faze istraživanja je bilo utvrđivanje efikasnosti antagoniste koji je odabran prethodnim *in vitro* istraživanjem. Pored ostalih mehanizama koji imaju udela u antagonizmu *in vitro*, u *in vivo* ogledu se eventualno pridodaje i mehanizam indukcije imunog odgovora biljaka usled prisustva metabolita antagonista.

Za istraživanja je odabran izolat koji je imao značajan efekat u *in vitro* istraživanju – *T. longibrachiatum* (10/5), tačnije filtrat tečne kulture pomenutog izolata.



*In vitro* istraživanja u okviru disertacije su ukazala da metaboliti izolata prisutni u filtratu tečne kulture imaju inhibitorski efekat na rast biljnih patogena, a dodatno literaturni podaci ukazuju da primena metabolita *Trichoderma* sp. dovodi i do indukovane rezistencije biljaka na bolesti uzrokovane bakterijama i gljivama (Jayalakshmi i sar., 2009; Benítez i sar., 2004). *Trichoderma* spp. se koristi u biološkoj kontroli bolesti izazvanih uzročnicima iz rodova *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Botrytis* i *Rhizoctonia* u mnogim usevima kao što su usevi zelene salate, jabuka, kukuruza šećerca, šargarepe, luka, grožđa, pasulja i drugih (Benítez i sar., 2004). S obzirom da je izolat 10/5 identifikovan kao *T. longibrachiatum* koja je poznata kao patogena vrsta roda *Trichoderma*, kako bi se zadovoljili uslovi primene sa bezbednosnog aspekta koje je definisao Cook (1996), izbegnuto je uvođenje živog organizma u zemljište. U ogleđima je primenjen autoklavirani filtrat tečne kulture.

Korisni mikroorganizmi prisutni u zemljištu interaguju sa biljkama i fitopatogenima i imaju važnu ulogu kao biofertilizatori i biofungicidi (Singh i sar., 2011). Biofungicidi se pretežno koriste za sprečavanje razvoja bolesti tako da nisu efikasni nakon već ostvarene infekcije (Whipps i Lumsden 2001). Stoga je važno da trenutak primene primene bude u skladu sa periodom osetljivosti useva (Whipps i Lumsden 2001). U ogleđima je istovremeno izvršena inokulacija patogenom i tretiranje sterilnim filtratom antagoniste.

#### 5.5.1. *In vivo* uticaj filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na *Botrytis cinerea*

Ogled pri kome je ispitivan uticaj sterilnog filtrata *T. longibrachiatum*, izolata 10/5, na *B. cinerea* izveden je dva puta. U prvom ogleđu je primenjeno je četiri semena inokuluma uz koren svake biljke i u drugom ogleđu po tri semena inokuluma uz koren svake biljke. U tabeli 25 prikazani su podaci o pojavi poleganja biljaka krastavca čiji je prouzrokovatelj *B. cinerea* u ogleđu sa većom količinom inokuluma.

Tabela 25. Intenzitet oboljenja i efikasnost sterilnog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* izolata 10/5 na *Botrytis cinerea*, ogled sa većom količinom inokuluma

Tretmani	Ms.	Sd	Efikasost (%)
<b>Negativna kontrola (NK)</b>	0,0 <sup>a</sup>	0,0	100
<b>Pozitivna kontrola (PK)</b>	7,8 <sup>c</sup>	0,4	22
<b>Fenheksamid (F)</b>	5,8 <sup>b</sup>	1,6	42
<b>Sterilan filtrat izolata 10/5</b>	6,6 <sup>bc</sup>	1,1	34

$LSD_{0,05}=1,13$   $LSD_{0,01}=1,59$

Efikasnost u smanjenju intenziteta poleganja biljaka krastavca u tretmanu gde je primenjen sterilan filtrat izolata 10/5 iznosila je 34%, što se nije statistički značajno razlikovalo od intenziteta poleganja biljaka kod netretiranih inokuliranih biljaka (PK) gde je 88% pleglih biljaka, ali i efikasnosti tretmana sa fenheksamidom (42%). Efikasnost fenheksamida (F) se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na negativnu kontrolu (NK) i kontrolu (PK).



Slika 20. *In vivo* uticaj autoklaviranog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* izolata 10/5 na *Botrytis cinerea* – ogled sa većom količinom inokuluma (a: negativna kontrola, biljke inokulisane sterilnim zrnima pšenice, netretirane; b: biljke sa dodatim inokulumom *B. cinerea*, tretirane sterilnim filtratom tečne kulture *T. longibrachiatum*; c: biljke sa dodatim inokulumom *B. cinerea*, tretirane

fenheksamidom; d: pozitivna kontrola, biljke sa dodatim inokulumom *B. cinerea*, netretirane)

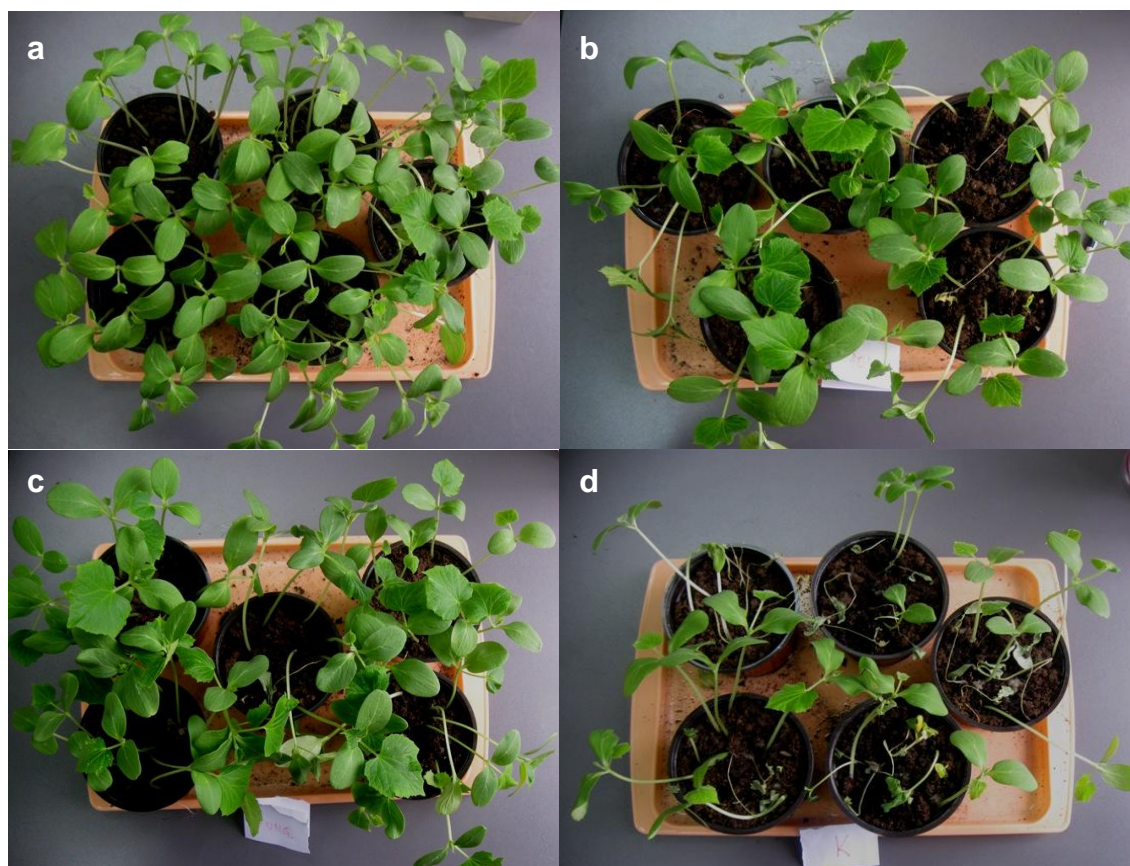
Pojava poleganja biljaka krastavca čiji je prouzročivač *B. cinerea* je u ogledu sa manjom količinom inokuluma bila različita u zavisnosti od primenjenog tretmana (Tabela 26).

Tabela 26. Intenzitet oboljenja i efikasnost sterilnog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* izolata 10/5 na *Botrytis cinerea*, ogled manjom količinom inokuluma

Tretmani	Ms.	Sd	Efikasost (%)
<b>Negativna kontrola (NK)</b>	0,0 <sup>a</sup>	0,0	100
<b>Pozitivna kontrola (PK)</b>	6,6 <sup>b</sup>	2,1	34
<b>Fenheksamid (F)</b>	0,4 <sup>a</sup>	0,5	96
<b>Sterilan filtrat izolata 10/5</b>	2,4 <sup>c</sup>	1,0	76

$LSD_{0,05}= 1,51$   $LSD_{0,01}=2,11$

Intenzitet zaraze biljaka krastavca u tretmanu gde je primenjen sterilan filtrat izolata 10/5 iznosio je 24%, što se statistički značajno razlikovalo od intenziteta zaraze biljaka kod netretiranih inokulisanih biljaka (PK) gde je iznosio 76%, ali i od tretmana fenheksamidom (F) i negativne kontrole (NK). Fenheksamid je pokazao efikasnost od 96%, koja se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na negativnu kontrolu (NK).



Slika 21. *In vivo* uticaj autoklaviranog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* izolata 10/5 na *Botrytis cinerea* – ogled sa manjom količinom inokuluma (a: negativna kontrola, biljke inokulisane sterilnim zrnima pšenice, netretirane; b: biljke sa dodatim inokulumom *B. cinerea*, tretirane sterilnim filtratom tečne kulture *T. longibrachiatum*; c: biljke sa dodatim inokulumom *B. cinerea*, tretirane fenheksamidom; d: pozitivna kontrola, biljke sa dodatim inokulumom *B. cinerea*, netretirane)

**Elmer i Reglinski (2006)** navode da se najbolji rezultati u primeni biološke kontrole pomoću *Trichoderma* sp. u suzbijanju bolesti izazvane *B. cinerea* postižu kada je niska ili umerena incidenca bolesti. Rezultati do kojih se došlo u istraživanjima u okviru disertacije su u skladu sa navedenim. Efikasnost primenjenog sterilnog filtrata *T. longibrachiatum*, izolat 10/5 bila je značajno viša (76%) u ogledu sa manjom količinom inokuluma *B. cinerea* u poređenju sa ogledom sa većom količinom (34%). Međutim, efikasnost fenheksamida kod primene veće količine inokuluma patogena takođe nije bila zadovoljavajuća (42%).

Iako je većina komercijalnih biopreparata sa *Trichoderma* sp. kao aktivnim agensom (npr. Trichodex 20P, Makhteshim Ltd., Izrael) namenjena suzbijanju *B. cinerea* u vinogradima, daju uspehe u suzbijanju ovog uzročnika bolesti različitih

biljaka u uslovima stakleničke proizvodnje gde je ovaj patogen takođe čest uzročnik problema (**Paulitz i Bélanger, 2001**).

#### 5.5.2. *In vivo* uticaj filtrata *Trichoderma longibrachiatum* (izolata 10/5) na *Fusarium oxysporum*

Pojava fuzarioznog uvenuća paprike je bila zastupljenja samo kod inokulisanih netretiranih biljaka (PK) (Tabela 27), dok su nakon perioda od dve nedelje sve biljke u tretirane filtratom izolata 10/5 i pesticidom, kao i biljke u negativnoj kontroli bile zdrave.

Efikasnost tretmana kaptanom (F) i sterilnim filtratom izolata 10/5 bila je maksimalna (100%), dok je u slučaju pozitivne kontrole (PK) iznosila 44%. Kod svih biljaka kod kojih je došlo do zaraze u pozitivnoj kontroli došlo je i do potpunog uvenuća i potom uginuća nakon dve nedelje od inokulacije (Slika 22).

Prosečna masa biljaka inokulisanih netretiranih biljaka paprike (PK) izmerena nakon dve nedelje bila je 1,38g. U varijanti netretiranih neinokulisanih biljaka (NK) prosečna masa biljaka iznosila je 4,24 g. Između primenjenih tretmana fungicidom i sterilnim filtratom izolata 10/5 nije postojala statistički značajna razlika, a prosečne vrednosti mase biljaka kod oba tretmana su se nalazile između vrednosti kontrole i apsolutne kontrole u odnosu na koje su pokazali statistički značajnu razliku.



Slika 22. *In vivo* uticaj autoklaviranog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum*, izolata 10/5 na *Fusarium oxysporum* (a: negativna kontrola, biljke inokulisane sterilnim zrnima pšenice, netretirane; b: biljke sa dodatim inokulumom *F. oxysporum*, tretirane sterilnim filtratom tečne kulture *T. longibrachiatum*; c: biljke sa dodatim inokulumom *F. oxysporum*, tretirane kaptanom; d: pozitivna kontrola, biljke sa dodatim inokulumom *F. oxysporum*, netretirane)

Tabela 27: Intenzitet oboljenja i efikasnost sterilnog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum* izolata 10/5 na *Fusarium oxysporum*

Tretmani	Masa vlažne biljke		Efikasnost
	Ms	Sd	
<b>Negativna kontrola (NK)</b>	4,24 <sup>a</sup>		100%
<b>Pozitivna kontrola (PK)</b>	1,38 <sup>c</sup>		44%
<b>Kaptan (F)</b>	2,97 <sup>b</sup>		100%
<b>Sterilan filtrat izolata 10/5</b>	2,68 <sup>b</sup>		100%

$LSD_{0,05}=0,93$   $LSD_{0,01}=1,26$

*F. oxysporum* je fitopatogen koji je rasprostranjen u gotovo svakom tipu zemljišta u svetu, stoga je kontrola ovog patogena značajan izazov (**Fravel i sar., 2003**). Vrste roda *Trichoderma* su se pokazale i u *in vivo* istraživanjima kao efikasne u borbi protiv bolesti izazvane *F. oxysporum* kod različitih biljaka. Najveća efikasnost je postignuta sa *T. harzianum*, ali su ispitivane i druge vrste. Soj *T. harzianum*, T-35 je redukovao pojavu bolesti dinje uzrokovane *F. oxysporum* sa 82% na 17%. Autori navode da dobijeni rezultati nisu bili u skladu sa *in vitro* testovima. Soj T-35 je bio efikasniji u odnosu na ostale u *in vivo* ogledu iako je u konfrontacijskom testu pokazao lošije rezultate, a izostala je i korelacija *in vitro* testova enzimske aktivnosti i rezultata dobijenih *in vivo* (**Ordentlich i sar., 1991**). Prethodni tretman zemljišta sa *T. harzianum* i do 92% redukuje pojavu bolesti izazvane *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (**Ramezani, 2010**).

*T. longibrachiatum* daje manje uspešne rezultate u suzbijanju *F. oxysporum* od nekih drugih ispitivanih *Trichoderma* sp. Ova vrsta ispitana je u uslovima staklenika na suzbijanje bolesti krompira izazvane *F. oxysporum* u radu **Ommati i Zaker (2012)** gde je njena efikasnost iznosila 48%, značajno manje u odnosu na ostale ispitivane sojeve roda *Trichoderma* koje su pokazale efikasnost i do 70%.

### 5.5.3. *In vivo* uticaj filtrata *Trichoderma longibrachiatum* (izolat 10/5) na *Pythium aphanidermatum*

Pojava poleganja biljaka krastavca čiji je prouzrokovatelj *P. aphanidermatum* je bila različita u zavisnosti od primenjenog tretmana (Tabela 28).

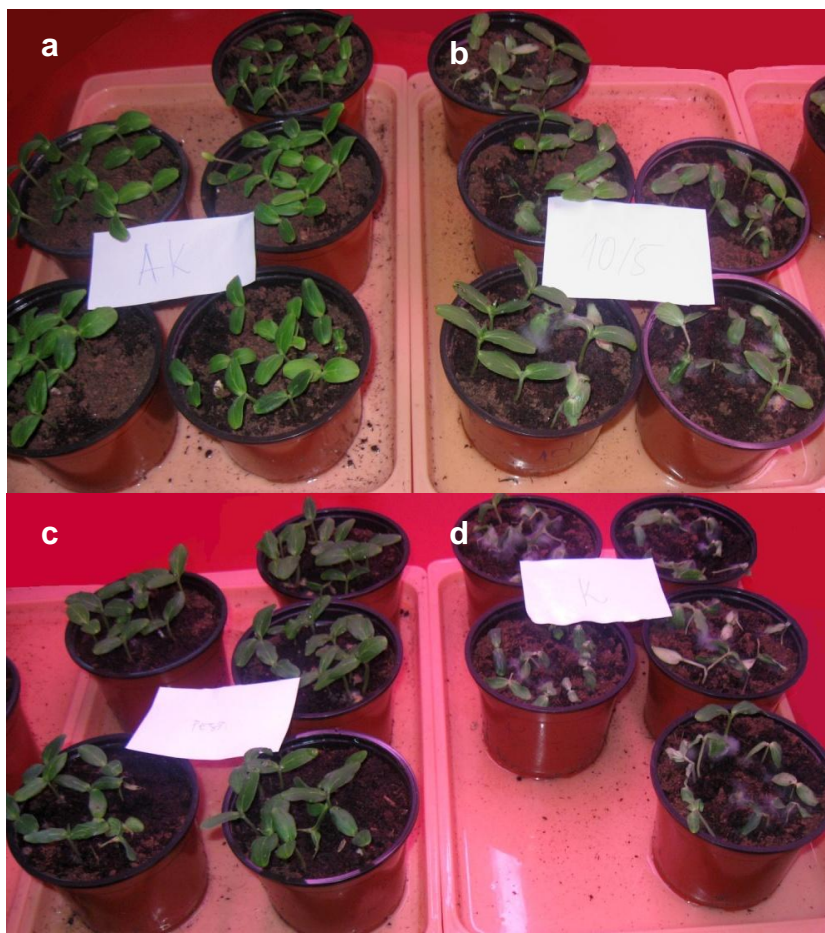
Tabela 28. Intenzitet oboljenja i efikasnost sterilnog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum*, izolata 10/5 na *Pythium aphanidermatum*

Tretmani	Ms.	Sd	Efikasnost (%)
<b>Negativna kontrola (NK)</b>	0,0 <sup>a</sup>	0,0	100
<b>Pozitivna kontrola (PK)</b>	9,4 <sup>c</sup>	0,5	6
<b>Propamokarb hidrohlorid (F)</b>	1,4 <sup>a</sup>	1,1	86
<b>Sterilan filtrat izolata 10/5</b>	5,0 <sup>b</sup>	2,0	50

$LSD_{0,05}=1,63$   $LSD_{0,01}=2,28$

U tretmanu pozitivne kontrole kod samo 6% biljaka nije došlo do poleganja, dok je kod ostalih doslo do potpunog uvenuća biljaka. Tretman sa sterilnim filtratom

izolata 10/5 koji je pokazao efikasnost od 50%, statistički se razlikovao od tretmana fungicidom čija efikasnost je bila 86%, ali i od negativne i pozitivne kontrole. Tretman fungicidom se statistički nije razlikovao od negativne kontrole.



Slika 23. *In vivo* uticaj autoklaviranog filtrata tečne kulture *Trichoderma longibrachiatum*, izolata 10/5 na *Pythium aphanidermatum* (a: negativna kontrola, biljke inokulisane sterilnim zrnima pšenice, netretirane; b: biljke sa dodatim inokulumom *P. aphanidermatum*, tretirane sterilnim filtratom tečne kulture *T. longibrachiatum*; c: biljke sa dodatim inokulumom *P. aphanidermatum*, tretirane propamokarb hidrohloridom; d: pozitivna kontrola, biljke sa dodatim inokulumom *P. aphanidermatum*, netretirane)

Bolesti koje izaziva *Pythium sp.* predstavljaju jedan od najvećih problema u stakleničkoj proizvodnji, a među najznačajnijim uzročnicima bolesti je *P. aphanidermatum*. Međutim, suzbijanje bolesti u uslovima staklenika se pokazalo kao pogodnije u odnosu na useve u polju usled veće kontrole uslova sredine, tako da biološka kontrola nalazi dosta uspeha u suzbijanju ovog patogena (Paulitz i Bélanger, 2001).



Mere koje su alternativa fungicidima u zaštiti biljaka od *P. aphanidermatum* imaju dosta uspeha. U literaturi se mogu naći podaci o uspešnom suzbijanju *P. aphanidermatum* koje je postignuto dodatkom komposta (**Mandelbaum i Hadar, 1990; Fuchs i Larbi, 2004; Theodore i Toribio, 1995**). Dodatak komposta zemljištu može imati efikasnost u suzbijanja bolesti izazvane *P. aphanidermatum* i do 90% (**Hadar i sar., 1992**).

Biološka kontrola uz pomoć antagonista *P. aphanidermatum* je imala takođe značajnog uspeha, što je dovelo i do komercijalizacije bioloških preparata među kojima su preparati na bazi *Trichoderma harzianum* (RootShield WP), *Gliocladium catenulatum* (Primastop, Kemira Agro Oy, Helsinki) i aktinomiceta (Mycostop, Kemira Agro Oy, Helsinki).

**Eisenberg i sar. (2001)** su definisali biološku kontrolu kao “upotrebu živih organizama u kontroli štetočina kada se kontrola postiže isključivo pomoću upotrebljenih organizama”. Pored biološke kontrole u užem smislu, zastupljeno je i proučavanje kroz pristup definisan kao “modifikacija okruženja ili postojeće prakse u cilju zaštite, a putem podsticanja specifičnih prirodnih neprijatelja ili drugih organizama kako bi se redukovao efekat štetočina”. Ova dva pristupa, odnosno biološka kontrola u užem i širem smislu su povezani jer saznanja o primeni određene poljoprivredne prakse koja doprinosi supresiji bolesti mogu biti putokaz za traženje novih antagonista fitopatogena.

Biološka kontrola zahteva dosta istraživanja koja će doprineti da se nedostaci i teškoće kod ovog pristupa prevaziđu. Slabija efikasnost biopreparata se može nadomestiti kombinovanjem sa ostalim merama u okviru integralnog pristupa zaštiti, a moguće je i kombinovanje sa nižim dozama hemijskih fungicida kojim bi se uz zadovoljavajuću efikasnost količina i štetni efekat hemijskih fungicida smanjili. Detaljno upoznavanje mehanizma antagonizma biokontrolnih agenasa prema fitopatogenima i faktora koji na taj antagonizam utiču može pospešiti uspešnost primene.

**Cook (1996)** je definisao potencijalne neželjene efekte koje može imati introdukcija biokontrolnih agenasa, a među njima su i bezbedonosni koji se odnose na potencijalnu alergnost, toksikogenost i patogenost sojeva. S obzirom da su naša istraživanja pokazala da izolovani sojevi koji pokazuju antagonizam prema biljnim

patogenima mogu biti alergeni, mikotoksikogeni i oportunistički patogeni, introdukcija ovakvih organizama u zemljište ne bi zadovoljila bezbedonosni aspekt. Međutim, zahvaljujući razvoju molekularne biologije i biotehnologije, ovakve probleme je moguće prevazići i iskoristiti potencijal takvih mikroorganizama. Analize ekspresije pojedinih gena patogena i antagonista daće više korisnih informacija o regulaciji patogeneze mehanizmima i karakteristikama biokontrole. Prečišćavanje u upotreba aktivnih metabolita kao i mogućnosti bioinženjeringa pružaju dodatne načine iskorišćavanja prirodnih antagonista.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu iznetih rezultata istraživanja, može se zaključiti sledeće:

1. Agroindustrijski otpad - komina grožđa, duvanski otpad i kompost od džibre međusobno se razlikuju u brojnosti populacija mikroorganizama, ali je brojnost gljiva u svim uzorcima uporediva sa plodnim zemljištima.  
Takođe, uočene su razlike u stepenu fekalne kontaminacije određene preko broja ukupnih i fekalnih koliformnih bakterija i brojnosti *Escherichia coli*. Najviši stepen prisustva indikatora fekalne kontaminacije je prisutan u kompostu što ukazuje na neophodnost mera prevencije i kontrole kako bi upotreba bila bezbedna.
2. Od ukupnog broja izolata 13% izolata gljiva pokazalo je antagonizam prema bar jednoj od tri ispitivane fitopatogene vrste u konfrontacijskom testu. Na osnovu rezultata konfrontacijskog testa se može zaključiti da su zastupljeni različiti mehanizmi antagonizma izolata prema fitopatogenim vrstama, a ispoljene interakcije specifične su za određeni par izolata i fitopatogena. Izolati su ispoljili različite mehanizme prema različitim fitopatogenima. Mehanizmi antagonizma su ispoljeni kao: pojava zone inhibicije, smanjenje prečnika kolonije, uticaj na radijalan rast (smanjenje poluprečnika kolonije), prerastanje kolonije fitopatogena, promene u morfologiji izolata ili fitopatogena. Visok i veoma visok procenat inhibicije rasta ispoljili su izolati K7/1, 10/5 i prema *Botrytis cinerea*, izolat 19/5 prema *Fusarium oxysporum* i K7/1, 10/5 i A/5 prema *Pythium aphanidermatum*.
3. Morfološka karakterizacija izolata, uz odgajivačke i ekološke karakteristike, omogućila je identifikaciju odabranih izolata, ali je u slučaju izolata K7/1, 10/5 i A/5 izvršena identifikacija do nivoa grupe, odnosno sekcije usled nedostatka pouzdanog karaktera za razdvajanje morfološki srodnih vrsta. Gljive koje su ispoljile potencijal za suzbijanje ispitivanih biljnih patogena pripadaju rodovima *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* i *Rhizopus*.
4. Primenjene molekularne metode identifikacije u određenim slučajevima potvrdile su rezultat dobijen konvencionalnim metodama, a kod nekih izolata

omogućena je preciznija identifikacija do nivoa vrste u okviru sekcija ili grupa koje čine morfološki srodne vrste. Umnožavanje ITS regiona rDNK, sekvencioniranje i poređenje dobijenih sekvenci sa sekvencama u GenBank bazi podataka omogućilo je pouzdanu identifikaciju izolata K7/1 kao *Penicillium paneum*, izolata K16/2 kao *Aspergillus fumigatus* i izolata 19/5 kao *Rhizopus oryzae*. Identifikacija izolata K11/1 kao *Penicillium chrysogenum* na osnovu sekvence ITS rDNK nije bila moguća tako da je izvršena putem dodatnog umnožavanja i sekvencioniranja regiona gena za  $\beta$ -tubulin. Slično je bilo i sa izolatom 10/5 koji je identifikovan kao *Trichoderma longibrachiatum* umnožavanjem regiona gena za TEF-1 $\alpha$  jer sekvencija ITS rDNK nije bila dovoljno informativna. Pripadnost izolata A/5 određenoj vrsti u okviru *Aspergillus* sekcije *Nigri* nije bilo moguće na osnovu poređenja sekvenci ITS rDNK i gena za  $\beta$ -tubulin sa sekvencama u GenBank bazi podataka, stoga je prvi korak u narednim istraživanjima identifikacija putem umnožavanja dodatnih genskih regiona. Iako većina identifikovanih vrsta prema ispoljenom antagonističkom delovanju poseduje potencijal za suzbijanje biljnih patogena, njihovoj primeni treba pristupiti sa oprezom s obzirom na to da se među izolatima nalaze i mikotoksikogeni, oportunistički patogeni i alergeni.

5. Enzimska karakterizacija je ukazala na različitu mogućnost izolata da koriste različite izvore ugljenika. Na osnovu ispoljene aktivnosti N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze izolata K11/1, K16/2, 10/5 i A/5 i  $\beta$ -glukozidaze izolata 10/5 i 19/5 može se zaključiti da je delovanje navedenih enzima jedan od mogućih mehanizama ispoljenog antagonizma prema fitopatogenima.
6. Ekstracelularni metaboliti identifikovanih izolata gljiva različito su uticali na ispitivane fitopatogene vrste. Ekstracelularni metaboliti uglavnom su uticali na smanjenje prečnika kolonija fitopatogenih gljiva *B. cinerea* i *P. aphanidermatum*, dok je najveći broj metabolita uticao na stimulaciju rasta *F. oxysporum*. Trofaktorijalna analiza varijanse je pokazala da u najvećem broju interakcija između gljiva iz agroindustrijskog otpada i fitopatogena, statistički značajan uticaj na efekat filtrata tečnih kultura imaju način sterilizacije, koncentracija i rast u prisustvu fitopatogena.

7. Filtrati tečnih kultura gljiva K7/1, K11/1, K16/2, 10/5 uticali su na smanjenje prečnika kolonija gljiva *B. cinerea*. Najveće smanjenje je zabeleženo pod uticajem autoklaviranog filtrata dvojne kulture izolata K11/1 i *B. cinerea* i iznosi 100%. U nekim slučajevima je došlo do stimulacije rasta, a najveći procenat stimulacije rasta od 35,8% određen je pri rastu na podlozi sa 10% filtrata izolata 19/5 sterilisanog filtracijom.
8. Fitopatogena vrsta na koju su ekstracelularni metaboliti izolata imali najslabiji uticaj je *F. oxysporum*. Filtrati tečne kulture gljiva K7/1, K11/1, K16/2, 19/5 i A/5 uticali su na stimulaciju rasta kolonija *F. oxysporum*. U najvećem broju slučajeva uticaj na rast fitopatogena pratile su i morfološke promene, odnosno promene u pigmentaciji kolonija. Na smanjenje prečnika kolonija *F. oxysporum* u najvećoj meri su uticali filtrati izolata A/5 pri čemu je 10% autoklavirani filtrat dvojne kulture inhibirao rast *F. oxysporum* za 23,9%.
9. Filtrati tečnih kultura gljiva K7/1, K11/1, K16/2, 10/5, A/5 imali su značajan uticaj na smanjenje prečnika kolonija *P. aphanidermatum*. Najveće smanjenje je zabeleženo pod uticajem ekstracelularnih metabolita izolata A/5 i iznosi 100%.
10. Svi ispitivani filtrati čistih kultura izolata gljiva, uticali su na smanjenje prečnika kolonija fitopatogenih vrsta. Najveći stepen inhibicije je bio kod izolata A/5 čiji filtrat čiste kulture je pri koncentraciji od 50% doveo do inhibicije rasta *P. aphanidermatum* od 100%.
11. Filtrati dvojnih kultura izolata i fitopatogene vrste imali su inhibitoran efekat na istu fitopatogenu vrstu, a stepen inhibicije rasta je različit. Značajnije inhibitorno dejstvo filtrata na *B. cinerea* zabeleženo je pri rastu na filtratu dvojnih kultura izolata K7/1, K11/1 i K16/2 u odnosu na filtrate čistih kultura.
12. Način sterilizacije filtrata je različito uticao na rast fitopatogenih gljiva. Svi filtrati ispitivanih izolata sterilisani filtracijom uticali su na inhibiciju rasta fitopatogena. Najveći stepen inhibicije je bio kod izolata A/5 čiji filtrat čiste kulture sterilisan filtracijom je doveo do inhibicije rasta *P. aphanidermatum* od 100%. Pored očekivanog inhibitornog efekta filtrata sterilisanih filtracijom, značajan broj autoklaviranih filtrata ispoljio je inhibitorno dejstvo. Može se pretpostaviti da je za ovakav efekat odgovorno prisustvo termostabilnih metabolita ili jedinjenja koja su se formirala tokom autoklaviranja. Najveći

- inhibitorni efekat od 100% imao je autoklavirani filtrat čiste kulture izolata A/5 na rast *P. aphanidermatum*. Efekat inhibitornog delovanja autoklaviranih filtrata tečnih kultura izolata 10/5 na *B. cinerea* se gubi ukoliko se vreme inkubacije sa sedam dana smanji na 48 h. Kraćom inkubacijom nastaju termolabilni metaboliti, a njihova sinteza od strane izolata je bila indukovana prisustvom fitopatogena.
13. Filtrati izolata 19/5 imali su najslabiji inhibitorni efekat na fitopatogene, a filtrati izolata A/5 su u najvećem procentu inhibirali rast fitopatogena. S obzirom na izostanak inhibitornog uticaja ekstracelularnih metabolita, antagonizam *R. oryzae* izolata 19/5 prema fitopatogenima može se pripisati direktnim vidovima antagonizma, dok su ostali izolati ispoljili kako direktne tako i indirektno mehanizme. Filtrati izolata A/5 su doveli do najvećeg procenta inhibicije, koji je iznosio 100% u slučaju *P. aphanidermatum*, a ovo je ujedno i jedini izolat čiji filtrat je inhibirao rast *F. oxysporum*.
  14. Izolati mogu delovati različitim mehanizmima na različite fitopatogene i ovi mehanizmi nemaju isti odgovor na pojedine faktore. Tako metaboliti izolata K16/2 deluju na rast *B. cinerea* samo ukoliko se izolat razvija u prisustvu fitopatogena, dok na *P. aphanidermatum* uticaja ima samo filtrat čiste kulture istog izolata. Ovi rezultati ukazuju na specifičnost odnosa izolovanih vrsta iz agroindustrijskog otpada i patogena.
  15. Efikasnost autoklaviranog filtrata tečne kulture *T. longibrachiatum*, izolata 10/5 u suzbijanju fitopatogena potvrđena je u uslovima staklenika. Filtrat je ispoljio statistički značajnu efikasnost u suzbijanju poleganja krastavca izazvanog uzročnikom *B. cinerea* u ogledu sa manjom količinom inokuluma. Procenat zaraženih biljaka je iznosio 24% u odnosu na inokulisane netretirane biljke gde je došlo do uginuća 66% biljaka. Prilikom primene veće količine inokuluma nije postignut uticaj na incidencu bolesti primenom filtrata. Efikasnost istog filtrata u suzbijanju fuzarioznog uvenuća paprike uzrokovane vrstom *F. oxysporum* je bila maksimalna (100%), ista kao pri primeni sintetičkog fungicida u kontroli. U suzbijanju *P. aphanidermatum* kao uzrokovača poleganja krastavca u uslovima staklenika filtrat je pokazao efikasnost od 50%, što je značajno u poređenju sa

94% zaraženih biljaka u pozitivnoj kontroli (inokulisane netretirane biljke), ali niže od efikasnosti upotrebljenog fungicida.

16. Opšti zaključak disertacije je da ispitivani agroindustrijski otpad u okviru diverziteta gljiva poseduje potencijal u suzbijanju biljnih patogena. Većina odabranih izolata proizvodi aktivne antifungalne metabolite, što otvara put za dalja istraživanja koja bi rasvetlila mogućnosti primene u biotehnologiji.

## 7. LITERATURA

1. Abe, A., Oda, Y., Asano, K., Sone, T., 2007. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. *Mycologia*, 99: 714–722.
2. Adediran, J. A. , Mnkeni, P. N. S., Mafu, N. C., Muyima, N. Y. O., 2004. Changes in Chemical Properties and Temperature during the Composting of Tobacco Waste with Other Organic Materials, and Effects of Resulting Composts on Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Biological Agriculture and Horticulture*, 22: 101-119.
3. Afzal, H., Shazad, S., Quamar Un Nisa, S., 2013. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana district (Sindh, Pacistan). *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 1: 105-117.
4. Alabouvette, C., Lemanceau, P., Steinberg, C., 1993. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. *Pesticides Science* 37: 365–373.
5. Alabouvette, C., Olivian, C., Migheli, Q., Steinberg, C., 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184: 529-544.
6. Alexander, R., 1999. Compost markets grow with environmental applications. *BioCycle Magazine*, March: 43–44.
7. Almri, S., Hashem, M., Mostafa, Y. S., 2012. In vitro and in vivo biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Sci.* 17: 155-167.
8. Al-Mahrđi, A. Y., Mahmoud, A. L. E., Al-Jebouri, 2012. Biodegradation of Agricultural Plant Residues by Some Fungal isolates from Yemen. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 3: 41-51.
9. Anastasi, A., Varese, G. C., Voyron, S., Scannerini, S., Marchisio, V. F., 2004. Characterization of fungal biodiversity in compost and vermicompost. *Compost Science and Utilization* 12: 185–191.
10. Anastasi, A., Carese, G. C., Marchisio, V. F., 2005. Isolation and identification of fungal communities in compost and vericompost. *Mycologia*, 97: 33-44.
11. Anderson, G. L., Kenney, S. J., Millner, P. D., Beuchat, L. R., Williams, P. L., 2006. Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiology*. 23: 146–153.



12. Armstrong, G. M., Armstrong, J. K., 1981. *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*, In: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy* (P.E. Nelson, T.A. Toussoun, R. Cook, Eds.). The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, pp. 391–399.
13. Arunachalam, M. K., Sharma, P., 2012. *Confrontation assay for Trichoderma as a potential biocontrol agent against Pythium aphanidermatum and Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 18: 74-77.
14. Asan, A., 2004. *Aspergillus, Penicillium, and Related Species Reported from Turkey*. *Mycotaxon* 89: 155–157.
15. Avilés, M., Borrero, C., Trillas, M. I., 2011. *Review on Compost as an Inducer of Disease Suppression in Plants Grown in Soilless Culture, Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 5 (Special Issue 2), 1-11.
16. Badalyan, S. M., Innocenti, G., Garibyan, N. G., 2004. *Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 44-48.
17. Bai, Z., Jin, B., Li, Y., Chen, J., Li, Z., 2008. *Utilization of winery wastes for Trichoderma viride biocontrol agent production by solid state fermentation*. *Journal of Environmental Sciences*, 20: 353-358.
18. Bailey, K. L., Lazarovits, G., 2003. *Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments*. *Soil and Tillage Research*, 72: 169-180.
19. Bari, M. A., Begum, M. F., Sarker, K. K., Rahma, M. A., Kabir, A. H., Alam, M. F., 2007. *Mode of action of Trichoderma spp. on organic solid waste for bioconversion*. *Plant Environmental Develop*, 1: 61-66.
20. Bascomb, S., Manafi, M., 1998. *Use of Enzyme Tests in Characterization and Identification of Aerobic and Facultatively Anaerobic Gram-Positive Cocci*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 318-340.
21. Bendahmane, S. B., Mahiout, D., Benzohra I. E., Benkada, M. Y., 2012. *Antagonism of Three Trichoderma Species Against Botrytis fabae and B. cinerea, the Causal Agents of Chocolate Spot of Faba Bean (Vicia faba L.) In Algeria*. *World Applied Sciences Journal*, 17: 278-283.
22. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C., 2004. *Biocontrol Mechanisms of Trichoderma strains*. *International Microbiology*, 7: 249-260.

23. Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., Smalla, K., 2005. Impact of Plant Species and Site on Rhizosphere-Associated Fungi Antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4203-4213.
24. Bissett, J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357–2372.
25. Bissett, J., 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924-931.
26. Bogumil, A., Paszt, L. S., Lisek, A., Trzciński, P., Harbuzov, A., 2013. Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Horticulturae*, 25/2: 123-132.
27. Bórrero, C., Trillas, M. I., Ordovás, J., Tello, J. C., Avilés, M., 2004. Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology*, 94: 1094-1101.
28. Bórrero, C., Ordovás, J., Trillas, M. I., Avilés, M., 2006. Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterized by Biolog®. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1631-1637.
29. Boulter, J., Boland, G. J., Trevors, J. T., 2002. Assessment of compost for suppression of Fusarium Patch (*Microdochium nivale*) and Typhula Blight (*Typhula ishikariensis*) snow molds of turfgrass. *Biological Control*, 25: 162-172.
30. Boysen, M., Skouboe, P., Frisvald, J., Rossen, L., 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology*, 142: 541-549.
31. Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., Mach, R. L., 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3959-3965.
32. Burgess, L. W., 1981. General ecology of the Fusaria. In: *Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy* (Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Cook, R.J., Eds.). Pennsylvania State University Press, University Park, PA. pp. 225–235.

33. Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M. D., 2008. Agrochemical characterization of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage*, 28: 372-380.
34. Castaño, R., Borrero, C., Avilés, M., 2011. Organic matter fractions by SP-MAS <sup>13</sup>C NMR and microbial communities involved in the suppression of *Fusarium* wilt in organic growth media. *Biological Control*, 58: 286-293.
35. Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., Bissett, J., 1998. Morphological and Molecular Identification of *Trichoderma* Isolates on North American Mushroom Farms. *Applied Environmental Microbiology*, 64:133-137.
36. Chaudhay, N., Marr, K. A., 2011. Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway diseases, *Clinical and Translational Allergy*, 1:4 doi:10.1186/2045-7022-14
37. Chellemi, D. O., Mitchell, D. J., Kannwischer-Mitchell, M. E., Rayside, P. A., 2000. *Pythium* spp. associated with bell pepper production in Florida. *Plant Disease*, 84:1271-1274.
38. Chen, S., Dong, H., Fan, Y., Li, W., Cohen, Y., 2006. Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces expression of pathogenesis related protein genes and resistance against wilt diseases in Bt transgenic cotton. *Biological Control*, 39: 460-464.
39. Chen, M-H., Nelson, E.B., 2008. Seed-colonizing microbes from municipal biosolids compost suppress *Pythium ultimum* damping-off on different plant species. *Phytopathology*, 98: 1012-1018.
40. Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., Dijksterhuis, J., 2004. Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatile Self-Inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2823-2829.
41. Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., Zhang, J., 2007. Soil Microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2971-2976.
42. Cook, R. J., 1996. Assuring the safe use of microbial biocontrol agents: A need for policy based on real rather than perceived risks. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18: 439-445.

43. Cook, R. J., Baker, K. F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul. Minnesota.
44. Craft, C. M., Nelson, E. B., 1996. Microbial properties of compost that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1550-1557.
45. Cunnington, J. H., Takamatsu, S., Lawrie, A.C., Pascoe, I. G., 2003. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). *Australasian Plant Pathology*, 32: 421–428.
46. De Sousa Fragoeiro, S. I., 2005. Use of fungi in bioremediation of pesticides, Ph. D. Thesis, Applied Mycology Group Institute of Bioscience and Technology, Cranfield university.
47. Diáñez, F., Santos, M., Tello, J. C., 2005. Suppression of Soilborne Pathogens by Compost: Suppressive Effects of Grape Marc Compost on Phytopathogenic Oomycetes. *Acta Horticulturae*, 697: 441-460.
48. Diáñez, F., Santos, M., Tello, J. C., 2007. Suppressive effects of grape marc compost on phytopathogenic oomycetes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 40: 1–18.
49. Dik, A. J., Wubben, J. P., 2007, Epidemiology of *Botrytis cinerea* Diseases in Greenhouses, In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., Eds.). Springer Netherlands. pp. 319-333.
50. Dong, H., Cohen, Y., 2001. Extracts of Killed *Penicillium chrysogenum* Induce Resistance Against Fusarium Wilt of Melon. *Phytoparasitica*, 29: 421-430.
51. Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska M., Ismail, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G. J., Kubicek, C. P., 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 358-368.
52. Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska M., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Belayneh, T. Kubicek, C. P., 2008. Alternative reproductive strategies of *Hypocrea orientalis* and genetically close but clonal *Trichoderma longibrachiatum*, both capable of causing invasive mycoses of humans. *Microbiology*, 154: 3447-3459.
53. Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., Mukherjee P. K., Zeilinger S., Grigoriev I. V., Kubicek C. P.,

2011. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 16: 749–759.
54. Duarte, M. L. R., Archer, S. A., 2003. *In Vitro* Toxin Production by *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 229-235.
55. Dubos, B., Bulit, J., Bugaret, Y., Verdu, D., 1978. The possibilities of using *Trichoderma viride* for the biological control of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* on grapevines. *Comptes Rendus des Seances de l' Academie d' Agriculture in France*, 14: 1159-1168.
56. Duijff, B. J., Bakker, P. A. H. M., Schlppers, B., 1994. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 279-288.
57. Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G., Alabouvette, C., 2001. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 61–71.
58. Eisenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46: 387–400.
59. Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., Haas, H., 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3: 561–563.
60. Elad, Y., 2001. TRICHODEX: commercialization of *Trichoderma harzianum* T39 – a case study. In: *Agro Report, Biopesticides: Trends and Opportunities* (Jarvis P., Ed.). Richmond, UK: PJB Publications Ltd, pp. 45 – 50.
61. Elad, Y., David, D. R., Levi, T., Kapat, A., Kirshner, B., 1999. *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: *Modern fungicides and antifungal compounds II* (Lyr., H., Russell, P. E., Dehne, H. W., Sisler, H. D., Eds.). Andover, Hants, UK: Intercept. pp. 459-467.
62. Elad, Y., Kapat, A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 177-189.
63. Elad, Y., Shtienberg, D., 1994. Effects of compost water extracts on grey mold *Botrytis cinerea*. *Crop Protection*, 13: 109-114.

64. Elinax, E., Voigt, K., 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity and Evolution*, 3: 185–194.
65. Ellis, D. H., 1997. Zygomycetes. In: Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*. 9th edition Edward Arnold London. pp. 247-277.
66. Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R., Bartley, R., 2007. *Description of medical fungi*, Second edition, Nexus Print Solutions, Adelaide, Australia.
67. Ellis, R. J., Timms-Wilson, T. M., Bailey, M. J., 2000. Identification of conserved traits in fluorescent *Pseudomonads* with antifungal activity. *Environmental Microbiology*, 2: 274-284.
68. El-Katatny, M. H., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A., Gübitz, G. M., 2001. Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 137-143.
69. Elmer, P. A. G., Michailides, T. J., 2004. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops, In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y. B., Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. pp. 243-272.
70. Elmer, P. A. G., Reglinski, T., 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55: 155–177.
71. EPPO, 2004. Guidelines for the efficacy evaluation of fungicides: Soil treatments against *Pythium* sp.– PP 1/148(2), in *EPPO Standards: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products*, 2, EPPO, Paris, pp. 157-159.
72. Escott, G. M., Hearn, V. M, Adams, D. J., 1998. Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Mycrobiology*, 144: 1575-1581.
73. Estrada, S., Katia R. F., Stangarlin, J. R., Pascholati, S. F., Kruegner, T. L., 1997. Enzymatic characterization of fungi by the API-ZYM system. *Fitopatologia Brasileira*, 22: 392-395.
74. Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C., Candela, M. E., 2007. Biological Control of Phytophthora Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology*, 155: 342-349.

75. Fravel, D. R., 2005. Commercialization and implementation of bio control. Annual review of phytopathology, 43: 337-359.
76. Fravel, D., Olivian, C., Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist, 157: 493-502.
77. Frisvald, J. C., Samson, R. A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Studies in Mycology, 49: 1-174.
78. Fuchs, J. G., 2010. Interactions Between Beneficial and Harmful Microorganisms: From the Composting Process to Compost Application, In: Microbes at Work. From wastes to resources (Insam, H., Franke-Whittle, I. H., Goberna, M., Eds.), Springer-Verlag Heindbelrg, Germany. pp. 213-230.
79. Fuchs, J., Larbi, M., 2004. Disease control with quality compost in pot and field trials. International Conference on soil and Composts eco-biology. Soil ACE, Biomase Peninsular. León-Spain, 157-166.
80. Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H. S., Pitt, J. I., Samson, RA. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics (Samson R. A., Pitt J. I., Eds). New York: Plenum Press, pp. 55–64.
81. Garcia-Martinez, S., Grau, A., Agulló, E., Bustamante, M. Á., Paredes, C., Moral, R., Ruiz, J. J., 2009. Use of composts derived from winery wastes in tomato crop. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 40: 445-452.
82. Gazis R., Rehner, S., Chaverri, P., 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. Molecular Ecology 20: 3001-3013.
83. Geiser, D. M., Jimenz, Gasco, M. M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., O'donell, K., 2004. FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology, 110: 473-479.
84. Gerba, P. C., Smith, J., 2005. Sources of Pathogenic Microorganisms and Their Fate during Land Application of Wastes. Journal of Environmental Quality, 34: 42-48.

85. Gershuny, G., 2011. Compost, Vermicompost and Compost Tea: Feeding the Soil on the Organic Farm. Northeast Organic Farming Association Interstate Council, USA
86. Glass, N. L., Donaldson, G., 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1323 -1330.
87. Glazebrook, J., 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* status. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 301-308.
88. Gochev, V., Montero, G., Kostov, G., Toscano, L., Stoytcheva, M., Krastanov, A., Georgieva A., 2012. Nutritive medium engineering enhanced production of extracellular lipase by *Trichoderma longibrachiatum*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26: 2875-2882.
89. Gong, C. M., Inoue, K., Inanaga, S., Someya, T., 2005. Survival of pathogenic bacteria in compost with special reference to *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Sciences, (China)*, 17: 770-774.
90. Gong, C. M., Koshida, J., Moriyama, N., Wang, X., Udou, T., Inoue, K., Someya, T., 2006. Occurrence and survival of coliform bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* in various manure and compost. *Soil Science & Plant Nutrition*, 52: 135-136.
91. Gorny, J., 2006. Microbial Contamination of Fresh Fruits and Vegetables, In: *Microbiology of Fruits and Vegetables* (Sapers, G. M., Gorny, J. R., Yousef, A.E., Eds.). CRC Press, Taylor and Francis Group, USA.
92. Gorodecki, B., Hadar, Y., 1990. Suppression of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in container media containing composted cattle manure and composted grape marc. *Crop Protection*, 9: 271:274.
93. Grades, M., White, T. F., Fortin, J., A., Bruns, T. D., Taylor, J. W., 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of the internal transcribed spacer. *Canadian Journal of Botany*, 69: 180-190.
94. Grigatti, M., Cavani, L., Ciavatta, C., 2011. The Evaluation of Stability during the Composting of Different Starting Materials: Comparison of Chemical and Biological Parameters. *Chemosphere*, 83: 41-48.



95. Gveroska, B., Ziberoski, J., 2011. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. *ATI - Applied Technologies & Innovations*, 7: 67-76.
96. Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 307-319.
97. Hadar, Y., Gorodecki, B., 1991. Suppression of germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in compost. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 303-306.
98. Hadar, Y., Mandelbaum, R., 1992. Suppressive Compost for Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *Phytoparasitica*, 20: S113-S116.
99. Hadar, Y., Mandelbaum, R., Gorodecki, B., 1992. Biological control of soilborne plant pathogens by suppressive compost, In: *Biological control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future* (Tjamos, E. C, Papavizas, G. C., Cook, R. J., Eds.), NATO ASI Series No. 230. Plenum Press, New York.
100. Handelsman, J., Stabb, E. V., 1996. Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens. *The Plant Cell*, 8: 1855-1869.
101. Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84: 377–393.
102. Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., Flores, C., Serrano-Carreón, L., 2002. Accurate and rapid viability assessment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence-based digital image analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 80: 677–684.
103. Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C., Kredics, L., 2007. Green Mold Diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*, 97:532–537.
104. Hatvani, L., 2008. Mushroom pathogenic *Trichoderma* species: occurrence, biodiversity, diagnosis and extracellular enzyme production, Ph.D dissertation, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged.
105. Hatvani, N., Kredics, L., Antal, Z., Mécés I., 2002. Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinus edodes* and *Mycoparasitic trichoderma* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 415-423.

106. He, C., Fan, Y., Liu, G., Zhang, H., 2008. Isolation and Identification of a Strain of *Aspergillus Tubingensis* With Deoxynivalenol Biotransformation Capability. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 2366–2375.
107. Hjeljord, L., Tronsmo, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview, In: *Trichoderma and Gliocladium* (Harman, G. E., Kubicek, C. P., Eds.), Taylor and Francis, London, UK. pp. 131-152.
108. Hoitink, H. A. J., 2004, Disease suppression with compost: history, principles and future. I International Conference: Soil and Compost Eco-biology, September, 15<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>, León, Spain.
109. Hoitink, H. A. J., Boehm, M. J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*, 37: 427-446.
110. Hoitink, H. A. J., Changa, C. M., 2004. Managing Soil-Borne Pathogens. A proceedings of the XXVI International Horticultural Congress: a sound rhizosphere to improve productivity in intensive horticultural systems. *Acta Horticulturae*, 635 87-92.
111. Hoitink, H. A. J., Stone, A. G., Grebus, M. E., 1996. Suppression of plant diseases by composts. In: *The Science of Composting* (De Bertoldi, M., Sequi, P., Lemmes, B. & Papi, T., Eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow. pp. 373-381.
112. Holmes, K. A., Schroers, H-J., Thomas, S. E., Evans, H. C., Samuels, G. J., 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycological Progress*, 3: 199-210.
113. Hong, S-B., Go, S-J., Shin, H-D., Frisvald, J. C., Samson, R. A., 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97: 1316-1329.
114. Horton, T. R., Bruns, T. D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10: 1855–1871.
115. Houbraken, J., Frisvad, J. C., Seifert, K. A., Overy, D. P., Tuthill, D. M., Valdez, J. G., *et al.*, 2012. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia – molecular phylogeny and evolution of fungi*, 29: 78–100.

116. Howell, C. R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.
117. Howell, C.R., Stipanovic, R. D., Lumsden, R. D., 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 435-441.
118. Huang, H. C., Erickson, R. S., 2002. Biological Control of Botrytis Stem and Blossom Blight of Lentil. *Plant Pathology Bulletin*, 11: 7-14.
119. Innerbner, G., Knapp, B., Vasara, T., Romantschuk, M., Insam, H., 2006. Traceability of ammonia oxidizing bacteria in compost-treated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1092-1100.
120. Jayalakshmi, S. K., Raju, S., Usha, R., Benagi, V. I., Sreeramulu, K., 2009. *Trichoderma harzianum* L<sub>1</sub> as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Australian Journal of Crop Science*, 3: 44-52.
121. Jeyaseelan, E. C., Tharmila, S., Niranjana, K., 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. *Archives of Applied Science Research*, 4: 1623-1627.
122. John, R. P., 2009. Biotechnological potentials of cassava bagasse, In: *Biotechnology of agro-industrial residues* (Singh nee' Nigam, P., Padney, A., Eds.). Springer Science + Business Media B. V. pp.226-238.
123. Jones, P., Martin, M., 2003. A review of the literature on the occurrence and survival of pathogens of animals and humans in green compost. A report for: Institute for Animal Health, Newbury, Berkshire, UK.
124. Joshi, D., Hooda, K. S., Bhatt, J. C., Mina, B. L., Gupta, G. S., 2009. Suppressive effect of composts on soil-borne and foliar diseases of French bean in the field in the western Indian Himalayas. *Crop Protection* 28: 608-615.
125. Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., Bhat, M. A., 2013. Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1: 39-57.

126. Kaiserer L., Oberparleiter, C., Weiler-Görz, R., Burgstaller, W., Leiter E., Marx, F., 2003. Characterization of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. Archives of Microbiology, 180: 204-210.
127. Kang, D., Son, G. H., Park, H.M., Kim J., Choi, J. N., Kim, H. Y., Lee, S., Hong, S-B., Lee, C. H., 2013. Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity. Fungal Biology, 117: 211-219.
128. Kanjanamaneesathian, M., Gaunt, R. E., Charigkapkorn, N., Pretcharat, V., Tareechai, N, 1994. *Penicillium* sp. as potential Biological Control Agent for Controlling *Rhizoctonia solani*. The Possible Mechanisms for *Rhizoctonia solani* suppression. Journal of Science and Technology, 16(3): 307-318.
129. Kapat, A., Zimand, G., Elad, Y., 1998. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolitic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 52: 127-137.
130. Karmakar, M., Ray, R. R., 2011. Optimization of production conditions of extra cellular  $\beta$ -glucosidase in submerged fermentation of waterhyacinth using response surface methodology by *Rhizopus oryzae* MTCC 9642. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2: 299-308.
131. Kaur, B. S., Sign D. G., Ricardo S. C. (Eds), 2014. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals, Springer ISBN: 978-1-4614-8004-4 (Print) 978-1-4614-8005-1 (Online)
132. Kavitha, T., Nelson, R., 2013. Exploiting the Biocontrol Activity of *Trichoderma* spp. Against root rot causing phytopathogens. APRN Journal of Agricultural and Biological Science, 8: 571-574.
133. Kavroulakis, N, Padopoulou, K. K., Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., 2006. Cytological and other aspects of pathogenesis-related gene expression in tomato plants grown on a suppressive compost. Annals of Botany, 98: 555-564.
134. Khare, A., Singh B. K., Upadhyay, R. S., 2010. Biological control of *Pythium aphanidermatum* causing damping-off of mustard by mutants of *Trichoderma viride* 1433. Journal of Agricultural Technology, 6: 231-243.
135. Khokhar, I., Mukhtar, I., Mushtaq, S., 2011. Comparative studies on the amylase and cellulase production of *Aspergillus* and *Penicillium*. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 15: 657 – 661.

136. Kiss, L., 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, 59: 475-483.
137. Klein, D., Eveleigh, D., E., 1998. Ecology of *Trichoderma*, In: *Trichoderma and Gliocladium* (C. P. Kubicek, Harman, G. E., Eds.). Taylor and Francis, London, UK. pp. 57–74.
138. Kloepper, J., Tuzun, S., Kuc, J., 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology*, 2: 347-349.
139. Koné, S. B., Dionne, A., Tweddell, R. J., Antoun, H., Avis, T. J., 2010. Suppressive effect of non-aerated compost teas on foliar fungal pathogens of tomato. *Biological Control*, 52: 167-173.
140. Kovacs, K., Szakacs, G., Pusztahelyi, T., Padney, A., 2004. Production of Chitinolytic Enzymes With *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in Solid Substrate Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118: 189-204.
141. Kredics, L., Antal Z., Szekeres A., Manczinger L., Dóczy I., Kevei F., Nagy E., 2004, Production of extracellular proteases by human pathogenic *Trichoderma longibrachiatum* strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 51: 283-295.
142. Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K., Lorito, M., 2001. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. *Plant Pathology*, 83: 11-23.
143. Kubicek, C. P., Harman, G. E. 1998. *Trichoderma and Gliocladium*, Volume I, Basic biology, taxonomy and genetics, Taylor & Francis Ltd., UK
144. Kuhls, K., Lieckfeldt E., Samuels G. J., Börner T., Meyer W., Kubicek C. P. , 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89: 442–460.
145. Kucuk, C, Kivanc, M., 2003. Isolation of *Trichoderma* Spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. *Turkish Journal of Biology*, 27: 247-253.
146. Lahlali, R., Hijri, M., 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters*, 311: 152–159.

147. Latge, J. P., 1999. *Aspergillus Fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 310-350.
148. Latorre, B. A., Lillo, C., Rioja, M. E., 2001. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 28: 61-66.
149. Leiter, É., Marx, F., Pusztahelyi, T., Haas, H., Pócsi, I., 2004. *Penicillium chrysogenum* glucose oxidase – a study on its antifungal effects. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1201–1209.
150. Leroux P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., Chapeland, F., 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58: 876-888.
151. Li, F. X., Ma, H. Q., Liu, J., Zhang, C., 2012. Antagonistic effects of *Bacillus cereus* strain B-02 on morphology, ultrastructure and cytophysiology of *Botrytis cinerea*. *Polish Journal of Microbiology*, 61:119-128.
152. Liao, W., 2005. Co-production of fumaric acid and chitin using *Rhizopus oryzae* fermentation on a nitrogen-rich agricultural residue – dairy manure, dissertation, Washington State University, Department of Biological Systems Engineering.
153. Lodha, S., Sharma, S. K., Aggarwal, R. K., 2002. Inactivation of *Macrophomina phaseolina* propagules during composting and effect of composts on dry root rot severity and on seed yield of clusterbean. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 253-261.
154. Lopes, F. C., Tichota, D. M., Periera, J. Q., Segalin, J., Rios, A. de O., Brandelli, A., 2013. Pigment Production by Filamentous Fungi on Agroindustrial Byproducts: an Eco-Friendly Alternative. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171: 616-625.
155. Lopes, F. C., Tichota, D. M., Sauter I. P., Meira, S. M. M., Segalin, J., Rott, M. B., Rios, A. O., Brandelli, A., 2013. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. *Annual Microbiology*, 63: 771–778.
156. Lorito, M., 1998. Chitinolytic enzymes and their genes, In: *Trichoderma* and *Gliocladium*, (G. E. Harman and C. P. Kubicek, Eds.), vol. 2. Taylor and Francis, London, United Kingdom. pp. 73–99.

157. Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., Kubicek, C. P., 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178: 6382–6385.
158. Lu, Y., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., Jansson, J. 2004. In Vivo Study of *Trichoderma*-Pathogen-Plant Interactions, Using Constitutive and Inducible Green Fluorescent Protein Reporter Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3073–3081.
159. Ma, Y., Chang, Z., Zhao, J., Zhou, M., 2008. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on Phytophthora root rot of chilli pepper. *Biological Control*, 44: 24-31.
160. Malandraki, I., Tjamos, S. E., Pantelides, I. S., Paplomatas, E. J., 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control*, 44: 180-187.
161. Mandelbaum, R. and Y. Hadar. 1990. Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Pythium aphanidermatum* in compost and peat container media. *Phytopathology*, 80: 794-804.
162. Marhuenda-Egea, F. C., Martínez-Sabater, E., Jordá, J., Moral, R., Bustamante, M. A., Paredes, C., Pérez-Murcia, M. D., 2007. Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: evaluation of the process by fluorescence excitation-emission matrix. *Chemosphere*, 68: 301-309.
163. Martin, F. N., Loper, J. E., 1999. Soilborne diseases caused by *Pythium* spp: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: 111-181.
164. Martínez-Álvarez, P., Alves-Santos, F. M., Diez, J. J., 2012. In Vitro and In Vivo Interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fennica*, 46: 303-316
165. Marx, F., Binder, U., Leiter, É., Pósci, I., 2008. Review: The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cellular Molecular Life Sciences*, 65: 445-454.
166. Matos-Moreira, M., Cunha, M., López- Mosequera, M. E., Rodriguez, T., Carral, E., 2012. Agro-Industrial Waste Management: A Case Study of Soil Fauna

- Responses to the Use of Biowaste as Meadow Fertiliser in Galizia, Nirthwestern Spain, In: Waste Management – An Integrated Vision (Rebellow, L. F., M., Ed.). ISBN: 978-953-51-0795-8, InTech, DOI: 10.5772/48075. pp. 157-186.
167. Mazza, G., 1995. Antocyanins in grapes and grape products. Critical reviews in Food Science and Nutrition, 35: 341-371.
168. Mazzola, M., 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. Antonie van Leeuwenhoek, 81: 557-564.
169. McKellar, M. E., Nelson, E. B., 2003. Compost-induced suppression of *Pythium* damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed colonizing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 69: 452-460.
170. Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Beal, S., Arnold, A. E., Hebbbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., Herre, E. A., 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. Biological Control, 46: 4-14.
171. Meraj-ul-Haque, Nandkar P. B., 2012. Antagonistic effect of rhizospheric *Trichoderma* isolates against tomato damping-off pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. International Journal of Research in BioSciences, 9: 523-524.
172. Migheli, Q., Friard, O., Ramón-Vidál, D., González-Candelas L., 1994. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Volume 21, pp. 395-398. Hypercellulolytic Transformants of *Trichoderma Longibrachiatum* are Active in Reducing *Pythium* Damping-Off on Cucumber
173. Mikkelsen, L., Sarrocco, S., Lubeck, M., Jensen, D. F., 2003. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. FEMS Microbiology Letters, 223: 135–139.
174. Mishra, V. K., 2010. *In vitro*, Antagonism of *Trichoderma* Species against *Pythium aphanidermatum*. Journal of Phytology, 2: 28-35.
175. Montealegre, J. R., Reyes, R., Perez, L. M., Herrera, R., Silva, P., Besoain, X., 2003. Selection of bio-antagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Electronic Journal of Biotechnology, 6:115-127.
176. Mucha, J., Dahm, H., Strzelczyk, E., Werner, A., 2006. Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. Archives of Microbiology, 185: 69–77.



177. Mukherjee, S., Karmakar, M., Ray, R. R., 2011. Production of extracellular exoglucanase by *Rhizopus oryzae* from submerged fermentation of agro wastes. *Recent Research in Science and Technology*, 3: 69-75.
178. Murali, M., Sudisha J., Amruthesh K. N., Shin-ichi Ito, Shekar Shetty H., 2013. Rhizosphere fungus *Penicillium chrysogenum* promotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in pearl millet. *Plant Biology*, 15: 111–118.
179. Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., Teixeira, J. A., 2012. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes, In: *Industrial Waste* (Show, K-Y., Ed.), ISBN: 978-953-51-0253-3., InTech, Shanghai, China, pp. 121-140.
180. Mustafa, A., Khan, M. A., Inam-ul-Haq, M., Pervez, M. A., Ummad-ud-Din U., 2009. Usefulness of different culture media for *in-vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against seed-borne fungi of economic importance. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 21: 83-88.
181. Nair, S., Pullammanappallil, P., 2013. Value added products from vineyard wastes – a review. *Proceedings of ORBIT 2013*, 108-118.
182. Narain, A., 1972. Control of some fungal diseases by antibiotics and crude plant extracts. *Proceedings Of The Indian National Science Academy Part B Biological Sciences*: 332-340.
183. Nelson, E. B., Boehm, M. J., 2002. Microbial Mechanics of Composted Induced Disease Suppression. Part II. *Biocycle* 43(7): 45-47.
184. Nicoletti, R., De Stefano, M., De Stefano, S., Trincone, A., Marziano, F., 2004. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. *Mycopathologia*, 158: 465–474.
185. Nicholson, F. A., Groves, S. J., Chambers, B. J., 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96: 135–143.
186. Nigam, P. S., 2009. Production of bioactive secondary metabolites, In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization* (Nigam, P.S., Pandey, A., Eds.). Springer, Netherlands. pp. 129-145.

187. Noble, R., Coventry, E., 2005. Suppression of soil borne plant diseases with compost: A review. *Biocintrol Science and Technology*, 15: 3-20.
188. Ntougias, S., Kavroulakis, N., Papadopoulou, K. K., Ehaliotis, C., Zervakis, G. I., 2010. Characterization of Cultivated Fungi Isolated from Grape Marc Wastes Through the Use of Amplified rDNA Restriction Analysis and Sequencing. *The Journal of Microbiology*, 48: 297-306.
189. Nzungize, J. R., Lyumugabe, F., Busogoro J-P., Baudoin, J. P., 2012. *Pythium* root rot of common bean: biology and control methods: A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16: 405-413.
190. O'Brien, M., Egan, D., O'kiley, P., Forristal, P. D., Doohan, F. M., Fuller, H. T., 2008. Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycological Research*, 112: 921-932.
191. O'Brien, M., Nielsen, L. F., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T., Frisvad, J. C., 2006. Mycotoxins and Other Secondary Metabolites Produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom Isolated from Baled Grass Silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9268–9276.
192. Odebode, A. C., 2006. Control of post harvest pathogens of fruits by culture filtrate from antagonistic fungi. *Journal of Plant Protection Research*, 46: 1-5.
193. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., Wand, Ploetz, R., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 2044-2049.
194. Okur, N., Kayikçioğlu, H. H., Okur, B., Delibacak, S., 2008. Oranic Amendment Based on Tobacco Waste Compost and Farmyard Manure: Influence on Soil Biological Properties and Butter-Head Lettuce Yield. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32: 91-99.
195. Ommati, F., Zaker, M., 2012. Evaluation of some *Trichoderma* isolates for biological control of potato wilt disease (*Fusarium oxysporum*) under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Crop Protection*, 1(4): 279-286.

196. Ordentlich, A., Migheli, Q., Chet, I., 1991. Biological control activity of three *Trichoderma* isolates against fusarium wilts of cotton and muskmelon and lack of correlation with their lytic enzymes, *Journal of Phytopathology*, 133: 177-186.
197. Padney, A., 2003. Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
198. Pal, K. K, McSpadden Gardener, B., 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
199. Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Scala, F., Bonanomi, G., 2011. Compost amendment enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control*, 56: 115-124.
200. Paradelo, R., Moldes, A. B., González, D., Barral, M. T., 2012. Plant tests for determining the suitability of grape marc composts as components of plant growth media. *Waste Management and Research*, 30: 1059-1065.
201. Parham, J. A., Deng, S. P., 2000. Detection, quantification and characterization of b-glucosaminidase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1183 – 1190
202. Park, J-Y., Okada, G., Takahashi, M., Oyaizu, H., 2002. Screening of fungal antagonists against yellows of cabbage caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Conglutinans*. *Mycoscience*, 43: 447-451.
203. Paulitz, T. C., Bélanger, R. R., 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 103-133.
204. Pepe, O., Ventrino, V., Blaiotta, G., 2013. Dynamic of functional groups during mesophilic composting of agro-industrial wastes and free-living (N<sub>2</sub>)-fixing bacteria application. *Waste management*, 33: 1616-1625.
205. Peper, I. L., Gerba, C. P., Brendencke, J. W., 1995. *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego. pp 11-33.
206. Perez, J., Munoz-Dorado, J., De-la-Rubia, T., Martinez, T., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5: 53-63.
207. Prapagdee, B., Kuekulvong, C., Mongkolsuk, S., 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4:330-337.

208. Pugliese, M., Liu, B. P., Gulliuono, M. L., Garibaldi, A., 2008. Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115 (5): 220–228.
209. Rajavaram, R. K., Bathini, S., Girisham, S., Reddy, S. M., 2010. Incidence of thermophilic fungi from different substrates in Andhra Pradesh (India). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol 11 ISSN 0975-6299.
210. Ramezani, H., 2010. Antagonistic effects of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causal agent of tomato wilt. *Plant Protection Journal*, 2: 167-173.
211. Raper, K. B., Fennell, D. I., 1965. *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Company.
212. Raper, K. B., Thom, C., 1949. *A manual of the Penicillia*. Baltimore : Williams Wilkins.
213. Raper, K. B., C. Thom, C., Fennell, D. I., 1968. *A Manual of the Penicillia*. Hafner Publishing Co., Inc., New York. pp. 395-401.
214. Reuveni, R., Raviv, M., Krasnovsky, A., Freiman, L., Medina, S., Bar, A., Orion, D., 2002. Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. *Crop Protection* 21: 583-587.
215. Roberts, S. M., Turner, N. J., Willetts, A. J., Turner M. K., 1995. *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*. Cambridge University Press, Cambridge, USA, pp. 69.
216. Rosales E., Pérez-Paz, A., Vázquez, X., Pazos, M., Sanromán, M. A., 2012. Isolation of novel benzo[a]anthracene-degrading microorganisms and continuous bioremediation in an expanded-bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35: 851–855.
217. Royer, J. C., Nakas, J. P., 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: 405–410.
218. Ru, Z., Di, W., 2012. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *African Journal of Biotechnology*, 11: 4180-4186.
219. Rym, M., Bechir, E., Farouk, M., 2012. Wine waste management: dyeing wool fabric with grape pomace. *International Journal of Current Research*, 4: 091-094.

220. Sabet, K. K., Saber M. M., El-Naggar, M. A-A., El-Mougy, N. S., El-Deeb, H. M., El-Shahawy, I. E-S., 2013. Using Commercial Compost as Control Measures against Cucumber Root-Rot Disease. *Journal of Mycology* Volume 2013, Article ID 324570, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/324570>
221. Sahi, I., Y., Khalid, A. N., 2007. In vitro biological control of *Fusarium oxysporum* - causing wilt in *Capsicum annuum*. *Mycopathologia*, 5: 85-88.
222. Sahile, S, Sakhuja, P. K., Fininsa, C., Ahmed, S., 2011. Potential antagonistic fungal species from Ethiopia for biological control of chocolate spot disease of faba bean. *African Crop Science Journal*, 19: 213-225.
223. Saito, K., Takakuwa, N., Oda, Y., 2004. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. *Microbiological Research*, 159: 83-86.
224. Saksirirat, W., Chareerak, P., Bunyatrachata, W., 2009. Induced systemic resistance of bio control fungus, *Trichoderma sp.* against bacterial and grey leaf spot in tomatoes. *Asian Journal of Food and Agro industry*, special issue: 99-104.
225. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 2000. Introduction to food-borne fungi. sixth edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
226. Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraken, J. A. M. P., Frisvad, J. C., 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin. *Studies in Mycology*, 49: 175-200.
227. Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Jaklitsch W. M., 2012. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity*, 55: 77–108.
228. Sanchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185-194.
229. Sandhu, D. K., Sidhu, M. S., 1985. Production, localization and glucose repression of beta-glucosidase in *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Basic Microbiology*, 25: 591-598.
230. Santos, M., Diánez, F., de Cara, M., Tello, J. C., 2008. Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresource Technology*, 99: 9040-9043.

231. Santos, M., Diáñez, F., González del Valle, M., Tello, J. C., 2008. Grape marc compost: microbial studies and suppression of soil-borne mycosis in vegetable seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1493–1505.
232. Schipper, M. A. A., 1984. A revision of the genus *Rhizopus* The Rh. *Stolonifer* - group and *Rh. oryzae* . *Stud Mycol* 25:1–19.
233. Sharma, R., 2012. A brief review on mechanism of *Trichoderma* fungus use as biological control agents. *International Journal of Inovations and Bio-Sciences*, 2: 200-210.
234. Sharma, P., 2011. Complexity of *Trichoderma*-*Fusarium* interaction and manifestation of biological control. *Australian Journal of Crop Sciences*, 5: 1027-1038.
235. Shelton, B. G., Kirkland, K. H., Flanders, W. D., Morris, G. K., 2002. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1743-1753.
236. Sheurell, S. J., Sullivan, D. M., Mahaffee, W. F, 2005. Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. *Phytopathology*, 95: 306-315.
237. Shishido, M., Miwa, C., Usami, T., Amemiya, Y., Johnson, K. B., 2005. Biological Control Efficiency of *Fusarium* Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in Different Environments. *Phytopathology*, 95: 1072-1080.
238. Siddiquee, S., Abdullah, F., Guan T. S., Aziz, E., R., 2007. Phylogenetic Relationship of *Trichoderma harzianum* Based on Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region – 1 of the r DNA. *Journal of Applied Sciences Research*, 3: 896-903.
239. Siddiqui, Y., Meon, S., Ismail, R., Rahmani, M., 2008. Bio-potential of compost tea from agro-waste to suppress *Choanephora cucurbitatum* L. the causal pathogen of wet rot of okra. *Biological Control*, 49: 38-44.
240. Silva, M. L., Macedo, A. C., Malcata, F. X., 2000. Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food Science and Technology International*, 6: 285-300.

241. Singh, R., Kapoor, V., Kumar, V., 2012. Utilization of Agro-industrial Wastes for the Simultaneous Production of Amylase and Xylanase by Thermophilic Actinomycetes. *Brasilian Journal of Microbiology*, 43: 1545- 1552.
242. Singh, J. S., Pandey, V. C., Singh, D. P., 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140: 339-353.
243. Sneh, B., 1998. Use of non-pathogenic of hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogens. *Biotechnology Advances*, 16: 1-32.
244. Snowdon, A. L., 2010. A colour atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, Vol. 2, Manson Publishing Ltd, London, UK. pp. 80-82.
245. Sookchaoy, K., Panthachode, S., Thipchu, J., 2009. Screening of *Trichoderma* spp. for *Phytophthora* root and foot rot on *Citrus sinensis* biocontrol. International Conference on the Role of Universities in Hands-On Education, 23-29 August, Thailand: pp. 356-362.
246. Sparling, G. P., Fermor, T. R., Wood, D. A., 1982. Measurement of the microbial biomass in composted wheat straw, and the possible contribution of the biomass to the nutrition of *Agaricus bisporus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 609–611.
247. Sreenivasaprasad, S., Manibhushanrao, K., 1994. Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents groundnut root and stem rot diseases. *International Journal of Pest Management*, 39: 167-171.
248. Stone, A. G., Scheuerell, S. J., Darby, H. M., 2004. Suppression of Soilborne Diseases in Field Agricultural Systems. In: *Soil organic matter in sustainable agriculture*. (Magdoff, F., Weil, R. R., Eds.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. pp. 131-178.
249. Streichsbier, F. K., Messner, M., Wessley, M., Röhr, M., 1982. The microbiological aspects of grape marc humification. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14: 182-186.
250. Suárez-Estrella F., Bustamante, M. A., Moral, R., Vargas-Garcia, C., López, M. J., Moreno, J., 2012. *In vitro* control of *Fusarium* wilt using agroindustrial subproduct-based composts. *Journal of Plant Pathology*, 94: 59-70.

251. Summerbell, S. F., Ahearn, D. G., Ando, M., Ajello, L., Crow, S. A., Fung, D., Gregor, T., Noble, J., Price, D. L., Simmons, R. B., Tarlo, S. M., Woychuk, W., 1994. Household hyphomycetes and other indoor fungi. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32: 277–286.
252. Takamatsu, S., Kano, Y., 2001. PCR primers useful for sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. *Mycoscience*, 42:135-139.
253. Takii, Y., Ikeda, K., Sato, C., Yano, M., Sato, T., Konno, H., 2005. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348. *Journal of Biological Macromolecules*, 5: 11-16.
254. Tekaiia, F., Latge, J. P., 2005. *Aspergillus fumigatus*: a saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology*, 8: 385-392.
255. Terna, T. P., Odebode, A. C., Bem, A. A., 2013. Griwth Suppression Of Some Common Post Harvest Rot Fungi By Culture Filtrates of A Soil Isolate Of *Trichoderma viride*. *IOSR-Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 3: 90-96.
256. Theodore, M., Toribio, J. A., 1995. Suppression of *Pythium aphanidermatum* in composts prepared from sugarcane factory residues. *Plant Soil*, 177: 219-233.
257. Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
258. Thorn, G., 1997. The fungi in soil. In: *Modern Soil Microbiology* (van Elsas J. D., Trevors, J. T., Wellington, E. M. H., Eds.). New York: Marcel Dekker, Inc.
259. Tiwari, K. L., Jadhav, S. K., Kumar, A., 2011. Morphological and molecular study of different *Penicillium* species. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7: 203-210.
260. Ugwuanyi, J. O., 2009. Reprocessing and protein enrichment of agricultural wastes by thermophilic aerobic digestion (TAD), In: *Agricultural Wastes* (Ashworth G. S., Azevedo, P., Eds.). Nova Science Publishers, Inc. pp. 29.
261. Utkhede, R., 2004. Managing major greenhouse vegetable diseases using biological and molecular techniques, *Canadian Greenhouse Conference*, Toronto, October. pp. 29.



262. Valiente C., Arrigoni E., Esteban R. M., Amado R., 1995. Grape pomace as a potential food fiber. *Journal of Food Science*, 60: 818–820.
263. Vallad, G. E., Stone, A. G., Goodman, R. M., Cooperband, L. R., 2000. Assessment of foliar disease suppression generated by paper mill sludge amendments. *Phytopathology*, 90: S79.
264. Van Elsas, J. D., Garbeva, P., Salles, J., 2002. Effects of agroindustrial measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Bioregradation*, 13: 29-40.
265. Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.
266. Varga, J., Frisvald, J. C., Kocsube, S, Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R. A., 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 69: 1-17.
267. Varga J., Kevei F., Hamari Z., Tóth B., Téren J., et al., 2000. Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification* (Samson R. A., Pitt J.I., Eds). Amsterdam, Harwood Academic Publishers. pp. 397–411.
268. Verdejo-Lucas, S., Viera, A., Stchigel, A. M., Sorribas, F. J., 2009. Screening culture filtrates of fungi for activity against *Tylenchulus semipenetrans*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7: 896-904.
269. Voisard, C., Keel, C., Haas, D., Defago, G., 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*, 8: 351-358.
270. Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B., Thomashow, L. S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309–48.
271. Weindling R., 1932. *Trichoderma lignorum* a parasite of other soil fungi. *Journal of Phytopathology*, 22: 837–845.
272. Whipps, J. M., 1997. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, 26: 1-134.

273. Whipps, J. M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
274. Whipps, J. M., Lumsden, R. D., 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. In: *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential* (Butt, T., Jackson, C., Magan, N., Eds.). Wallingford: CABI Publishing. pp. 9-22.
275. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.
276. Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrew, K., Beyer, M., Humpf, H. U., Tudzynski, B., 2009. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Molecular microbiology*, 72:931-946.
277. Wu, Z. H., Tsmura, Y., Blomquist, G., Wang, X. R., 2003. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5389-5397.
278. Wuest, P., Bengtson, G. D., 1982. *Penn State Handbook for commercial mushroom growers*. The Pennsylvania State University, University Park
279. Youssff, Y. A., 1960. Antagonistic action of *Penicillium chrysogenum* in the control of tomato *Fusarium* wilt. *Journal of Phytopathology*, 40: 218-220.
280. Yunis, H., Elad, Y., 1989. Survival of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* in plant debris during summer in Israel. *Phytoparasitica*, 17: 13–21.
281. Zaim, S., Belabid, L., Bellahcene, M., 2013. Biocontrol of chickpea *Fusarium* wilt by *Bacillus* spp. Rhizobacteria. *Journal of Plant Protection Research*, 53: 177-183.

## 8. PRILOG

## 8.1. Vrednosti najmanje značajnih razlika (LSD) na nivou 0,05 za određivanje razlika primenjenih tretmana pri određivanju uticaja metabolita gljiva iz agroindustrijskog otpada na rast fitopatogena

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>AB</b>	<b>AC</b>	<b>BC</b>	<b>ABC</b>
Botrytis, Izolat K7/1	0.46	0.46	0.46	0.66	0.66	0.66	0.93
Botrytis, Izolat K11/1	0.77	0.77	0.77	1.08	1.08	1.08	1.53
Botrytis, Izolat K16/2	1.00	1.00	1.00	1.41	1.41	1.41	2.00
Botrytis, Izolat 19/5	1.32	1.32	1.32	1.86	1.86	1.86	2.64
Botrytis, Izolat 10/5	0.63	0.63	0.63	0.89	0.89	0.89	1.26
Botrytis, Izolat 10/5 kultura stara 48h	1.25	1.25	1.25	1.76	1.76	1.76	2.49
Fusarium, Izolat K7/1	0.95	0.95	0.95	1.34	1.34	1.34	1.90
Fusarium, Izolat K11/1	0.84	0.84	0.84	1.19	1.19	1.19	1.68
Fusarium, Izolat K16/2	0.92	0.92	0.92	1.30	1.30	1.30	1.84
Fusarium, Izolat 19/2	1.85	1.85	1.85	2.61	2.61	2.61	3.69
Fusarium, Izolat 10/5	1.78	1.78	1.78	2.52	2.52	2.52	3.56
Pythium, Izolat K7/1	0.88	0.88	0.88	1.25	1.25	1.25	1.77
Pythium, Izolat K11/1	0.69	0.69	0.69	0.98	0.98	0.98	1.38
Pythium, Izolat K16/2	1.01	1.01	1.01	1.43	1.43	1.43	2.03
Pythium, Izolat 19/5	1.08	1.08	1.08	1.53	1.53	1.53	2.17
Pythium, Izolat 10/5	0.71	0.71	0.71	1.01	1.01	1.01	1.42

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>AB</b>
Botrytis, Izolat A/5	0.49	0.49	0.69
Fusarium, Izolat A/5	1.75	1.75	2.48
Pythium, Izolat A/5	1.51	1.51	2.14

## 8.2. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Penicillium paneum* (izolat K7/1) na *Botrytis cinerea*

### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	1268.760	1	1268.760	4200.034	.000
Sterilizacija	565.510	1	565.510	1872.034	.000
Koncentracija	21.094	1	21.094	69.828	.000
Kultura * Sterilizacija	219.010	1	219.010	725.000	.000
Kultura * Koncentracija	276.760	1	276.760	916.172	.000
Sterilizacija * Koncentracija	5.510	1	5.510	18.241	.001
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	1.260	1	1.260	4.172	.058
Error	4.833	16	.302		
Corrected Total	2362.740	23			

a. B. cinerea, Izolat K7/1

b. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	66.50	74.67	70.58
	a	69.67	78.83	74.25
	Total	68.08	76.75	72.42
dvojna	f	53.17	46.83	50.00
	a	67.50	64.00	65.75
	Total	60.33	55.42	57.88
Total	f	59.83	60.75	60.29
	a	68.58	71.42	70.00
	Total	64.21	66.08	65.15

a. B. cinerea, Izolat K7/1

### 8.3. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Penicillium paneum* (izolat K7/1) na *Fusarium oxysporum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	.510	1	.510	.405	.534
Sterilizacija	195.510	1	195.510	155.116	.000
Koncentracija	5.510	1	5.510	4.372	.053
Kultura * Sterilizacija	.260	1	.260	.207	.656
Kultura * Koncentracija	15.844	1	15.844	12.570	.003
Sterilizacija * Koncentracija	.260	1	.260	.207	.656
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	15.844	1	15.844	12.570	.003
Error	20.167	16	1.260		
Corrected Total	253.906	23			

a. *F. oxysporum*, Izolat K7/1

b. R Squared = .921 (Adjusted R Squared = .886)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	54.33	51.83	53.08
	a	47.00	48.17	47.58
	Total	50.67	50.00	50.33
dvojna	f	51.00	55.00	53.00
	a	46.50	47.67	47.08
	Total	48.75	51.33	50.04
Total	f	52.67	53.42	53.04
	a	46.75	47.92	47.33
	Total	49.71	50.67	50.19

a. *F. oxysporum*, Izolat K7/1

#### 8.4. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Penicillium paneum* (izolat K7/1) na *Pythium aphanidermatum*

##### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	776.344	1	776.344	709.800	.000
Sterilizacija	906.510	1	906.510	828.810	.000
Koncentracija	31.510	1	31.510	28.810	.000
Kultura * Sterilizacija	595.010	1	595.010	544.010	.000
Kultura * Koncentracija	31.510	1	31.510	28.810	.000
Sterilizacija * Koncentracija	11.344	1	11.344	10.371	.005
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	44.010	1	44.010	40.238	.000
Error	17.500	16	1.094		
Corrected Total	2413.740	23			

a. *P. aphanidermatum*, Izolat K7/1

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Način sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	67.00	65.67	<b>66.33</b>
	a	63.33	64.67	<b>64.00</b>
	Total	<b>65.17</b>	<b>65.17</b>	<b>65.17</b>
dvojna	f	65.17	64.67	<b>64.92</b>
	a	47.00	38.33	<b>42.67</b>
	Total	<b>56.08</b>	<b>51.50</b>	<b>53.79</b>
Total	f	66.08	65.17	<b>65.63</b>
	a	55.17	51.50	<b>53.33</b>
	Total	<b>60.63</b>	<b>58.33</b>	<b>59.48</b>

a. *P. aphanidermatum*, Izolat K7/1

### 8.5. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Penicillium chrysogenum* (izolat K11/1) na *Botrytis cinerea*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	8493.844	1	8493.844	10321.633	.000
Sterilizacija	1141.260	1	1141.260	1386.848	.000
Koncentracija	666.760	1	666.760	810.241	.000
Kultura * Sterilizacija	168.010	1	168.010	204.165	.000
Kultura * Koncentracija	518.010	1	518.010	629.481	.000
Sterilizacija * Koncentracija	58.594	1	58.594	71.203	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	1.260	1	1.260	1.532	.234
Error	13.167	16	.823		
Corrected Total	11060.906	23			

a. B. cinerea, Izolat K11/1

b. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	74.00	76.33	75.17
	a	58.50	53.67	56.08
	Total	66.25	65.00	65.63
dvojna	f	40.83	23.67	32.25
	a	35.00	12.50	23.75
	Total	37.92	18.08	28.00
Total	f	57.42	50.00	53.71
	a	46.75	33.08	39.92
	Total	52.08	41.54	46.81

a. B. cinerea, Izolat K11/1

### 8.6. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Penicillium chrysogenum* (izolat K11/1) na *Fusarium oxysporum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	102.094	1	102.094	103.168	.000
Sterilizacija	.844	1	.844	.853	.370
Koncentracija	55.510	1	55.510	56.095	.000
Kultura * Sterilizacija	142.594	1	142.594	144.095	.000
Kultura * Koncentracija	14.260	1	14.260	14.411	.002
Sterilizacija * Koncentracija	31.510	1	31.510	31.842	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	7.594	1	7.594	7.674	.014
Error	15.833	16	.990		
Corrected Total	370.240	23			

a. F. oxysporum, Izolat K11/1

b. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .939)

#### Descriptive Statistics<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	66.33	74.33	70.33
	a	64.50	65.67	65.08
	Total	65.42	70.00	67.71
dvojna	f	60.00	62.67	61.33
	a	65.67	66.00	65.83
	Total	62.83	64.33	63.58
Total	f	63.17	68.50	65.83
	a	65.08	65.83	65.46
	Total	64.13	67.17	65.65

a. F. oxysporum, Izolat K11/1



### 8.7. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Penicillium chrysogenum* (izolat K11/1) na *Pythium aphanidermatum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	22.042	1	22.042	33.062	.000
Sterilizacija	425.042	1	425.042	637.563	.000
Koncentracija	10.667	1	10.667	16.000	.001
Kultura * Sterilizacija	12.042	1	12.042	18.062	.001
Kultura * Koncentracija	10.667	1	10.667	16.000	.001
Sterilizacija * Koncentracija	54.000	1	54.000	81.000	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	24.000	1	24.000	36.000	.000
Error	10.667	16	.667		
Corrected Total	569.125	23			

a. *P. aphanidermatum*, Izolat K11/1

b. R Squared = .981 (Adjusted R Squared = .973)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	54.67	55.67	<b>55.17</b>
	a	48.67	47.67	<b>48.17</b>
	Total	<b>51.67</b>	<b>51.67</b>	<b>51.67</b>
dvojna	f	57.33	59.67	<b>58.50</b>
	a	52.50	44.83	<b>48.67</b>
	Total	<b>54.92</b>	<b>52.25</b>	<b>53.58</b>
Total	f	56.00	57.67	<b>56.83</b>
	a	50.58	46.25	<b>48.42</b>
	Total	<b>53.29</b>	<b>51.96</b>	<b>52.63</b>
a. <i>P. aphanidermatum</i> , Izolat K11/1				

### 8.8. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Aspergillus fumigatus* (izolat K16/2) na *Botrytis cinerea*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	1066.667	1	1066.667	764.179	.000
Sterilizacija	10.667	1	10.667	7.642	.014
Koncentracija	28.167	1	28.167	20.179	.000
Kultura * Sterilizacija	63.375	1	63.375	45.403	.000
Kultura * Koncentracija	.042	1	.042	.030	.865
Sterilizacija * Koncentracija	.375	1	.375	.269	.611
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	6.000	1	6.000	4.299	.055
Error	22.333	16	1.396		
Corrected Total	1197.625	23			

a. B. cinerea, Izolat K16/2

b. R Squared = .981 (Adjusted R Squared = .973)

#### Descriptive Statistics<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	59.17	58.33	58.75
	a	65.00	61.67	63.33
	Total	62.08	60.00	61.04
dvojna	f	50.17	47.17	48.67
	a	47.50	46.00	46.75
	Total	48.83	46.58	47.71
Total	f	54.67	52.75	53.71
	a	56.25	53.83	55.04
	Total	55.46	53.29	54.38

a. B. cinerea, Izolat K16/2

### 8.9. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Aspergillus fumigatus* (izolat K16/2) na *Fusarium oxysporum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	308.167	1	308.167	259.509	.000
Sterilizacija	222.042	1	222.042	186.982	.000
Koncentracija	187.042	1	187.042	157.509	.000
Kultura * Sterilizacija	737.042	1	737.042	620.667	.000
Kultura * Koncentracija	92.042	1	92.042	77.509	.000
Sterilizacija * Koncentracija	1.500	1	1.500	1.263	.278
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	8.167	1	8.167	6.877	.018
Error	19.000	16	1.188		
Corrected Total	77512.500	24			

a. F. oxysporum, Izolat K16/2

b. R Squared = .988 (Adjusted R Squared = .983)

#### Descriptive Statistics<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	56.8333	57.8333	57.3333
	a	61.1667	63.5000	62.3333
	Total	59.0000	60.6667	59.8333
dvojna	f	55.6667	66.8333	61.2500
	a	40.1667	48.0000	44.0833
	Total	47.9167	57.4167	52.6667
Total	f	56.2500	62.3333	59.2917
	a	50.6667	55.7500	53.2083
	Total	53.4583	59.0417	56.2500

a. F. oxysporum, Izolat K16/2

### 8.10. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Aspergillus fumigatus* (izolat K16/2) na *Pythium aphanidermatum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	49.594	1	49.594	34.500	.000
Sterilizacija	1060.010	1	1060.010	737.399	.000
Koncentracija	490.510	1	490.510	341.225	.000
Kultura * Sterilizacija	575.260	1	575.260	400.181	.000
Kultura * Koncentracija	68.344	1	68.344	47.543	.000
Sterilizacija * Koncentracija	290.510	1	290.510	202.094	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	65.010	1	65.010	45.225	.000
Error	23.000	16	1.438		
Corrected Total	2622.240	23			

a. *P. aphanidermatum*, Izolat K16/2

b. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .987)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	42.33	33.00	37.67
	a	42.17	40.17	41.17
	Total	42.25	36.58	39.42
dvojna	f	36.33	13.67	25.00
	a	49.17	47.00	48.08
	Total	42.75	30.33	36.54
Total	f	39.33	23.33	31.33
	a	45.67	43.58	44.63
	Total	42.50	33.46	37.98

a. *P. aphanidermatum*, Izolat K16/2

### 8.11. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Trichoderma longibrachiatum* (izolat 10/5) na *Botrytis cinerea*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	5.042	1	5.042	9.132	.008
Sterilizacija	20.167	1	20.167	36.528	.000
Koncentracija	828.375	1	828.375	1500.453	.000
Kultura * Sterilizacija	9.375	1	9.375	16.981	.001
Kultura * Koncentracija	10.667	1	10.667	19.321	.000
Sterilizacija * Koncentracija	26.042	1	26.042	47.170	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	121.500	1	121.500	220.075	.000
Error	8.833	16	.552		
Corrected Total	1030.000	23			

a. B. cinerea, Izolat 10/5

b. R Squared = .991 (Adjusted R Squared = .988)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	51.17	47.33	49.25
	a	60.83	43.83	52.33
	Total	56.00	45.58	50.79
dvojna	f	59.17	43.67	51.42
	a	57.33	46.67	52.00
	Total	58.25	45.17	51.71
Total	f	55.17	45.50	50.33
	a	59.08	45.25	52.17
	Total	57.13	45.38	51.25

a. B. cinerea, Izolat 10/5

### 8.12. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Trichoderma longibrachiatum* (izolat 10/5) na *Botrytis cinerea*, kultura stara 48h

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	17.510	1	17.510	8.043	.012
Sterilizacija	231.260	1	231.260	106.225	.000
Koncentracija	86.260	1	86.260	39.622	.000
Kultura * Sterilizacija	5.510	1	5.510	2.531	.131
Kultura * Koncentracija	11.344	1	11.344	5.211	.036
Sterilizacija * Koncentracija	8.760	1	8.760	4.024	.062
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	.010	1	.010	.005	.946
Error	34.833	16	2.177		
Corrected Total	61047.250	24			

a. B. cinerea, Izolat 10/5 48h

b. R Squared = .912 (Adjusted R Squared = .873)

#### Descriptive Statistics<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	50.3333	46.6667	48.5000
	a	54.3333	53.1667	53.7500
	Total	52.3333	49.9167	51.1250
dvojna	f	49.0000	42.6667	45.8333
	a	55.0000	51.0000	53.0000
	Total	52.0000	46.8333	49.4167
Total	f	49.6667	44.6667	47.1667
	a	54.6667	52.0833	53.3750
	Total	52.1667	48.3750	50.2708

a. B. cinerea, Izolat 10/5 48h

### 8.13. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Trichoderma longibrachiatum* (izolat 10/5) na *Fusarium oxysporum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	2.344	1	2.344	.528	.478
Sterilizacija	388.010	1	388.010	87.439	.000
Koncentracija	1.760	1	1.760	.397	.538
Kultura * Sterilizacija	213.010	1	213.010	48.002	.000
Kultura * Koncentracija	17.510	1	17.510	3.946	.064
Sterilizacija * Koncentracija	21.094	1	21.094	4.754	.045
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	1.760	1	1.760	.397	.538
Error	71.000	16	4.437		
Corrected Total	716.490	23			

a. F. oxysporum, Izolat 10/5

b. R Squared = .901 (Adjusted R Squared = .858)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	42.83	42.67	42.75
	a	42.50	47.17	44.83
	Total	42.67	44.92	43.79
dvojna	f	38.67	36.17	37.42
	a	51.33	51.50	51.42
	Total	45.00	43.83	44.42
Total	f	40.75	39.42	40.08
	a	46.92	49.33	48.13
	Total	43.83	44.38	44.10

a. F. oxysporum, Izolat 10/5

### 8.14. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Trichoderma longibrachiatum* (izolat 10/5) na *Pythium aphanidermatum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	86.260	1	86.260	121.779	.000
Sterilizacija	437.760	1	437.760	618.015	.000
Koncentracija	152.510	1	152.510	215.309	.000
Kultura * Sterilizacija	195.510	1	195.510	276.015	.000
Kultura * Koncentracija	33.844	1	33.844	47.779	.000
Sterilizacija * Koncentracija	71.760	1	71.760	101.309	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	110.510	1	110.510	156.015	.000
Error	11.333	16	.708		
Corrected Total	1099.490	23			

a. P. aphanidermatum, Izolat 10/5

b. R Squared = .990 (Adjusted R Squared = .985)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	47.17	32.00	39.58
	a	53.67	54.00	53.83
	Total	50.42	43.00	46.71
dvojna	f	50.00	48.17	49.08
	a	53.67	50.17	51.92
	Total	51.83	49.17	50.50
Total	f	48.58	40.08	44.33
	a	53.67	52.08	52.88
	Total	51.13	46.08	48.60

a. P. aphanidermatum, Izolat 10/5



### 8.15. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Rhiyopus oryzae* (izolat 19/5) na *Botrytis cinerea*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	412.510	1	412.510	169.235	.000
Sterilizacija	178.760	1	178.760	73.338	.000
Koncentracija	46.760	1	46.760	19.184	.000
Kultura * Sterilizacija	8.760	1	8.760	3.594	.076
Kultura * Koncentracija	49.594	1	49.594	20.346	.000
Sterilizacija * Koncentracija	3.010	1	3.010	1.235	.283
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	25.010	1	25.010	10.261	.006
Error	39.000	16	2.438		
Corrected Total	763.406	23			

a. B. cinerea, Izolat 19/5

b. R Squared = .949 (Adjusted R Squared = .927)

#### Descriptive Statistics<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	73.33	69.00	71.17
	a	68.00	61.00	64.50
	Total	70.67	65.00	67.83
dvojna	f	63.00	60.33	61.67
	a	56.00	58.83	57.42
	Total	59.50	59.58	59.54
Total	f	68.17	64.67	66.42
	a	62.00	59.92	60.96
	Total	65.08	62.29	63.69

a. B. cinerea, Izolat 19/5

### 8.16. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Rhizopus oryzae* (izolat 19/5) na *Fusarium oxysporum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	19.260	1	19.260	4.028	.062
Sterilizacija	19.260	1	19.260	4.028	.062
Koncentracija	1512.094	1	1512.094	316.255	.000
Kultura * Sterilizacija	4.594	1	4.594	.961	.342
Kultura * Koncentracija	10.010	1	10.010	2.094	.167
Sterilizacija * Koncentracija	147.510	1	147.510	30.852	.000
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	.010	1	.010	.002	.963
Error	76.500	16	4.781		
Corrected Total	1789.240	23			

a. F. oxysporum, Izolat 19/5

b. R Squared = .957 (Adjusted R Squared = .939)

#### Descriptive Statistics<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	37.17	59.33	48.25
	a	44.83	57.00	50.92
	Total	41.00	58.17	49.58
dvojna	f	41.17	60.67	50.92
	a	47.00	56.67	51.83
	Total	44.08	58.67	51.38
Total	f	39.17	60.00	49.58
	a	45.92	56.83	51.38
	Total	42.54	58.42	50.48

a. F. oxysporum, Izolat 19/5

### 8.17. Trofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Rhizopus oryzae* (izolat 19/5) na *Pythium aphanidermatum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kultura	16.667	1	16.667	10.127	.006
Sterilizacija	13.500	1	13.500	8.203	.011
Koncentracija	117.042	1	117.042	71.114	.000
Kultura * Sterilizacija	9.375	1	9.375	5.696	.030
Kultura * Koncentracija	16.667	1	16.667	10.127	.006
Sterilizacija * Koncentracija	1.500	1	1.500	.911	.354
Kultura * Sterilizacija * Koncentracija	5.042	1	5.042	3.063	.099
Error	26.333	16	1.646		
Corrected Total	206.125	23			

a. *P. aphanidermatum*, Izolat 19/5

b. R Squared = .872 (Adjusted R Squared = .816)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>				
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)				
Vrsta kulture	Nacin sterilizacije	Mean		
		Koncentracija		
		10	50	Total
čista	f	63.33	67.50	65.42
	a	65.00	66.33	65.67
	Total	64.17	66.92	65.54
dvojna	f	63.00	68.67	65.83
	a	65.33	71.83	68.58
	Total	64.17	70.25	67.21
Total	f	63.17	68.08	65.63
	a	65.17	69.08	67.13
	Total	64.17	68.58	66.38

a. *P. aphanidermatum*, Izolat 19/5

### 8.18. Dvofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Aspergillus* sp. (izolat A/5) na *Botrytis cinerea*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	91.667 <sup>b</sup>	3	30.556	11.458	.003
Intercept	41067.000	1	41067.000	15400.125	.000
Kultura	56.333	1	56.333	21.125	.002
Sterilizacija	8.333	1	8.333	3.125	.115
Kultura * Sterilizacija	27.000	1	27.000	10.125	.013
Error	21.333	8	2.667		
Total	41180.000	12			
Corrected Total	113.000	11			

a. B. cinerea, Izolat A/5

b. R Squared = .811 (Adjusted R Squared = .740)

Descriptive Statisticsa			
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)			
Vrsta kulture	Mean		
	Način sterilizacije		
	f	a	Total
čista	58.6667	54.0000	56.3333
dvojna	60.0000	61.3333	60.6667
total	59.3333	57.6667	58.5000

a. B. cinerea, Izolat A/5

### 8.19. Dvofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Aspergillus* sp. (izolat A/5) na *Fusarium oxysporum*

#### Tests of Between-Subjects Effects<sup>a</sup>

Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	145.896 <sup>b</sup>	3	48.632	24.572	.000
Intercept	26838.021	1	26838.021	13560.263	.000
Kultura	105.021	1	105.021	53.063	.000
Sterilizacija	9.188	1	9.188	4.642	.063
Kultura * Sterilizacija	31.688	1	31.688	16.011	.004
Error	15.833	8	1.979		
Total	26999.750	12			
Corrected Total	161.729	11			

a. F. oxysporum, Izolat A/5

b. R Squared = .902 (Adjusted R Squared = .865)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>			
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)			
Vrsta kulture	Mean		
	Način sterilizacije		
	f	a	Total
čista	49.5000	51.0000	50.2500
dvojna	46.8333	41.8333	44.3333
total	48.1667	46.4167	47.2917

a. . F. oxysporum, Izolat A/5

### 8.20. Dvofaktorijalna analiza varijanse, uticaj metabolita *Aspergillus* sp. (izolat A/5) na *Pythim aphanidermatum*

Tests of Between-Subjects Effects <sup>a</sup>					
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1267.500 <sup>b</sup>	3	422.500	2028.000	.000
Intercept	3536.333	1	3536.333	16974.400	.000
Kultura	290.083	1	290.083	1392.400	.000
Sterilizacija	752.083	1	752.083	3610.000	.000
Kultura * Sterilizacija	225.333	1	225.333	1081.600	.000
Error	1.667	8	.208		
Total	4805.500	12			
Corrected Total	1269.167	11			

a. P. aphanidermatum, Izolat A/5

b. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

Descriptive Statistics <sup>a</sup>			
Dependent Variable: Veličina rasta kolonije (mm)			
Vrsta kulture	Mean		
	Način sterilizacije		
	f	a	Total
čista	24.5000	.0000	12.2500
dvojna	25.6667	18.5000	22.0833
total	25.0833	9.2500	17.1667

a. . P. aphanidermatum, Izolat A/5

## **Biografija autora**

Jelena P. Jovičić Petrović je rođena 30.07.1983. godine u Valjevu. Završila je osnovnu školu u Mionici, a gimnaziju opšti smer u Ljigu 2002. godine. Diplomirala je 2007. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na odseku za prehrambenu tehnologiju biljnih proizvoda. Osnovne studije je završila sa prosečnom ocenom svih položenih ispita 10.00 i ocenom 10 na diplomskom radu iz predmeta Tehnološka mikrobiologija. Tokom osnovnih studija bila je stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka, Fonda vlade za mlade talente, polaznik programa "1000 mladih lidera" Fondacije dr Zoran Đinđić, dobitnik nagrade Fonda Nikola Spasić, nagrade Udruženja univerzitetskih profesora i naučnika Srbije i nagrade Poljoprivrednog fakulteta kao najbolji student generacije.

2007. godine upisala je doktorske akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu, studijski program Zemljište i melioracije, uža naučna oblast Ekološka mikrobiologija. Dobitnik je nagrade "Živojin Tešić" kao najbolji student doktorskih studija za užu naučnu oblast Ekološka mikrobiologija.

Tokom prve godine postdiplomskih studija bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj republike Srbije. 2008. godine izabrana u zvanje i na radno mesto asistenta na Katedri za ekološku mikrobiologiju. Izvodi praktičnu nastavu na predmetima Osnovi mikrobiologije zemljišta, Ekološka mikrobiologija, Tehnologija otpadnih voda i Hemija i mikrobiologija voda.

Učestvovala je na tri nacionalna projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i dva međunarodna projekta:

CROPWAT (A Centre for Sustainable Crop-Water Management), EU FP6 i

AREA (Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade), tekući EU FP7 projekat, čiji je sekretar.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Gljive iz agroindustrijskog otpada kao antagonisti fitopatogenim gljivama

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.


Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 27.03.2014. godine



**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Jelena Jovičić Petrović

Broj indeksa 07/5

Studijski program Zemljište i melioracije

Naslov rada Gljive iz agroindustrijskog otpada kao antagonisti fitopatogenim gljivama

Mentor prof. dr Vera Raičević, redovni profesor

Potpisani/a Jelena Jovičić Petrović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 27.03.2014. godine

Jelena Jovičić Petrović



## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Jelena Jovičić Petrović

broj indeksa 07/5

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Gljive iz agroindustrijskog otpada kao antagonisti fitopatogenim gljivama

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 27.03.2014. godine

Jelena Jovičić Petrović