

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Gordana M. Racić (rođ. Danilović)

Ekološko-biohemijska proučavanja  
varijabilnosti autohtonih vrsta gljiva iz roda  
*Trichoderma* u različitim tipovima zemljišta

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Gordana M. Racić (born Danilović)

Variability of indigenous *Trichoderma* spp. in  
different soil types and their ecological and  
biochemical characterization

doctoral dissertation

Belgrade, 2017

Mentori:

---

Dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Dejana Panković, redovni profesor  
Fakultet zaštite životne sredine, Univerzitet Edukons

Članovi komisije:

---

Dr Ljuba Mandić, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

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

---

Dr Ljiljana Nešić, redovni profesor  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

---

Dr Vladimir Beškoski, docent  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Fakultetu zaštite životne sredine Univerziteta Edukons i Departmanu za mikrobiologiju Fakulteta za prirodne nauke i informatiku na Univerzitetu u Segedinu. Istraživanja u okviru disertacije su finansirana iz sredstava projekata Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije: III 43010 "Modifikacije antioksidativnog metabolizma biljaka sa ciljem povećanja tolerancije na abiotički stres i identifikacija novih biomarkera sa primenom u remedijaciji i monitoringu degradiranih staništa", TR 31080 "Biodiverzitet kao potencijal u ekoremedijacionim tehnologijama oštećenih ekosistema", IPA projekat: „Development of infield ecologically safe, continuously detoxifying technology for producing biovegetables - PHANTERI*

*Veliku zahvalnost dugujem mom mentoru, prof.dr Dejana Panković, koja je do samog kraja izvela ovu doktorsku disertaciju. Hvala na pruženom poverenju, zalaganju, upornosti i strpljenju kojima sam uspela da nadogradim svoje znanje, kao i na sugestijama i korekcijama koje su doprinele kvalitetu ove teze od samog početka njene izrade.*

*Mentoru prof. dr Miroslavu M. Vrvicu dugujem posebnu zahvalnost zbog interesovanja pokazanom tokom mojih doktorskih studija, kao i prilikom finalne izrade ove teze, zahvaljujući čemu je teza znatno dobila na kvalitetu.*

*Veliko hvala i profesorki dr Ljiljani Nešić na pomoći vezanoj za pedološka istraživanja urađena tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i korisnim savetima pri finalnoj izradi teze. Takođe, zahvaljujem se dr Vladimiru Čiriću na pomoći prilikom uzorkovanja zemljišta.*

*Prof. dr Ljubi Mandić zahvaljujem se na trudu, savetima i zalaganju, koji su doprineli kvalitetu teze.*

*Doc. dr Vladimiru Beškospkom puno hvala na pozitivnim rečima i korisnim sugestijama tokom izrade i pisanja teze.*

*Prof. dr Veri Raičević hvala na sugestijama vezanim za mikrobiološka ispitivanja kao i na pristupu njenoj laboratoriji. Posebnu zahvalnost dugujem i njenim saradnicama dr Jeleni Jovičić Petrović i Danki Radić,*

*Dr Laszlo Kredics and dr Peter Kormoczi, I thank you for your kindest support and for accepting me to your lab. I appreciate all you have done for me.*

*Dragim kolegama i prijateljima Draxici, Dželi, Nataši Ć., Mimi, Igoru, Goci i Nataši S. se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, razumevanju, podršci i divnom druženju u svakom trenutku. Takođe se zahvaljujem i ostalim kolegama sa Edukons Univerziteta. Zahvaljujem se kolegicama iz AbioTech laboratorije, koje su mi uvek bile iskrena podrška i izvor pozitivne energije. Uz čiju pomoć i dobru volju sam uradila veliki deo analiza.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Miroslavu M. Nikoliću kao i članovima njegove grupe sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja, za pomoć oko analize metala iz uzoraka zemljišta.*

*Hvala dr Svetlani Radosavljević, koja me je naučila da se upornost i strpljenje uvek isplate. Uvek mi je bila iskrena podrška na putu koji sam odabrala.*

*Prof.dr Ljubinku Jovanoviću hvala na optimizmu i podršci koju mi je pružao tokom izrade i pisanja teze*

*Hvala mom suprugu, sestri, Marku i posebno mojim roditeljima na bezrezervnoj podršci bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće. Hvala vam što ste uvek verovali, i verujete u mene.*

*Mojoj Sofiji... koja mi je tokom dugog iščekivanja da se ostvare uslovi za odbranu teze ispunila vreme srećom, osmesima i radošću.*

**Ekološko-biohemijska proučavanja varijabilnosti autohtonih vrsta gljiva iz roda  
*Trichoderma* u različitim tipovima zemljišta**

REZIME

Gljive iz roda *Trichoderma* spp. su kosmopolitske filamentozne gljive koje se pojavljuju kao dominantne komponente zemljišnog ekosistema. Ekološka i biološka uloga ovih gljiva je veoma raznovrsna. Kao endofitni simbionti biljaka imaju primenu u kontroli biljnih bolesti čime pospešuju biljni rast i prinos. Takođe, poznata je i njihova sposobnost da indukuju otpornost kod biljaka koje su izložene biotičkom ili abiotičkom stresu. Pored važne primene u poljoprivredi one nalaze primenu i u različitim granama industrije jer proizvode mnogobrojne enzime i metabolite. Obzirom da su mnoge vrste u okviru ovog roda ne mogu razlikovati na morfološkom nivou, neophodna je njihova identifikacija na molekularnom nivou.

Cilj ove teze bio je utvrđivanje najvažnijih faktora koji utiču na varijabilnost roda *Trichoderma* u različitim tipovima zemljišta. Molekularna identifikacija gljiva roda *Trichoderma*, izolovanih iz različitih tipova zemljišta (rendzina, sirozem na lesu, ritska crnica, fluvisol, ranker, gajnjača, černozem sa različitim podtipovima i smonica) i iz rizosfere različitih biljnih kultura urađena je analizom sekvenci ITS i *TEF1- $\alpha$*  gena. Uzorci zemljišta ispitani su u funkciji fizičko-hemijskih i mikrobioloških karakteristika, kao i sadržaja ukupnih i lakopristupačnih metala (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Mn). U cilju ispitivanja primene ovih gljiva kao antagonista fitopatogenih mikroorganizama, testirani su odabrani izolati prema *Fusarium solani species complex (FSSC)*, *Alternaria alternata* i *Phoma cucurbitacearum*. Enzimaska karakterizacija izolata odabranih za test antagonizma, urađena je semikvantitativnim testom API-ZYM. Kako bi se ispitaio efekat ovih gljiva i na abiotski stres izazvan povećanim sadržajem metala u zemljištu, između ostalih, odabrani su izolati koji su identifikovani iz zemljišta u kojima je određena povećana koncentracija metala, bakra(II) i nikla(II). Na osnovu *in vitro* testa, gajenjem izolata na povećanim koncentracijama bakra(II) i nikla(II), odabran je izolat, koji je pokazao najveću tolerantnost i primenjen je u ispitivanju uticaja na biljke paradajza gajene u vodnom deficitu.

Iz različitih tipova zemljišta, uzetih sa dve dubine 0-30 cm i 30-60 cm, izolovano je ukupno 15 izolata od kojih je samo 3 izolata izolovano sa dubine od 30-60 cm. Iz rizosfere različitih biljnih vrsta, iz zemljišta u konvencionalnoj i organskoj proizvodnji, izolovano je 26 izolata. Ukupno je identifikovan 41 izolat gljiva roda *Trichoderma*, koje su svrstane u 9 različitih vrsta: *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. gamsii*, *T. citrinoviride*, *T. virens/Hypocrea virens*, *T. longibrachiatum* i *T. koningii*.

Od ispitanih fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta, pozitivan uticaj na varijabilnost gljiva roda *Trichoderma* pokazala su zemljišta sa slabo alkalnom reakcijom, većim retencionim vodnim kapacitetom, kao i povećanim vrednostima sadržaja kalijuma i fosfora. Najveći broj izolata (14) identifikovan je iz uzorka zemljišta sa najvećim retencionim vodnim kapacitetom kao i najvećim sadržajem kalijuma i fosfora (smonica). Trideset sedam izolata, koji su identifikovani u okviru 9 različitih vrsta, izolovano je iz zemljišta čija je pH (u H<sub>2</sub>O) vrednost bila veća od 7.2.

Iako je u uzorcima zemljišta određeno prisustvo dominantnih bakterija, koje mogu da ograniče rast gljiva, upravo u tim uzorcima je dokazana najveća varijabilnost gljiva roda *Trichoderma*, pa se može zaključiti da mikrobiološke karakteristike nisu značajno uticale na varijabilnost gljiva iz roda *Trichoderma*.

Od svih ispitivanih metala samo koncentracije ukupnog hroma i nikla, značajno prelaze granične i remedijacione vrednosti u uzorku zemljišta sa Zmajevca. U uzorcima zemljišta iz vinograda određene su povećane vrednosti bakra. Kako je i udeo lakopristupačnog nikla i bakra u ukupnom sadržaju povećan, to ukazuje na moguće zagađenje zemljišta iz antropogenih izvora, na ovim lokalitetima. Međutim, sadržaj metala u zemljištu nije bio inhibirajući faktor za prisustvo gljiva roda *Trichoderma*. *T. longibrachiatum* SZMC 22669 izolovan je iz zemljišta sa lokaliteta Zmajevac, u kome su sadržaji Cr i Ni po gramu zemljišta bili značajno veći od preporučenih vrednosti za remedijaciju. Iz zemljišta sa povećanom koncentracijom bakra identifikovana su četiri izolata: *T. koningiopsis* SZMC 20966, *T. harzianum* SZMC 20969, *T. atroviride* SZMC 20976 i *T. koningiopsis* SZMC 20978.

Ipak u *in vitro* testu tolerantosti na povećane koncentracije bakra i nikla, najbolje rezultate dao je *T. brevicompactum* SZMC 22661, koji je izolovan iz zemljišta sa niskim sadržajem ovih metala.

Antagonizam šesnaest izolata (9 izolovanih iz rizosfere i 7 iz različitih tipova zemljišta) ispitan je *in vitro* testom. Svi izolati su ispoljili 7 dobre antagonističke sposobnosti prema biljnim patogenima, uz vrednosti indeksa biokontrole u opsegu od 71 do 100. Najveći indeks biokontrole utvrđen je u slučaju izolata *T. atroviride* SZMC 20968 prema svim ispitanim fitopatogenima. Kod istih 16 izolata primećene su visoke aktivnosti kisele fosfataze i naftol-AS-BI-fosfohidrolaze na osnovu API-ZYM semikvantitativnog testa, sem u slučaju 2 izolata gde je detektovana niska aktivnost kisele fosfataze. Pored ova dva enzima, prisustvo enzima N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze je utvrđeno u svim ispitanim izolatima.

Ispitan je uticaj izolata *T. brevicompactum* SZMC 22661, koji je pokazao najbolju tolerantnost u *in vitro* testovima prema ispitivnim abiotskim i biotskim stresovima, na biljke paradajza gajenim u uslovima vodnog deficita. Analiza fizioloških parametara paradajza, pokazala je da je u sušnim uslovima bolji vodni režim biljaka koje su rasle u prisustvu *T. brevicompactum* SZMC 22661 povezan sa smanjenom stomatalnom provodljivošću. U istim uslovima porast sadržaja ABA u korenu je manji nego u slučaju delovanja samo suše, što ukazuje na drugačiju regulaciju transpiracije u prisustvu *Trichoderma*.

Analiza ekspresije gena kod biljaka paradajza u uslovima dva ispitivana stresna faktora, suše i primene izolata *T. brevicompactum* SZMC 22661, ukazuje da su u listovima i korenu aktivirani različiti signalni putevi u eksperimentalnim uslovima postavljenim u ovom radu. Povećana ekspresija gena TomLoxA i PinII, uključenih u biosintezu/signalni put jasmonske kiseline, dobijena je na nivou korena. U listovima je smanjena ekspresija ova dva gena, kao i NCED1 gena koji reguliše sintezu ABA. Obrnuto, ekspresija gena markera SA signalnog puta je povećana u listovima, a smanjena u korenu. Rezultati ove teze ukazuju na povezanost signalnih puteva, kao i na to da zajedničko dejstvo ispitivanih stresova dovodi do modifikacije ekspresije gena u odnosu na reakciju prema pojedinačnom stresu.

Rezultati, prikazani u ovoj tezi pokazuju da se izolati iz vrsta *T. harzianum* i *T. atroviride*

možu preporučiti za primenu u biokontroli biljnih bolesti, dok se izolat *T. brevicompactum* SZMC 22661 izdvaja svojim pozitivnim efektima prema različitim abiotičkim stresovima.

*Ključne reči: Trichoderma, ITS, edafski faktori, ekspresija gena, varijabilnost, suša, zemljište*

*Naučna oblast: Biohemija*

*Naučna disciplina: Ekološka mikrobiologija*

*UDK broj: 577*



**Variability of indigenous *Trichoderma* spp.  
in different soil types and their ecological and biochemical characterization**

ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichoderma* spp. are cosmopolitan species present in different ecosystems. with important ecological and biological roles.. Beneficial effects of this fungi are responsible for their use in various fields of biotechnology and agriculture. As plant endophytes they are involved in control of plant diseases. They are known to induce plant tolerance to various biotic and abiotic stresses. Known to produce different enzymes, they can be used in preparations of commercial products, such as biopesticides. However, for their adequate use and application their identification on the molecular level is of great importance.

The aim of this thesis was to investigate the most important factors that influence *Trichoderma* variability in different soil types. Molecular identification of *Trichoderma* spp. from different soil types (Rendzic Leptosol, Regosol (Calcaric, Arenic), Calcic Gleysol, Fluvisol, Dystric Leptosol, Eutric Cambisol, Chernozem on loess terrace Chernozem (Arenic) and Vertisol) and plant rhizosphere of different crops was done based on their ITS and TEF1- $\alpha$  sequences. Variability was investigated in function of physical, chemical, microbiological properties of the soil, as well as total and extractable metal (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb and Mn) content in the soil. In order to examine the application of these fungi as antagonists of phytopathogens, selected strains of *Trichoderma* species were tested against *Fusarium solani* species complex (FSSC), *Alternaria alternata* and *Phoma cucurbitacearum*. The enzyme characterization of selected strains was performed with semiquantitative test API-ZYM. Furthermore, the selected strains were tested for tolerance to various concentrations of copper and nickel. The strain *T. brevicompactum* SZMC 22661 which showed the best tolerance to metals was applied in the examination of drought effect on tomato plants.

A total of 41 strains were isolated and identified as 9 taxa: *T. harzianum* species complex (THSC), *T. koningiopsis*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. gamsii*, *T.*

*citrinoviride*, *T. virens* and *T. longibrachiatum*. Out of 15 strains that were isolated from different soil types (0-30 cm and 30-60 cm) only 3 were derived from the depth of 30-60 cm. However, 26 isolates were identified from the rhizosphere of different plant species, grown in conventional and organic agriculture.

Physical and chemical characterization of examined soil samples indicates that the richest source of *Trichoderma* species are weakly alkaline soils, with better water availability and higher contents of available K and P. The highest number of isolated strains (14/41) was identified in the soil sample (soil type - Vertisol) with the highest water retention potential, as well as the highest content of available K and P. Thirty-seven strains classified to 9 species were isolated from soil samples with  $\text{pH} > 7.2$ .

According to microbiological characteristics of the examined soil samples, fast growing bacterial populations, which could compete with fungal populations, were dominant. However, the greatest diversity of *Trichoderma* species was found in these soil samples. According to our results, the investigated soil microbial characteristics did not affect *Trichoderma* diversity in different soil samples.

Determination of total heavy metal showed that concentration of Cr and Ni, in the soil sample from Zmajevac, significantly exceeds target and remediation values. However, in the soil samples from vineyard the highest concentrations of copper were determined. The ratio of easily extractable in total metal concentration was among the highest for Cu and Ni in above mentioned soil samples, indicating that contamination with these metals is of antropogenic origin. However, metal presence in soil samples did not affect *Trichoderma* diversity. For example, *T. longibrachiatum* SZMC 22669 was isolated from the soil sample Zmajevac, where content of Cr and Ni was significantly high. Moreover, four isolates were identified: *T. koningiopsis* SZMC 20966, *T. harzianum* SZMC 20969, *T. atroviride* SZMC 20976 i *T. koningiopsis* SZMC 20978 from soil samples from vineyard, where higher concentrations of copper were determined.

Antagonistic activity of 16 isolates (9 from the rhizosphere and 7 from different soil types) was examined. All isolates showed good antagonistic properties against tested phytopathogens *in vitro*, with high biocontrol index (BCI) ranging from 70.89 to 100 %. The highest BCI has been determined in the case of *Trichoderma atroviride* SZMC 20968

for all tested phytopathogens. Results of the enzyme activity showed that the activities of acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase were high in the case of all tested strains.

Analysis of physiological parameters of tomato in response to both *T. brevicompactum* SZMC 22661 and drought showed that better water regime of plants was associated with reduced stomatal conductance. The increased ABA content in roots is smaller than in the case of drought stress only, indicating different regulation of transpiration in the presence of drought and *Trichoderma*.

Analysis of gene expression in tomato leaves and roots, in terms of the two investigated stress factors, drought and application of *T. brevicompactum* SZMC 22661, indicates that different signaling pathways are activated in the leaves and roots. Increased expression of genes TomLoxA and PinII, involved in jasmonic acid signaling pathway, was obtained at the level of the root. However the expression of these two genes was reduced in leaves, as in the case of NCED1 gene that regulates the synthesis of ABA. Conversely, gene expression markers of SA signaling pathway was increased in leaves and decreased in the roots. The results of this thesis suggest that signaling pathways of JA, SA and ABA are involved in reaction to both drought and *Trichoderma*. The mutual effect of the tested stresses leads to the modification of gene expression in comparison to the reaction to a single stress.

Finally the results presented in this thesis point out that the strains belonging to *T. harzianum* and *T. atroviride* can be recommended for their potential use as biocontrol agents, while *T. brevicompactum* SZMC 22661 stands out with its positive effects to various abiotic stresses.

**Key words:** *Trichoderma*, ITS, edaphic factors, gene expression, variability, drought, soil

**Scientific field:** Biochemistry

**Scientific discipline:** Ecological microbiology

**UDC number:** 577

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>4</b>
2.1. Gljive iz roda <i>Trichoderma</i> .....	4
2.1.1. Rod <i>Trichoderma</i> .....	4
2.2. Ekologija gljiva iz roda <i>Trichoderma</i> .....	6
2.2.1. Ekološka niša.....	6
2.2.2. Diverzitet supstrata i metabolizam gljiva .....	7
2.2.3. Proizvodnja antibiotika.....	10
2.3. Primena gljiva iz roda <i>Trichoderma</i> .....	12
2.3.1. Uloga gljiva roda <i>Trichoderma</i> u biokontroli biljnih bolesti .....	12
2.3.2. Promocija biljnog rasta.....	18
2.3.3. Bioremedijacija.....	20
2.3.4. <i>Trichoderma</i> kao biopesticid u modernoj poljoprivredi.....	21
2.3.5. Ostale primene.....	21
2.4. Zastupljenost različitih tipova zemljišta u Republici Srbiji .....	23
<b>3. MATERIJAL I METODE RADA</b> .....	<b>27</b>
3.1. Hemikalije i potrošni materijal.....	27
3.2. Aparati .....	28
3.3. Uzorkovanje zemljišta.....	28
3.4. Određivanje mehaničkog sastava zemljišta.....	31
3.5. Vodne osobine zemljišta .....	31
3.6. Hemijske analize zemljišta.....	31
3.7. Određivanje sadržaja teških metala.....	32

3.8.	Mikrobiološke analize .....	33
3.9.	Izolovanje čistih kultura gljiva iz roda <i>Trichoderma</i> iz zemljišta.....	34
3.10.	Molekularna identifikacija gljiva roda <i>Trichoderma</i> .....	34
3.11.	Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom.....	36
3.12.	Enzimska karakterizacija izolata .....	36
3.12.1.	Priprema izolata.....	36
3.12.2.	Test za enzimsku karakterizaciju izolata .....	37
3.13.	<i>In vitro</i> ispitivanja rasta gljiva na podlogama sa teškim metalima .....	37
3.14.	Proučavanje in vitro antagonizma odabranih izolata gljiva roda <i>Trichoderma</i> .....	38
3.15.	Ispitivanje efekta odabranog izolata <i>Trichoderma</i> na tolerantnost biljaka prema suši .....	40
3.16.	Određivanje sadržaja abscisinske kiseline u listu i korenu biljaka .....	42
3.17.	Ekspresija gena paradajza kao odgovor na sušu i dodatak suspenzije gljive .....	43
3.18.	Statistička obrada rezultata.....	45
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>46</b>
4.1.	Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka zemljišta .....	47
4.2.	Sadržaj teških metala u uzorcima zemljišta .....	75
4.2.1.	Sadržaj ukupnih teških metala.....	75
4.2.2.	Sadržaj lako pristupačnih teških metala .....	77
4.3.	Mikrobiološka analiza uzoraka zemljišta .....	80
4.4.	Izolovanje i molekularna identifikacija gljiva iz roda <i>Trichoderma</i> iz različitih tipova zemljišta .....	81
4.5.	Povezanost edafskih parametara i sadržaja metala sa brojem izolata gljiva roda <i>Trichoderma</i> .....	85
4.6.	Ekološko-biohemijska karakterizacija gljiva iz roda <i>Trichoderma</i> .....	86

4.6.1. Enzimaska karakterizacija izolata .....	86
4.6.2. <i>In vitro</i> ispitivanje antagonizma izolata odabranih izolata <i>Trichoderma</i> prema fitopatogenim gljivama.....	88
4.7. <i>In vitro</i> ispitivanja otpornosti izolata gljiva <i>Trichoderma</i> na povećane koncentracije jona bakra i nikla .....	91
4.8. Efekti biotskog (dodatak <i>T. brevicompactum</i> SZMC 22661) i abiotskog (suše) stresa na biljke paradajza .....	94
4.9. Ekspresija gena u listu i korenu paradajza, kao odgovor na sušu i dodatak suspenzije gljive.....	100
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>106</b>
5.1. Uticaj fizičko-hemijskih i mikrobioloških karakteristika zemljišta na varijabilnost gljiva roda <i>Trichoderma</i> .....	107
5.2. Sadržaj metala u zemljištu i otpornost odabranih izolata na povećane koncentracije odabranih teških metala .....	111
5.3. Antagonistička aktivnost gljiva roda <i>Trichoderma</i> prema fitopatogenima i osnova ove aktivnosti .....	113
5.4. Efekat izolata <i>T. brevicompactum</i> SZMC 22661 na biljke paradajza u uslovima suše .....	115
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>121</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>123</b>
Prilog 1. Priprema mikrobioloških podloga.....	143
Prilog 2. Protokol za ekstrakciju DNK mikroorganizama iz zemljišta .....	144
Prilog 3. Sekvence PCR produkata dobijenih amplifikacijom ITS1/4 gena i/ili <i>tef1</i> gena.....	145

## **Lista skraćenica**

ABA - absicinska kiselina (eng. Abscisic Acid)

APX - askorbat-peroksidaza

BCA agens - biokontrolni agens

BSA - goveđi serumski albumin

CAT - katalaza

Ct - ciklus na kome intenzitet fluorescence prelazi zadati prag (eng. Cycle Threshold)

DDT - dihlor-difenil-trihloretran

DHA - dehidrogenazna aktivnost zemljišta

DHAR - dehidroaskorbat-reduktaza

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DTPA - dietilentriaminpenta-sirćetna kiselina

FSSC - *Fusarium solani species complex*

GlcNAc - N-acetil- $\beta$ -D-glukozamin

GR - glutation-reduktaza

ICP-OES - optički emisijski spektrometar sa induktivno kuplovanom plazmom (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

IPM - integracioni menadžment štetočina (eng. Integrated Pest Management)

ISR - indukovano stečena otpornost

ITS - internal transcribed spacer

JA - jasmonska kiselina

MDHAR - monodehidroaskorbat- reduktaza

NADPH - nikotin-adenin-dinukleotid-fosfat

NBI - (eng. Nitrogen Balance Index)

NCBI baza podataka - National Center for Biotechnology Information

PGPR - rizobakterije promotori biljnog rasta (eng. Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

PDA - krompirov dekstrozni agar (eng. Potato Dextrose Agar)

PDB - krompir-dekstrozna tečna podloga (eng. Potato Dextrose Broth)

PR - geni uključeni u odgovor na infekciju patogena patogenetski (eng. Pathogenesis Related)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction)

PVP40 – polivinilpirolidon

qPCR - kvantitativna lančana reakcija polimerazom (eng. quantitative Polymerase Chain Reaction)

RISR - indukovana sistemska otpornost rizobakterijama (eng. Rhizobacteria Induced Systemic Resistance)

REM - remedijacione vrednosti

ROS - reaktivna kiseonikova jedinjenja

RNK - ribonukleinska kiselina

RWC - Relativni sadržaj vode u listovima (eng. Relative Water Content)

SAR - sistemska stečena otpornost (eng. Systemically Acquired Resistance)

SA - salicilna kiselina (eng. Salicylic Acid)

SOD - superoksid-dismutaza

SZMC - Szeged Microbiology Collection

SWC - sadržaj vode u zemljištu

TF - transkripcioni faktor

TEA - trietanolamin

THSC: *Trichoderma harzianum* species complex.

YEM - podloga sa ekstraktom kvasca (eng. Yeast Extract Medium)



# 1. UVOD

Prvi opis gljiva roda *Trichoderma* (Carstvo - Fungi, Podrazdeo - Ascomycota, Pod/tip-Pezizomycotina, Klasa - Sordariomycetes, Red - Hypocreales, Familija - Hypocreaceae) dat je 1794. godine, dok je njihova primena kao organizama antagonista prema biljnim patogenima poznata od dvadesetih godina prošlog veka. Pored uloge u kontroli biljnih bolesti, primena ovih gljiva je veoma velika i zasnovana je na njihovoj sposobnosti da utiču na podsticanje rasta i razvoja biljaka modifikacijama u rizosferi, zatim na sposobnosti prilagođavanja različitim uslovima životne sredine, kompetitivnosti u usvajanju hranjivih supstanci, kao i mogućnosti stvaranja mehanizama odbrane prema različitim biotskim i abiotskim stresovima.

Iako su kosmopolitske vrste, prisutne u različitim ekosistemima, uticaj različitih parametara životne sredine na njihov opstanak u zemljištu nije dovoljno razjašnjen. Varijabilnost gljiva roda *Trichoderma* je veoma visoka, što daje veliki broj mogućnosti za ispitivanja osobina i karakteristika različitih vrsta i izolata za mogućnost njene primene kako u poljoprivredi, tako i u različitim granama industrija. Pored poznatih pozitivnih efekata različitih vrsta ove gljive, postoje vrste koje su fitotoksične, ali i onih koje su patogeni za ljude sa imunološkim problemima. Mnoge vrste ne mogu da se razlikuju na morfološkom nivou, pa je iz tih razloga identifikacija vrsta gljiva roda *Trichoderma* na molekularnom nivou od ključnog značaja za njihovu primenu. Za odabir izolata i vrsta za primenu u *in vivo* uslovima, pored identifikacije na nivou DNK, potrebno je zadovoljiti određene kriterijume: sposobnost kontrole biljnih patogena, izazivanje povećanja otpornosti biljaka prema abiotskim i biotskim stresovima, promocija rasta korena biljaka, preživljavanje u rizosferi, proizvodnja sekundarnih metabolita u funkciji odbrane prema patogenim mikroorganizmima ili u funkciji supstanci koje podstiču biljni rast i imaju pozitivno sinergističko dejstvo sa hemijskim sredstvima koja se primenjuju u poljoprivredi. Kako je najpoznatija njihova primena u biokontroli biljnih patogena, komercijalni preparati na bazi ovih gljiva deo su integracionog menadžmenta štetočina (IPM - integrated pest management), kao alternative

primeni hemijskih sredstava, i preparati na bazi ove gljive čine oko 60% od ukupnog broja registrovanih biopesticida.

Dosadašnja identifikacija gljiva iz roda *Trichoderma* na teritoriji Republike Srbije nije rađena. Literaturni podaci ukazuju da proučavanje varijabilnosti gljiva iz roda *Trichoderma* na teritoriji Republike Srbije mogu da doprinesu potencijalnoj primeni autohtonih vrsta ovih gljiva za potrebe poljoprivrede i bioremedijacije.

Cilj ove doktorske disertacije je bio utvrđivanje varijabilnosti gljiva roda *Trichoderma* u različitim tipovima zemljišta u funkciji različitih edafskih faktora i sadržaja metala, kao i ispitivanje efikasnosti nekih izolata prema različitim biotskim i abiotskim stresovima, da bi se identifikovali izolati sa potencijalnom primenom u remedijaciji zemljišta i u povećanju otpornosti biljaka prema stresovima.

Da bi se ostvarili ovi ciljevi, bilo je potrebno realizovati sledeće zadatke:

- Fizička, hemijska i mikrobiološka karakterizacija različitih tipova zemljišta iz kojih su se uspešno izolovali izolati iz roda *Trichoderma*;
- Identifikacija gljive iz roda *Trichoderma* primenom molekularnih metoda za utvrđivanje varijabilnosti;
- Ispitivanje varijabilnosti različitih vrsta gljiva iz roda *Trichoderma* u funkciji fizičko-hemijskih i mikrobioloških osobina odabranih tipova zemljišta iz kojih su izolovane, kao i u funkciji sadržaja metala;
- Ispitivanje toleranosti odabranih izolata gljiva iz roda *Trichoderma* prema različitim koncentracijama metala čiji je sadržaj u ispitivanim uzorcima zemljišta iznad MDK vrednosti;
- Utvrđivanje antagonističke sposobnosti odabranih izolata prema fitopatogenima;
- Ispitivanje uticaja odabranog izolata gljiva roda *Trichoderma* (kao biotskog) i suše (kao abiotskog stresa) na biljke paradajza, u uslovima kada svaki stres deluje pojedinačno i u uslovima zajedničkog dejstva oba stresa.

Dobijeni rezultati trebalo bi da daju informacije o uticaju različitih edafskih faktora i prisustva metala na varijabilnost gljiva roda *Trichoderma*, kao i na mogućnost primene autohtonih izolata za potrebe različitih grana biotehnologije i poljoprivrede.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Gljive iz roda *Trichoderma*

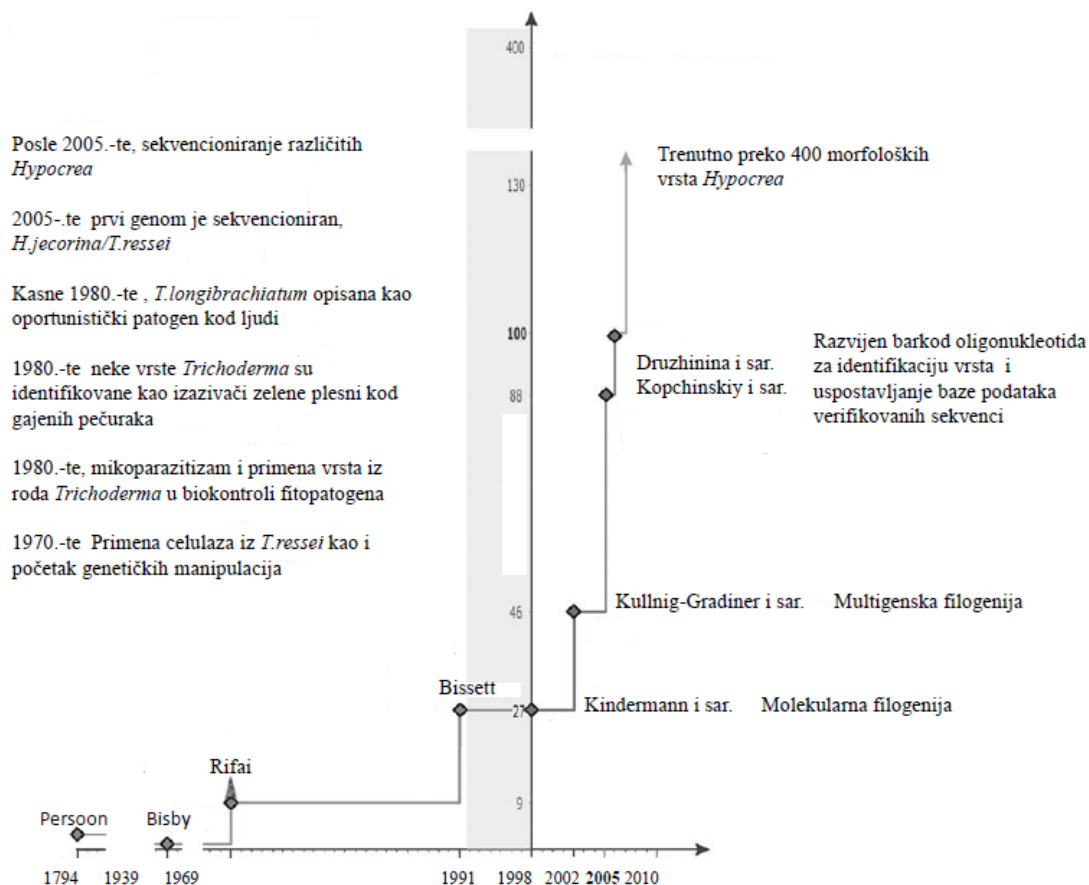
#### 2.1.1. Rod *Trichoderma*

Gljive iz roda *Trichoderma*, teleomorfni oblik *Hypocrea*, pripadaju podrazdelu *Ascomycota*, redu *Hypocreales*, familiji *Hypocreaceae*. To su kosmopolitske filamentozne gljive koje se pojavljuju kao dominantne komponente zemljišnog ekosistema. Gljive iz roda *Trichoderma* imaju i anamorfnu formu i tada se razmnožavaju putem spora ili ubrzanim rastom hifa (Gams i Bissett, 1998). Teleomorfni oblik gljiva *Trichoderma* ima iste osnovne morfološke karakteristike kao i anamorfni, ali se razmnožavaju seksualnim putem formirajući askospore. Ove gljive formiraju kolonije različitih boja, žute, bele ili zelene, na osnovu kojih je nekada rađena identifikacija vrsta (Rifai, 1969).

Rod *Trichoderma* prvi put se pominje 1794. godine radom naučnika Persoon-a koji ga identifikuje kao zelenu plesan na drvetu i drugim supstratima (Schuster i Scmoll, 2010), dok klasifikacija vrsta počinje tek radom naučnika Rifai 1969. godine, na osnovu morfoloških karakteristika (Rifai, 1969).

Kasnije, 80'-ih godina Bissett je predložio novu klasifikaciju na osnovu ključnih morfoloških karakteristika i tada su identifikovane četiri sekcije: *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* i *Hypocreanum* (Bissett, 1991 a;b;c). Danas se i dalje koriste ključne morfološke karakteristike gljiva iz roda *Trichoderma* za njihovu identifikaciju, jer one proizvode konidiofore koje se granaju u vidu koničnog ili piramidalnog izgleda. Na vrhu konidiofora mogu se naći ravne strukture koje se nazivaju fijalide. Fijalidospore koje se nalaze na vrhu fijalida, tkz. konidije, se akumuliraju gradeći glavu na vrhu fijalide. Međutim, tek uvođenjem molekularnih metoda identifikacija vrsta gljiva iz roda *Trichoderma* je znatno ubrzana i pojednostavljena (Kindermann i sar., 1998; Kullnig-Gradinger i sar., 2002). Poslednjih godina razvijene su informatičke baze podataka

koje nakon primenjenih molekularnih metoda olakšavaju identifikaciju, poput online programa *TrichOkey* (Druzhinina i sar., 2005) i *TrichoBLAST* (Kopchinskiy i sar., 2005). Pored ove, još jedna od korisnih metoda za identifikaciju kako autohtonih vrsta, tako i rekombinantnih izolata, je fenotipska karakterizacija uz pomoć mikročipova, koji omogućavaju analizu na osnovu iskorišćenja 96 različitih izvora ugljenika (Bochner i sar. 2001; Kubicek i sar. 2003; Druzhinina i sar. 2006a). Broj opisanih i potvrđenih, filogenetski-različitih vrsta *Trichoderma*, do sada je prešao brojku 100 (Druzhinina i sar., 2006b). Na Slici 1. prikazan je razvoj proučavanja gljiva roda *Trichoderma* na vremenskoj skali, gde se ističe veliki doprinos metode sekvencioniranja za ubrzanu identifikaciju novih vrsta.



Slika 1. Razvoj proučavanja gljiva iz roda *Trichoderma* (Druzhinina i sar., 2006b)

## 2.2. Ekologija gljiva iz roda *Trichoderma*

### 2.2.1. Ekološka niša

Gljive iz roda *Trichoderma* naseljavaju različite ekosisteme, ali pretežno su zastupljene u različitim tipovima zemljišta, od poljoprivrednog preko šuma, pašnjaka, voćnjaka, ali i pustinja (Kredics, 2014). Pored toga što su saprofitni organizmi, i najzastupljenije su u A zemljišnom horizontu, one su i endofiti biljaka (Harman i sar., 2004a). Veoma im odgovara vlažna klima, pa se u najvećem broju mogu izolovati iz vlažnih šumskih zemljišta. Veliki broj novih vrsta u okviru roda *Trichoderma* utvrđen je i izolacijom u životnim sredinama izloženim različitim biotskim i abiotskim stresovima. U ovim uslovima se najčešće može izolovati *T. viride*, dok *T. harzianum* najčešće naseljava rizosferu različitih poljoprivrednih kultura (Parkinson i sar., 1963). gde usled razmene i prepoznavanja signalnih molekula mogu nastati fiziološke i biohemijske promene kod *Trichoderma* ali i kod biljaka (Contreras-Cornejo i sar., 2016).

Visoka reproduktivna sposobnost, preživljavanja pod vrlo nepovoljnim uslovima, efikasnost u iskorištavanju nutritijenata, kapacitet da modifikuje rizosferu kao i snažne agresivnost prema fitopatogenim gljivama omogućava dobro preživljavanje *Trichoderma* u rizosferi (Harman, 2006).

*Trichoderma* je kosmopolitski kolonizator celuloznog materijala i može se naći na mestima razlaganja biljnog materijala (Jaklitsch, 2009). Ova raznolikost u naseljavanju ekoloških niša ukazuje na prilagođenost gljiva iz roda *Trichoderma* na različite uslove životne sredine. Ipak, na zastupljenost različitih vrsta imaju uticaj određeni faktori životne sredine. Najvažnije fizičko-hemijske karakteristike uslova životne sredine koji utiču na opstanak gljiva iz roda *Trichoderma* su: temperatura, vodni potencijal, pH, prisustvo organskih supstanci, dostupnost hranjivih supstanci i vegetacija. Pored nabrojanih parametara, zagađenje životne sredine je jedan od ključnih faktora za zastupljenost vrsta, od kojih se ističe zagađenje pesticidima i metalima (Kredics i sar., 2003a).

Prethodnim istraživanjima utvrđeno je da vrsta *T. harzianum* uglavnom preživljava u toplijim sredinama, dok vrste *T. polysporum* i *T. viride* naseljavaju hladnije regione (Danielson i Davey, 1973; Klein i Eveleigh, 1998). Temperaturni raspon za njihovo preživljavanje je od 0 °C do 40 °C, a od temperature zavisi i sposobnost ovih gljiva za produkciju različitih isparljivih jedinjenja (Tronsmo i Dennis, 1978).

Optimalna pH vrednost zemljišnog rastvora za razvoj i rast spora *Trichoderma* je u opsegu od oko 3 do 6, mada ima dokaza i za preživljavanje na pH 2,1. Singh i sar. (2014) su ispitivali uticaj temperature i pH na najbolji rast ovih gljiva. Njihovi rezultati ukazuju da je optimalna temperatura za rast između 25 i 30 °C, a pH vrednost od 5,5 do 7,5.

Vodni potencijal zemljišta koji predstavlja sadržaj vode u zemljištu, je veoma važan faktor za preživljavanje gljiva iz roda *Trichoderma*. Vodni potencijal zavisi od temperature, pa što je temperatura viša on opada. Negativan vodni potencijal loše utiče na rast hifa, proizvodnju spora i germinaciju, kao i na sposobnost biološke kontrole gljiva iz roda *Trichoderma*. I pored ovoga, dokazano je da *T. viride* preživljava na zemljištu sa izmerenim vodnim potencijalom od - 240 MPa (Bourguignon, 2008).

Smatra se da su pH, temperatura i vodni potencijal najvažniji faktori životne sredine koji utiču na rasprostanjenost i distribuciju gljiva *Trichoderma* u različitim ekosistemima. Pored ovih, važan uticaj imaju redoks potencijal, dostupnost hranjivih supstanci, mehanička struktura zemljišta, sastav vazduha i sunčevo zračenje.

### **2.2.2. Diverzitet supstrata i metabolizam gljiva**

Gljive iz roda *Trichoderma* kao saprofiti mogu da metabolišu različite ugljenohidratne supstrate, poput saharoze, D-manoze, D-ksiloze, D-galaktoze, D-fruktoze i rafinoze. Kako se većina ugljenih hidrata nalazi vezana u kompleksnije strukture, polisaharide, poput celuloze, hitina, skroba, ksilana i pektina *Trichoderma* je razvila specifične enzime za njihovu razgradnju (Klein i Eveleigh, 1998). Ugljeni hidrati su glavni izvor ugljenika za vrste roda *Trichoderma*, a kao izvor azota one najčešće koriste amonijak, a ređe amino-kiseline poput alanina, aspartamske i glutaminske kiseline. Takođe, utvrđeno je da neke

vrste gljiva roda *Trichoderma* mogu da razgrađaju i neka jedinjenja iz grupe ksenobiotika poput ugljovodonika, organohlornih pesticida, ali i nekih jedinjenja koja sadrže jedan ugljenikov atom poput metanola (Klein i Eveleigh, 1998), kao i to da preživljavaju u ekosistemima zagađenim teškim metalima (Tripathi i sar., 2013).

Za usvajanje osnovnih hranjivih supstanci gljive moraju da razgrade kompleksnije strukture poput ugljenih hidrata ili proteina za dostupnost ugljenika ili azota. Na osnovu heterogenosti supstrata na kojima preživljavaju one sintetišu različite hidrolitičke enzime kojima ih razgrađuju do neophodnih hranjivih supstanci (Griffin, 1994; Koivula i sar., 1998). Njihova sposobnost proizvodnje značajnih količina ekstraćelijskih celulaza dovodi do primene gljiva u industriji tekstila i papira, jer veoma uspešno razgrađuju celulozu (Durand i sar., 1998). Pored enzima celulaze, dokazana je i povećana proizvodnja enzima hitinaze, glukanaze, amilaze, hemicelulaze (Worasatit i sar., 1994), kao i enzima koji razgrađuju ćelijski zid (Lorito i sar., 1996; Steyaert i sar., 2003).

U cilju degradacije proteina i peptida ova gljiva proizvodi ekstraćelijske proteolitičke enzime sa slabom specifičnošću za supstrat, pa uspevaju da usvajaju aminokiseline kao izvor azota ili sumpora. Veliki broj vrsta proizvodi i enzime od velike važnosti u metabolizmu, kao što su glutamin-sintaza i NADPH-glutamat-dehidrogenaza, a korisni su u asimilaciji amonijaka (Ahmad i sar., 1995).

Produkcija ekstraćelijskih enzima je poznata osobina rizosfernih mikroorganizama. U produkciji ovih enzima gljive iz roda *Trichoderma* se ističu među drugim mikroorganizmima, pa se stavlja poseban akcenat i na genetičke manipulacije, odnosno izolaciju gena koji kodiraju proizvodnju ovih enzima (Viterbo i sar., 2002). Gljive iz roda *Trichoderma* su poznate da mehanizmom mikoparazitizma mogu da suzbiju biljne patogene, ali i da imaju pozitivne efekte na biljke, ubrzavajući njihov rast i razvoj, i dovode do indukcije otpornosti (ISR) kod njih. Antagonizam ovih gljiva ogleda se u proizvodnji antibiotika i hidrolitičkih enzima, ali i kompeticiji za prostorom i hranjivim supstancama.

Neki od enzima, poput celulaza i ksilanaza imaju važnu ulogu u razlaganju biljnih ostataka i zaduženi su za preživljavanje i sposobnost kompeticije različitih vrsta. Dok, hitinaze, glukanaze i proteaze imaju ulogu u degradaciji ćelijskog zida patogena.



Hitinaze (enzimi koji katalizuju razlaganje hitina) su veoma proučavani enzimi koje proizvodi *Trichoderma* kako bi se razjasnila njihova uloga u biokontroli. Oni katališu raskidanje glikozidne veze između ostataka N-acetil- $\beta$ -D-glukoamina, i podeljeni su u tri klase: 1,4- $\beta$ -N-acetilglukozaminidaze (heksozaminidaze ili hitobiazze), koje katalizuju hidrolizu polimera hitina do GlcNAc monomera; endohitinaze koje katalizuju hidrolizu glikozidnih veza unutar polimera i egzohitinaze (hitobiozidaze) na krajevima polimernog lanca. Tri N-acetilglukozaminidaze su izolovane iz različitih vrsta *Trichoderma* (Koga i sar., 1991; Ulhoa i Peberdy, 1991; Lorito i sar., 1993) i tri gena: *exc1*, *exc2* i *nag1* su klonirana (Draborg i sar., 1995; Peterbauer i sar. 1996).

Glukanaze su druga grupa ključnih enzima uključenih u mikoparazitizam ovih gljiva.  $\beta$ -1,3-glukan (laminarin) i  $\beta$ -1,4-D-glukan (celuloza) su glavne komponente ćelijskog zida zajedno sa hitinom. Laminarin hidrolizuju  $\beta$ -1,3-glukanaze, koje se dele na egzo- i endo- $\beta$ -glukanaze, i kao proizvodi dobijaju se prvo oligosaharidi, a zatim monosaharidi. Ovi enzimi imaju više funkcija, uključujući razvoj, diferencijaciju, i mobilizaciju  $\beta$ -glukana u uslovima gubitka izvora energije. Glukanaze su uključene u proces antagonizma prema vrstama roda *Pythium*.

Proteaze su još jedna važna grupa enzima, koji u sinergizmu sa hitinazama i glukanazama doprinose povećanoj aktivnosti vrsta ovih gljiva u antagonizmu prema fitopatogenima. Među najpoznatijim proteazama uključenim u ovaj mehanizam su *alkalne proteaze* koje sintetiše *T. harzianum* (de Marco i Felix, 2002). Isti autori navode da su proteaze koje proizvode neke vrste gljiva roda *Trichoderma* uključene u inaktivaciju ekstraćelijskih enzima koje proizvode fitopatogeni.

Molekularne i katalitičke osobine ovih enzima govore o njihovom sinergističkom dejstvu, ali i da istovremena proizvodnja antibiotika dodatno podstiče lizu ćelijskih zidova patogena (de Marco i Felix, 2002).

### 2.2.3. Proizvodnja antibiotika

Weindling i Emerson (1936) pokazali su da se rod *Trichoderma* ističe po sintezi isparljivih i neisparljivih metabolita. Šest glavnih grupa metabolita nastalih kao proizvodi metabolizma ovih gljiva su:

- 1) Poliketidi: su najbrojnija klasa metabolita, a za njihovu biosintezu zaslužno je repetitivno vezivanje masnih kiselina. Krajnji proizvodi nastaju u reakcijama oksidacije, ciklizacije i alkilacije poliketidnog lanca, katalizovanim različitim enzimima (Sivasithamparam i Ghisalberti, 1998). *T. viride* i *T. harzianum* sintetišu sekundarne metabolite: antrahinone, harzianopiridon i harzianolid (Howell, 1998).
- 2) Pironi: njihova biosinteza još uvek nije precizno definisana, mada se smatra da nastaju u različitim putevima sinteze poliketidnih lanaca. Antigljivično jedinjenje 6-pentil- $\alpha$ -piron je glavna komponenta koja daje aromu kokosa iz *T. viride* (Rifai, 1969). Ovo je jedan od najpoznatijih metabolita koje proizvode vrste roda *Trichoderma* (Ghisalberti i Sivasithamparam, 1991). Pored ovog jedinjenja iz klase pirona dokazana je i proizvodnja mazoilaktona i  $\delta$ -dekanolaktona koji su uključeni u kontrolu biljnih patogena.
- 3) Terpeni: njihove strukture su različite, a biosinteza dobro objašnjena. Oni su najprisutnija jedinjenja u prirodi. R-mevalonska kiselina je početno jedinjenje za sintezu svih terpenoidnih struktura preko interemedijera izopentenil- i dimeteilalil-difosfata. U okviru seskviterpena *T. viride* sintetiše dva važna proizvoda: gliokladinsku i heptalidinsku kiselinu (Ghisalberti i Sivasithamparam, 1991; Howell i sar., 1993). *T. viride* izlučuje steroide, koji su nastali iz prekursora terpena, viridin i viridol. Dokazano je da oni učestvuju u supresiji biljnog patogena *R. solani* (Lumsden i sar., 1992a) i *P. ultimum* (Howell i Stipanović, 1984). Seskviterpeni trihoteceni, su velika grupa toksičnih sekundarnih metabolita, koje proizvode dve vrste roda *Trichoderma*, *T. arundinaceum* i *T. brevicompactum*.
- 4) Izocijano-derivati (izonitrili): ovu klasu metabolita karakteriše izocijano-grupa, gde je ugljenikov atom vezan za azotov atom. Amino kiselina tirozin je prekursor u sintezi izonitrila. Važni antibiotici (dermatin, izonitrin A i izonitratna kiselina F) su

otkriveni u ovoj klasi jedinjenja, koje proizvode *T. viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum* i *T. konigii*.

- 5) Neribozomni peptidi (NRP predstavljaju velike grupe ekološki i ekonomski važnih sekundarnih metabolita, među kojima su najvažniji: diketopiperazini, peptaiboli i siderofore.

Diketopiperazini su ciklični dipeptidi koji nastaju ciklizacijom dve  $\alpha$ -aminokiseline, poput serina i fenilalanina. Dva antibiotika iz ove klase, gliotoksin i gliovirin, proizvodi *T. virens*. Prvi metabolit gliotoksin je izolovan 1936.godine (Weindling i Emerson, 1936), a gliovirin 1982.godine (Howell i Stipanović, 1984). Oba ova jedinjenja imaju sposobnost supresije biljnog patogena *R. solani* i *P. ultimum* (Lumsden i sar., 1992a, Howell i Stipanović, 1984). Izolati koji pripadaju vrsti *T. virens* koji proizvode gliotoksin nisu isti kao oni koji proizvode gliovirin (Howell i sar., 1993). Gliotoksin proizvode dva genetski udaljena izolata koji naseljavaju različite ekološke niše (Mukherjee i sar., 2012).

Peptaiboli su klasa peptida linerane, ređe ciklične strukture koju karakteriše prisustvo retke amino-kiseline,  $\alpha$ -aminoizobuterne kiseline (Schirmbock i sar., 1994). Obuhvataju veliki broj jedinjenja, preko 1000, koja se mogu podeliti na tri grupe: peptiboli duge sekvence (18-20 aminokiselina), peptaiboli kratke sekvence (11-18 aminokiselina) i lipopeptaiboli (7-11 aminokiselina). Svaka subklasa obuhvata značajne antibiotike, kao što su trihorzianini izolovanih iz *T. harzianum*, trihopolini izolovani iz *T. polysporum*.

Siderofore su sekundarni metaboliti koji heliraju gvožđe, a važni su u interakciji mikroorganizma sa biljkama i među sobom. Među sideroforama koje proizvode gljive ističu se fusarinini, koprogeni i ferihromi koji spadaju u grupu hidroksamatnih siderofora (Renshaw i sar., 2002). Vinale i sar. (2009) su izolovali i opisali harziansku kiselinu najnoviju sideroforu iz *T. harzianum*, koja pokazuje pozitivan uticaj na rast biljaka a poseduje sposobnost vezivanja esencijalnih jona metala poput  $Fe^{3+}$ .

Pored nabrojanih jedinjenja iz različitih klasa metabolita iz godine u godinu spisak se proširuje sa novo otkrivenim jedinjenjima. Pored proizvodnje antibiotika, vrste roda

*Trichoderma* proizvode i druge metabolite poput pigmenta melanina i karotena, kao i regulatore biljnog rasta. Međutim ekološka uloga mnogih metabolita je još uvek nedovoljno istražena i proučavana.

### **2.3. Primena gljiva iz roda *Trichoderma***

Gljive roda *Trichoderma* imaju primenu u različitim granama biotehnologije i u poljoprivredi. Među prvima treba istaći njihovu antagonističku sposobnost čime zauzimaju značajno mesto u biološkoj kontroli biljnih patogena. Pored interakcije *Trichoderma* - patogen, određeni izolati pomenute gljive imaju i druge pozitivne efekte na rast i razvoj biljaka. Ovi pozitivni efekti su posledica povećane otpornosti na bolesti, podstaknutog rasteanja i tolerancije na abiotičke činioce stresa. Ovo ukazuje na veliki potencijal za korišćenje vrsta *Trichoderma* kao inokulanata za rast i promociju zdravlja biljaka (Contreras-Cornejo i sar., 2016).

Pored navedenih uloga, neke vrste ovih gljiva poznate su i po proizvodnji enzima celulaze, pa se primenjuju i u industriji za razgradnju celuloze. Takođe, sve više se ispituje njihova primena u bioremedijaciji zemljišta zagađenih teškim metalima i organskim zagađujućim supstancama. Interakciju *Trichoderma*-biljka treba u budućnosti sagledati u okviru klimatskih promena koje su posledica globalnog otopljanja praćenog sušom, poplavama i toplotnim talasima. Očekuje se da se uticaj delovanja višestrukih navedenih abiotičkih i biotičkih stresova (napadi štetočina: bakterije, gljive, virusi i nematode) može umanjiti adekvatnom primenom gljiva roda *Trichoderma* (Rajkumar i sar., 2013).

#### **2.3.1. Uloga gljiva roda *Trichoderma* u biokontroli biljnih bolesti**

Vrste roda *Trichoderma*, poznate od 18.veka, tek su radom Weindling i sar. (1934) privukle pažnju poljoprivrednika, kada su dokazali da jedna od vrsta iz roda *Trichoderma* može da se upotrebi u kontroli biljnih bolesti prouzrokovane delovanjem različitih vrsta patogena. Određene vrste patogena, poput gljivičnih patogena *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* i *Fusarium*, smatraju se jednim od najagresivnijih u poljoprivrednoj

proizvodnji. Hemijske mere zaštite (primena fungicida) nisu uvek efikasne, povećavaju troškove proizvodnje i zagađuju životnu sredinu. Stalna upotreba različitih hemijskih mera zaštite (primena fungicida) dovodi do izazivanja pojave rezistentnih izolata patogena, pa se bolest više ne može kontrolisati ni povećanjem doze ni učestalosti tretmana. Iz tog razloga, od druge polovine 20.veka razvijaju se alternativni načini u borbi protiv patogena, koji su ekološki prihvatljivi (Benítez i sar., 2004). Jedna od mera zaštite je i primena biološke kontrole koja podrazumeva upotrebu mikroorganizama koji deluju antagonistički na patogene biljaka i kao takva koristi se za poboljšanje i zaštitu poljoprivrednih zemljišta. Značajne rezultate u ovom polju pokazali su različiti izolati gljiva iz roda *Trichoderma*. Prvi uspešni eksperiment primene *Trichoderma* kao biokontrolnog organizma objavljen je 1972.godine (Wells i sar., 1972).

Neki od najpoznatijih izolata koji pokazuju snažne antagonističke sposobnosti su: *T. virens*, *T. viride* i *T. harzianum*. Brza sposobnost razmnožavanja, sposobnost za preživljavanje u različitim životnim uslovima, efikasnost pri usvajanju hranjivih supstanci, sposobnosti prilagođavanja i modifikacija rizosfere, putem snažne agresivnosti protiv fitopatogenih gljiva, efikasno promovisanje biljnog rasta čine ovu gljivu jedinstvenom u različitim ekosistemima (Benítez i sar., 2004).

Mehanizmi kojima ove gljive deluju u zemljištu u smislu biokontrole mogu biti: indirektni (mehanizam kompeticije za hranjivim supstancama ili prostorom, proizvodnja avirulentih molekula (antibiotika) kojima ubijaju druge patogene, kao i proizvodnjom metabolita kojima svoje okruženje prilagođavaju sebi, a čine ga toksičnim za druge gljive ili proizvodnjom metabolita kojima indukuju sistemsku stečenu otpornost (SAR) biljaka prema patogenima i stimulišu biljni rast) i direktni (mikoparazitizam).

Među nabrojanim mehanizmima ističu se:

- a) *Mikoparazitizam* kao direktni oblik biokontrole obuhvata direktni napad jedne gljive na drugu. Ovaj proces podeljen je u četiri osnovna koraka: hemotrofni rast (lučenje jedinjenja kojim ciljani organizam privlači antagonista), zatim sledi specifično prepoznavanje gde antagonista prepoznaje ćelijski zid patogena, zatim se antagonista ili uvija oko ciljanog organizma ili dolazi do vezivanja hife antagonista uz hifu ciljanog organizma i na kraju dolazi do sekrecije litičkih enzima koji

razgrađuju ćelijski zid. Litički enzimi koji učestvuju u razgradnji ćeliskog zida su  $\beta$ -glukanaze, hitinaze i proteinaze. Na primer, većina vrsta iz roda *Trichoderma* izlučuje  $\beta$ -1,3-glukanaze i hitinaze kada se nađe u prisustvu *R. solani* (Chet i Baker, 1981). Ova sposobnost sekrecije litičkih enzima je od osnovne važnosti za mehanizam biokontrole, što je dokazano i poređenjem mutantog izolata koji je proizvodio znatno veće količine enzima u odnosu na divlji izolat (Rey i sar., 2001).

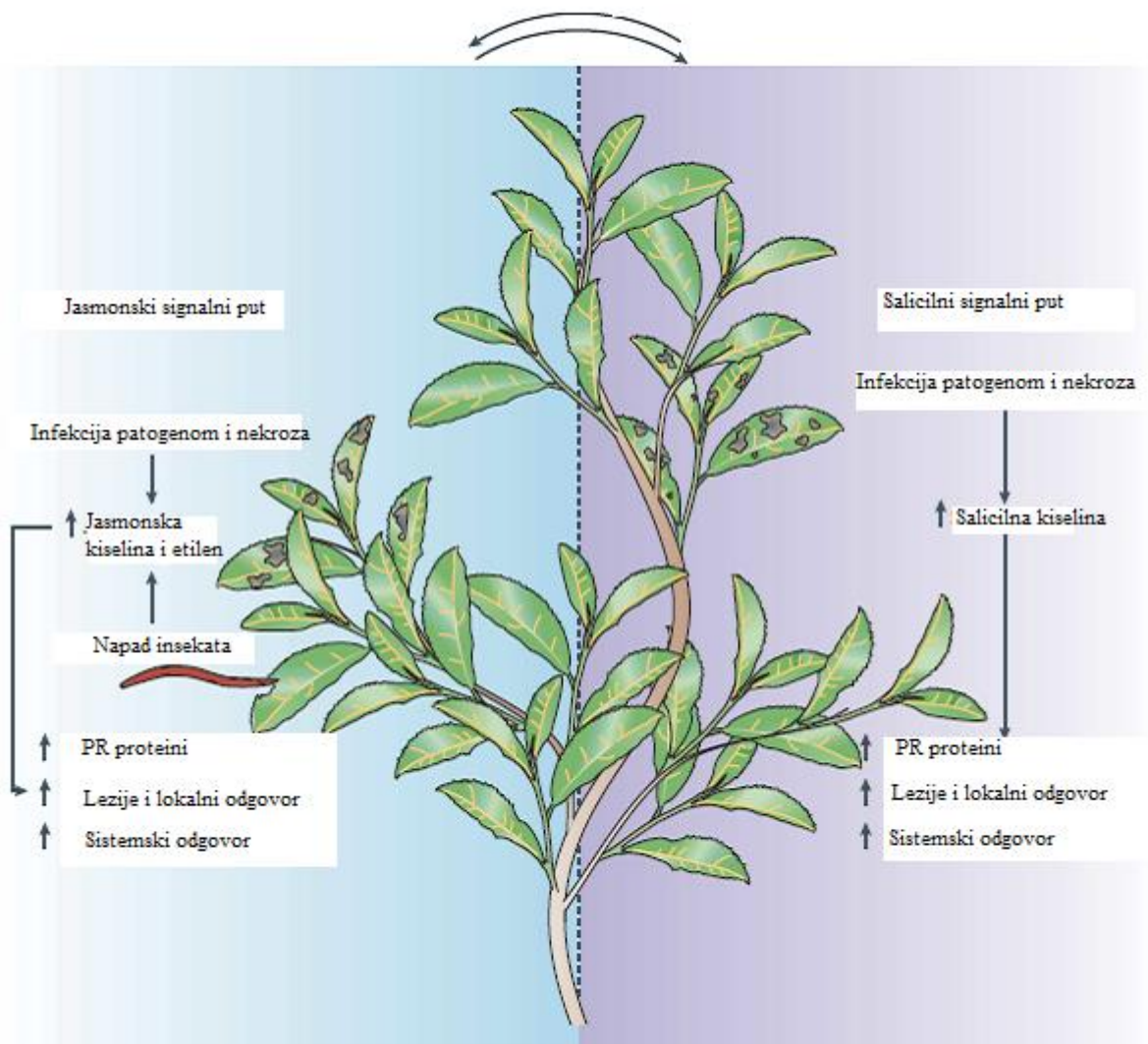
- b) *Antibioza* kao indirektni oblik odnosi se na proizvodnju antibiotičkih supstanci. Često je ovaj oblik biokontrole u sinergizmu sa mikoparazitizmom, gde hidrolitički enzimi koji se luče u dodiru sa hifama omogućavaju prodor antibiotika u ćeliju domaćina. Tada, antibiotici inhibiraju sintezu ćelijskog zida i povećavaju aktivnost enzima (Schirmbock i sar., 1994, Lorito i sar., 1996). Pored sinergističkog dejstva uz mikoparazitizam, ovaj oblik biokontrole obuhvata veliki broj mehanizama poput inhibicije rasta domaćina, proizvodnje primarnih metabolita, usvajanje hranjivih supstanci i sporulaciju (Howell, 1998; Wilcox i sar., 1992). Ovaj oblik biokontrole zavisi od vrste gljiva iz roda *Trichoderma*, pa nemaju sve vrste iste sposobnosti, a takođe i različiti izolati unutar vrsta mogu ispoljavati različita dejstva (Howell i sar., 1993).
- c) *Kompeticija* između gljiva roda *Trichoderma* i drugih mikroorganizama se svrstava u indirektni antagonizam gde se *Trichoderma* različitim mehanizmima bori za prostor, enzime, nutrijente i kiseonik. Po prirodi *Trichoderma* se veoma brzo razvija i razmnožava, pa zahvaljujući toj osobini ona veoma efikasno kolonizuje širok spektar supstrata i ima sposobnost da se izbori za prostor sa manje agresivnim mikroorganizmima (Papavizas, 1985). Za sposobnost kompeticije neophodni su pogodni faktori spoljašnje sredine uključujući pH zemljišnog rastvora, temperaturu i vodni potencijal (Kredics i sar., 2003a).
- d) *Indukovana sistemska otpornost* koju prati promocija biljnog rasta poznati su mehanizmi dejstva ovih gljiva u slučajevima krastavca, paradajza, rotkvice, graška i cveća. Biljni rast se stimuliše direktno povećanjem usvajanja hranjivih supstanci ili sekrecijom hormona. Smatra se da se antagonistička sposobnost ovih gljiva protiv fitopatogenih gljiva zasniva na stimulaciji biljnog rasta inhibicijom rasta patogena,

pospešujući metabolizam biljke (Hermosa i sar., 2012). Međutim, ovu konstataciju treba uzeti sa rezervom, jer se u poljskim uslovima često dešava da ovu funkciju preuzmu bakterije PGPR (plant growth promoting rhizobacteria).

Novija istraživanja su pokazala da su ove gljive i avirulentni simbionti koji izazivaju lokalnu indukovanu (ISR – induced systemic resistance) ili sistemsku (SAR – systemic acquired resistance) otpornost na bolesti, formiraju endofitnu asocijaciju sa biljkom i izlučuju različita jedinjenja kojima pored zaštite, stimulišu rast biljke. Asocijacija između biljke i gljive uključuje prepoznavanje na molekularnm nivou uz pomoć signalnih molekula (biljnih hormona), salicilne, jasmonske kiseline i etilena. Dokazano je da su jasmonska kiselina i etilen signalni transdukcionni molekuli u indukovanju sistemske otpornosti (ISR), koji se aktiviraju nakon interakcije sa gljivom, dok se signalni put salicilne kiseline aktivira napadom patogena i indukuje sistemski stečenu otpornost (Hermosa i sar., 2012). Dokazano je da gljive roda *Trichoderma* indukuju otpornost protiv patogena u slučajevima paradajza, duvana, zelene salate, pamuka, pirinča i dr. (Harman i sar., 2004a).

Na Slici 2. prikazana su tri puta kojima se može indukovati otpornost kod biljke na primeru paradajza. Dva od prikazana tri puta uključuju proizvodnju PR (patogenesis-related) proteina. Najčešće je proizvodnja ovih proteina prouzrokovana napadom patogenih mikroorganizama, ili u drugom slučaju napadom herbivora ili insekata. Indukcija otpornosti u slučaju napada mikroorganizama podrazumeva stvaranje salicilne kiseline kao signalnog molekula, dok se u slučaju napada herbivora ili insekata aktivira put jasmonske kiseline kao signalnog molekula kod biljke. Između ova dva signalna puta postoji povezanost (crosstalk). Oba puta karakteriše proizvodnja kaskade PR proteina, koji uključuju hitinaze, glukanaze i taumatine, kao i oksidativne enzime poput peroksidaza, polifenol-oksidaza i lipooksigenaza. Proizvodnja jedinjenja malih molekulskih masa sa antimokrobnim dejstvom, poput fitoaleksina, takođe može da se aktivira. Molekuli koje sintetiše *Trichoderma* u slučaju oba navedena mehanizma su nepoznati, pa se direktna akumulacija PR proteina ili fitoaleksina smatra sistemski stečenom otpornošću (SAR). Treći tip indukovane otpornosti proističe dejstvom nepatogenih bakterija koje su vezane za koren biljke pa se on naziva rizobakterijska-stečena otpornost (RISR- rhizobacteria-induced systemic resistance). Ovaj tip otpornosti aktivira signalni put jasmonske kiseline i zavisi od

etilena. Njime se aktivira stanje pripremljenosti za napad patogena (primed state) u kome se ubrzava ekspresija gena kod biljke u slučaju napada patogena.



Slika 2. Indukcija sistemske otpornosti prikazana na primeru paradajza (Harman i sar., 2004a)



Faktori koji utiču na antagonističku aktivnost:

#### 1) Abiotički faktori

Temperatura znatno utiče na biokontrolnu aktivnost gljiva roda *Trichoderma*, pa tako vrste otporne na preživljavanje u hladnijim temperaturnim uslovima poput *T. viride* i *T. polysporum* znatno bolju aktivnost imaju u hladnijim uslovima od *T. harzianum* koja je netolerantna na hladne temperaturne uslove (Tronsmo i Dennis, 1978). Proučavanja Clarkson i sar. (2004) ukazala su da je antagonizam *T. viride* prema *S. cepivorum* redukovana na temperaturama nižim od 10 °C. Mehanizam antibioze, tj. proizvodnje antibiotika je takođe uslovljen temperaturom, gde je npr. aktivnost gliotoksina mnogo jača na temperaturi od 32 °C nego na 3 °C (Lumsden i sar., 1992). Veoma je važno istaći da za uspešan mehanizam antibioze oba organizma moraju da imaju ispunjene odgovarajuće temperaturne intervale (Hjeljord i Tronsmo, 1998).

Vodni potencijal je važan faktor u dejstvu *Trichoderma* na biljne patogene, jer se ona razvija bolje u vlažnim uslovima, pa u slučaju vodnog stresa može da se smanji proizvodnja litičkih enzima, poput hitinaze, i time redukuje dejstvo na patogene (Kredics i sar., 2000).

Kvalitet supstrata i dostupnost hranjivih supstanci su važni abiotički faktori koji utiču na proizvodnju sekundarnih metabolita, kao što je odnos C:N u supstratu. Eksperimenti su pokazali da je proizvodnja viridiola iz *T. virens* povećana kada je visok odnos C:N (Howell i Stipanovic, 1984). Ovo je kasnije potvrđeno povećanom proizvodnjom gliotoksina iz *T. virens* pri visokom odnosu C:N (Park i sar., 1991). Iz ovih dokaza proističe da sastav organskih supstanci ima veoma važno dejstvo na gljive roda *Trichoderma*.

Ostali važni abiotički faktori su: pH, sadržaj gvožđa, mehanički sastav i prisustvo fungicida (Duffy i sar., 1997).

#### 2) Biotički faktori

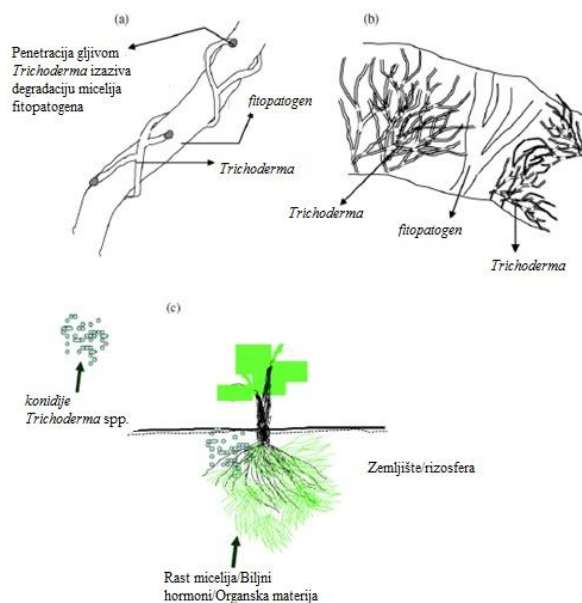
Poznato je da su zemljište i rizosfera kompleksni medijumi u kojima se mikroorganizmi bore za preživljavanje. Iako je poznato da su gljive iz roda *Trichoderma* kompetitivne u naseljavanju prostora ipak moraju da se bore sa nekim agresivnim organizmima. Prisustvo

oportunističkih mikroorganizma ograničavaju dostupnost supstrata gljivama roda *Trichoderma*.

U suprotnom sinergističko dejstvo *Trichoderma* sa odabranim vrstama bakterija poput *Pseudomonas* povećava njihovo dejstvo kao biokontrolnog organizma (Lutz i sar., 2004). Pa tako udruživanje dva ili više anatagonista može da ubrza i doprinese boljoj zaštiti biljaka od napada patogena.

### **2.3.2. Promocija biljnog rasta**

Gljive roda *Trichoderma* su endofitni simbionti biljaka i kao takve, pored primene u kontroli biljnih bolesti, one pospešuju biljni rast i prinos. Iako se endofitna interakcija ostvaruje sa korenom biljke ekspresija gena koji utiču na fiziološke promene kod biljke najbolje se prate u listovima (Harman i sar., 2004a). Kao kolonizatori korena biljke gljive, ubrzanom sintezom proteina svolenina, dovode do ubrzane proliferacije korena, intenzivnijeg rasta i veće zaštite korena biljke od toksičnih supstanci koje dospevaju u zemljište (Brotman i sar., 2008; Shuster i Schmoll, 2010). Promocija biljnog rasta primenom izolata ovih gljiva smatra se da je rezultat različitih mehanizama, koje se dele na direktne i indirektno (slika 3a,b,c) (Verma i sar., 2007). Direktne uključuju izlučivanje supstanci koje su regulatori biljnog rasta, zatim mogućnost rastvaranja fosfata, mikronutrijenata i minerala koji imaju važne uloge u biljnom rastu, kao i sekrecija molekula poput siderofora, ekstraćelijskih enzima i vitamina. Dok se pod indirektnim faktorima podrazumeva indukcija otpornosti prema patogenima, čime se utiče na promociju biljnog rasta. Smatra se da asocijacija gljiva roda *Trichoderma* sa korenom biljke indukuje kod biljke proizvodnju enzima koji liziraju ćelijski zid patogena (slika 3b, c).



Slika 3. Promocija rasta biljaka gljivama roda *Trichoderma*:

INDIREKTNO - a) mikoparazitizam i b) kompeticija; i DIREKTNO - c) rast micelija u rizosferi korena biljke i proizvodnja metabolita (Verma i sar., 2007)

Poznata je i njihova sposobnost da indukuju otpornost kod biljaka koje su izložene biotičkom ili abiotičkom stresu. Literaturni podaci ukazuju da primena gljiva iz roda *Trichoderma* u rizosferi biljaka povećava vigor korena i poboljšava otpornost prema suši, kao jednom od najznačajnijih abiotičkih stresova. Pored suše, one se primenjuju i u zaštiti biljaka koje su izložene i drugim abiotičkim stresovima, uključujući salinitet, vlagu, ekstremne temperature i/ili povećane koncentracije hranjivih supstanci (Mastouri i sar., 2010).

Kao odgovor na stres izazvan sušom biljke reaguju povećanom sintezom abscisinske kiseline (ABA), koja stimuliše zatvaranje stoma kako bi se smanjio gubitak vode. Ovim procesom smanjuje se dostupnost CO<sub>2</sub> neophodnog za fotosintezu, pa dolazi do remećenja ravnoteže reakcija u svetloj i tamnoj fazi fotosinteze čime se indukuje povećana proizvodnja reaktivnih kiseonikovih jedinjenja (ROS). ROS napadaju biološke strukture u ćelijama, izazivajući oštećenja DNK molekula, dovode do oksidacije amino-kiselina i proteina, kao i do lipidne peroksidacije. Kako bi se izbegla ova oštećenja biljke su razvile

mehanizme detoksifikacije slobodnih radikala koji mogu biti enzimski ili neenzimski. Enzimski obuhvataju sintezu i aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APX), glutation-reduktaze (GR), dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR) i monodehidroaskorbat-reduktaze (MDHAR). Neenzimski sistemi odbrane dovode do sinteze antioksidativnih jedinjenja poput fenola (flavonoida, antocijana, karotenoida), askorbinske kiseline i glutationa (Sanchez-Rodriguez i sar., 2010).

### **2.3.3. Bioremedijacija**

Novija istraživanja pokazala su da se određene vrste gljiva iz roda *Trichoderma* mogu upotrebljavati i u bioremedijaciji toksičnih supstanci iz zemljišta (Tripathi i sar., 2013). Bioremedijacija je ekonomski isplativa, zelena tehnologija kojom se zagađujuće supstance biološkim putem transformišu u netoksična jedinjenja ili se potpuno razgrađuju do ugljendioksida i vode (Beškoski i sar., 2011). Kao biološki agensi se najčešće koriste mikroorganizmi. U prethodnim odeljcima je objašnjeno da je najveća varijabilnost gljiva iz roda *Trichoderma* u površinskim slojevima zemljišta, posebno u rizosferi. Autohtoni izolati adaptirani u rizosferi, preživljavaju u blizini korena i po nekoliko meseci, ubrzavajući i povećavajući rast korena, povećavaju i usvajanje supstanci korenovim sistemom. Kao takvi, smatra se da se ovi izolati mogu koristiti u metodama fitoekstrakcije, jer su dodatno otporni na prisustvo zagađujućih supstanci (Harman i sar., 2004b; 2012). Mehanizmi razgradnje podrazumevaju produkciju enzima koji mogu da razgrađuju organska jedinjenja poput pesticida, organohlornih ili organofosfornih jedinjenja (Islas Pelcastre i sar., 2013). Organohlorni pesticidi poput dihlor-difenil-trihloretan (DDT), dieldrina i endosulfana, koji su klasifikovani kao veoma postojani i toksični, dokazano je da su razgrađeni nekim vrstama gljiva *Trichoderma* (Llado i sar., 2009). Pored razgradnje organskih supstanci, ove gljive su razvile mehanizme za bioremedijaciju teških metala, među kojima su najvažniji biosorpcija, biovolatilizacija i bioakumulacija. Kredics i sar. (2001) su pokazali da odabrani izolati ovih gljiva vezuju teške metale i čine ih manje toksičnim za životnu sredinu. Isti autori su pokazali da jedan izolat gljive može da toleriše prisustvo više različitih metala.

#### **2.3.4. *Trichoderma* kao biopesticid u modernoj poljoprivredi**

Biofungicidi, preparati na bazi gljiva iz roda *Trichoderma*, su sve prisutniji na svetskom tržištu sa preko 50 formulacija koje su već registrovane i dostupne su poljoprivrednicima sa krajnjim ciljem povećanja prinosa različitih useva (Woo i sar., 2006). Proizvodi na bazi gljiva roda *Trichoderma* spp. koje su poznate kao biokontrolni agensi čine oko 60 % od ukupnog broja registrovanih biofungicida. *T. harzianum* se ističe kao najkorišćenija vrsta u komercijalno dostupnim preparatima (Lorito i sar., 2010). Prethodno opisane prednosti koje ova gljiva pruža čine je stalnim i uspešnim BCA - agensom dugi niz godina (Verma i sar., 2007). Antagonistički potencijal ovih gljiva služi kao osnova za veoma efikasnim BCA agensom u primeni različitih izolata u biokontroli i time služe kao alternativa hemikalijama i metodama koje nisu ekološki prihvatljive (Chet, 1987).

U cilju pripreme isplativih formula na bazi BCA za primenu u poljoprivredi potrebno je da ona poseduje zadovoljavajuće karakteristike kao i potvrde o njenom dejstvu. Ovo podrazumeva zadovoljavajući potencijal tržišta, laku pripremu i aplikaciju, visoku stabilnost tokom transporta, čuvanje, obezbeđen dovoljan broj živih ćelija sposobnih za razmnožavanje, trajnu efikasnost i prihvatljivu cenu. Za pripremu formulacija na bazi *Trichoderma* postoje različite vezujuće supstance od kojih je najkorišćenija puder.

#### **2.3.5. Ostale primene**

Pored primene u biokontroli, za koju postoji značajan broj komercijalnih proizvoda na bazi ove gljive, primena ovih gljiva je velika. Tokom II Svetskog Rata otkrivena je izuzetna efikasnost izolata *T. viride* QM6 u razlaganju pamučnog platna šatora američke vojske. Izolat je sačuvan i nakon ispitivanja utvrđeno je da ovaj izolat proizvodi enzime celulazu i hemicelulazu, pa su istraživanja primene ovog enzima postala veoma intenzivna, da bi danas ovaj izolat poznat kao *T. reesei* postao veoma primenjiv u proizvodnji biogoriva (Schuster i sar., 2012). Zahvaljući ovim svojstvima sekvencioniran je i ceo genom ovog izolata (Martinez i sar., 2008). Danas se *T. reesei* koristi kao model organizam za

proučavanje regulacije i degradacije (hemi)celuloze (Aro i sar., 2005; Kubicek i sar., 2009). Nakon intenzivnog proučavanja enzima koje *Trichoderma* proizvodi u industrijskoj proizvodnji, počela je njena primena i u proizvodnji aditiva hrane i sličnih proizvoda (Nevalainen i sar., 1994; Blumenthal, 2004). Neki od enzima koje proizvodi danas se koriste u procesima proizvodnje piva ( $\beta$ -glukanaze), za maceraciju voćnih sokova, kao aditivi stočne hrane (ksilanaze) i hrane za kućne ljubimce. Pored enzima, i metaboliti koje gljive proizvode, koriste se kao aditivi. Prvi izolovani metabolit je 6-pentil- $\alpha$ -piron, sa kokos-kakao aromom, čija količina nakon ekstrakcije iznosi 7g/l tečne kulture *T. atroviride*. Neki novi pristupi su eventualna primena odabranih izolata, koji pokazuju antigljivični efekat, kao konzervanasa (Schuster i Schmoll, 2012).

Pored značajnih pozitivnih efekata velikog broja vrsta iz ovog roda, utvrđene su i negativne osobine određenih vrsta. Neke vrste su identifikovane kao uzročnici bolesti zelene plesni koja se javlja na farmama jestivih gljiva, i uzrokuje značajan gubitak u proizvodnji šampinjona (vrste *Agaricus bisporus*) i bukovača (vrste *Pleurotus ostreatus*) (Hatvani i sar. 2007). Za neke vrste iz roda *Trichoderma* je dokazano da su patogeni gmizavaca (Foreyt i Leathers, 1985; Jacobson, 1980), ali i oportunistički patogeni i uzročnici nekih infekcija kod ljudi (Kredics i sar., 2003b; Nagy i sar., 2004).

## 2.4. Zastupljenost različitih tipova zemljišta u Republici Srbiji

Kao dominantna komponenta mikoflore u prirodnim i poljoprivrednim zemljištima, gljive iz roda *Trichoderma* imaju značajnu ulogu u njegovom očuvanju. Pored toga što predstavlja osnov za život ljudi, zemljište je i osnovno sredstvo poljoprivredne proizvodnje, koja je jedna od prioritetnih oblasti u našem regionu.

Na teritoriji Republike Srbije prema uslovima obrazovanja zemljišta izdvajaju se tri pedogeografska rejon: Vojvodina (stepsko i šumsko-stepsko područje Panonske nizije), valoviti reljef središnje Srbije i planinska područja zapadne i istočne Srbije.

Prvi pedogenetski rejon, Vojvodina, nalazi se u južnom delu Panonskog (Karpatskog) basena i zauzima površinu od 2 150 600 hektara (Marković i sar., 2008). Vojvodinu u geomorfološkom pogledu pokrivaju:

- aluvijalni nanosi na rečnim terasama, na kojima se razvijaju fluvisoli, semiglejna zemljišta, ritska crnica, močvarno glejna i halomorfna zemljišta;

- lesni platoi s černozemom i lesne terase na kojima se razvijaju černozemno glejeno zemljište i slatine;

- eolski pesak s tipovima: arenosoli, rendzine i černozemi;

- planine (Fruška gora i Vršacke planine) na kojima se u zavisnosti od heterogenosti supstrata i od reljefa razvijaju: rendzine, rankeri, eutrična i distrična smeđa, lesivirana i koluvijalna zemljišta (Hadžić i sar., 2005).

Drugi pedogeografski rejon u geomorfološkom pogledu pokrivaju:

- gajnjače – eutrično smeđe zemljište, koje dominira u sekvenci (regosol-rendzina-eutrično smeđe-luvisol)

- smonice na teškim jezerskim sedimentima

- černozem – na manjim površinama lesa

- pseudoglej

- koluvijalna zemljišta

- fluvisoli, semiglejna, euglejna i ritska zemljišta.

Treći pedogeografski rejon zauzima područje Dinaridskih, Rodopskih, Šarsko-pindskih i Karpatsko-balkanskih planina gde dominiraju kalkokambisoli i luvisoli. Takođe, javljaju se i rankeri, eutrično smeđa, lesivirana zemljišta i smonice.

Pored podele na rejone, u okviru Klasifikacija zemljišta Jugoslavije (Škorić i sar., 1985) postoje četiri reda, a u zavisnosti od karaktera vlaženja i sastava voda kojima se zemljište vlaži:

1. Red automorfnih zemljišta karakteriše vlaženje atmosferskim padavinama, nemaju dodatnog vlaženja, perkolacija vode je slobodna i nema dužeg zadržavanja vode na nepropusnom horizontu.

2. Red hidromorfnih zemljišta karakteriše povremeno ili trajno zasićenje svih pora zemljišta vodom koja nije zaslanjena niti alkalizovana i redukcijски procesi u delu profila ili u celom profilu, osim kada su iznad glejnog horizonta očuvana svojstva nekog od tipova automorfnih zemljišta.

3. Red halomorfnih zemljišta (slatine) karakteriše dopunsko vlaženje podzemnim (ređe i površinskim) slanim i alkalizovanim vodama.

4. Red subakvalnih (subhidričnih) zemljišta nastaju u podvodnim uslovima plićih stajaćih voda (jezera, bare i močvare). Procesii pedogeneze često se mešaju s procesima sedimentacije.

Na pedološkoj karti Srbije, definisani su tipovi zemljišta i njihove niže systemske jedinice, od kojih se svaka izdvaja sa specifičnim morfološkim, fizičkim i hemijskim svojstvima. Prema tipu zemljišta koji dominira u Vojvodini izdvaja se černoze sa različitim podtipovima sa procentom zastupljenosti od 42,4 %, zatim slede livadske crnice sa 16,5 %, ritske crnice različitih podtipova sa 15,5 % i aluvijalna zemljišta (fluvisoli) sa 8,6 %. Područje Fruške Gore i Vršackih planina preovlađuje šumskim gajnjačama, dok su u Subotičkoj i Deliblatskoj peščari zastupljena inicijalna zemljišta na pesku (Nešić i sar., 2010). Pored navedenih tipova najzastupljenijih u Vojvodini, smonica je najzastupljeniji tip zemljišta u Republici Srbiji i zauzima površinu od oko 700 000 ha , najviše u slivu Velike i Zapadne Morave (Dugalić i Gajić, 2012).



Nabrojani tipovi zemljišta se pored zastupljenosti u hektarima, razlikuju i po fizičkim, hemijskim i biološkim osobinama. U Republici Srbiji najzastupljeniji tip zemljišta su kambisoli, sa zastupljenošću od 2.607.000 ha, koji se javljaju kao distrični kambisol i 437.000 ha kao eutrični kambisol-gajnjača. Gajnjače pripadaju drugoj bonitetnoj klasi zemljišta, koju karakterišu povoljne hemijske osobine sa blago kiselom reakcijom zemljišta, različit sadržaj humusa koji je uslovljen načinom korišćenja i erodiranošću zemljišta, a od osnovnih hranjivih supstanci najobezbeđenije su kalijumom, dok sadrže nešto niži sadržaj azota i fosfora. Zatim, najzastupljeniji tip zemljišta u Vojvodini-černozem, na površini od oko 1.000.000 ha, a u ostalim delovima Srbije na oko 200.000 ha, se odlikuje povoljnim fizičkim, hemijskim i biološkim osobinama i pretežno se koristi u biljnoj poljoprivrednoj proizvodnji. Njegove najvažnije karakteristike su optimalan sadržaj karbonata prisutan od površine zemljišta, pH vrednost slabo alkalna, bogatstvo humusom i dovoljne količine biljnih hranjivih supstanci. Ovaj tip zemljišta pripada prvoj bonitetnoj klasi (Hadžić i sar., 2005). Za razliku od černozema smonice, zastupljene na oko 680.000 ha pripadaju trećoj bonitetnoj klasi, poseduju nepovoljne fizičke osobine, ali se odlikuju dobrom obezbeđenošću humusom, azotom i kalijumom, i blago kiselom do neutralnom reakcijom zemljišnog rastvora. Aluvijalno zemljište (fluvisol) i ritske crnice (humogleji) zauzimaju površinu od oko 675.000 ha, a fizičko-hemijske karakteristike fluvisola su uslovljene sastavom matičnog supstrata, pa su prilično neujednačene, a ritska crnica se smatra jednim od najvažnijih poljoprivrednih zemljišta. Ritske crnice karakteriše bogatstvo humusom što ukazuje na povoljnije hemijske osobine u odnosu na fizičke, koje zavise od sastava matičnog supstrata, sadržaja karbonata i mehaničkog sastava. Zemljišta tipa ranker (humusno-silikatna zemljišta) zauzimaju površinu od oko 324.000 ha, najviše su zastupljeni u brdsko-planinskim područjima. Kako su prilično plitka, odlikuju se lošim fizičkim karakteristikama, a hemijske osobine značajno variraju, pa se pH vrednost kreće od oko 4 do 7. Površina rendzina u Srbiji iznosi oko 120.000 ha, i zbog neujednačenih fizičkih i hemijskih osobina najviše se koriste kao šumska i pašnjačka zemljišta, ali i u poljoprivredi za gajenje voća i vinove loze (Nešić i sar., 2010; Dugalić i Gajić, 2012).

Biodiverzitet živog sveta u zemljištu je izuzetno raznovrstan, a u zavisnosti od tipa zemljišta ukupan broj mikroorganizama se kreće od nekoliko stotina hiljada do nekoliko stotina miliona u gramu zemljišta. Gljive kao heterotrofni mikroorganizmi zahvaljujući proizvodnji sekundarnih metabolita (posebno enzima) imaju značajnu ulogu u zemljištu, jer mogu da razgrađuju raznovrsne organske supstrate. Na brojnost i aktivnost gljiva u zemljištu utiču fizičko-hemijska svojstva zemljišta, obrada zemljišta, biljna vrsta i dr.. Veoma su rasprostranjeni u rizosferi ratarskih i povrtarskih kultura (Govedarica i sar., 1996.; Jarak i sar., 1997).

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. Hemikalije i potrošni materijal

Sve hemikalije primenjene u ovom radu bile su p.a. čistoće:

kalijum-hlorid; koncentrovana azotna kiselina (J.T.Baker - Instra); vodonik-peroksid (J.T.Baker); dietilentriamin-pentasilčetne kiseline (DTPA); trietanolamin pufer (TEA); kalcijum-hlorid; hlorovodonična kiselina; agarizovani zemljišni ekstrakt; mesopeptonski agar; bezazotna podloga; sintetičkoj podloga; Czapek-Dox podloga; pepton; kalijum-dihidrogenfosfat, glukoza, magnezijum-sulfat-heptahidrat; dihloran-etanol; Rose Bengal boja; Agar (Liofilchem, Italija); oksitetraciklin; streptomycin; hloramfenikol; krompir-dekstrozna (PDA) podloga (Liofilchem, Italija); Tris (Sigma Aldrich); Bornina kiselina (Sigma Aldrich); etilen-diamin-tetrasilčetna kiselina (EDTA); dNTP (Fermentas); *Taq*DNK polimeraze (Fermentas); 1x*Taq* pufer; magnezijum-hlorid (Fermentas); Agaroza (Serva); 100 bpDNALadder, RTU 50µg/500µL (Nippon Genetics); krompir-dekstrozna tečna podloga (PDB) (Liofilchem, Italija); bakar-sulfat-pentahidrat; nikel-hlorid-heksahidrat; polivinilpirolidin (Sigma-Aldrich, Nemačka); tečni azot (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija).

Filter-papir (Munktell & Filtrak, prečnika 110 mm, 84 g/m<sup>2</sup>)

Komercijalni kitovi:

ZR Soil Microbe DNA MiniPrep Kit (ZymoResearch, USA); Quiagen RNeasy Mini Kit (Quiagen Inc., CA); Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific); API ZYM (BioMerieux, France); Kapa SYBR FAST qPCR Master Mix (KapaBiosystems).

### **3.2. Aparati**

U radu je korišćena sledeća oprema:

Aparat sa membranom pod pritiskom za određivanje sadržaja vode (Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA); Kalcimetar po Scheibleru (Učila), CHNS analizatorom (Vario EL III CHNS Analyzer (Elementar, Nemačka); Spektrofotometar (ThermoScientific, Nemačka); Analitička vaga KERN ABJ 120; ICP-OES sistem-Thermo iCAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific); Mettler Toledo SevenCompact pH/ion; NanoVue spektrofotometar (GE HealthCare LifeSciences, Engleska); UV transiluminator (Vilber Lourmat, Francuska); Bio-Print sistem BIO-CAPT V,97 (Vilber Lourmat, Francuska). Orbitalni šejker (BIOSAN, Litvanija); Theta probe (Delta-T, Cambridge, Engleska); porometar (AP4, Delta-T, Cambridge, Engleska); Termostat (ThermoScientific, Nemačka); Laminarna komora (Biosan, Latvija); Dualex Scientific (Force A, Francuska); Centrifuga (Sigma 2- 16K, Nemačka); Thermomixer comfort (Eppendorf, Nemačka); Elisa čitač (Tecan, Sunrise, Švajcarska); LightScanner PCR sistem (Idaho, USA); MasterCycler gradient PCR (Eppendorf, Nemačka); Aparat za elektroforezu (Blue power 500, Serva); Centrifuga (Eppendorf, Nemačka), Digestor (Proanalytica).

### **3.3. Uzorkovanje zemljišta**

Zemljište je uzorkovano sa 12 različitih lokaliteta: Sremski Karlovci, Titelski breg, Lok, Kačka šuma, Zmajevac, put za Vrdnik, Kisač-selo Karaman, Ljutovo, Rimski šančevi, Čenej, Crepaja i Svilajnac (Tabela 1.). Sondom su vađeni uzorci sa dve dubine, 0-30 cm i 30-60 cm, sem uzorka zemljišta ranker sa Zmajevca, koji je uzet sa dubine 0-20 cm, jer se došlo do matične stene. Zemljišta sa različitih lokaliteta su se razlikovala po tipu, što je i prikazano u Tabeli 1. Uzorci zemljišta iz rizosfere označeni rednim brojevima 20,21,22 i 23 u Tabeli 2., ratarskih i povrtarskih kultura i nekih korova uzorkovani su sa lokaliteta Svilajnac (njiva i bašta), Crepaja i Čenej.

Tabela 1. Lokaliteti sa kojih su uzeti uzorci zemljišta za analizu i tip zemljišta

Red. Broj	Tip zemljišta	Lokalitet	Dubina (cm)	Red. broj	Tip zemljišta	Lokalitet	Dubina (cm)
1	rendzina	Sremski Karlovci	0-30	13	gajnjača	put za vrdnik	30-60
2	rendzina	Sremski Karlovci	30-60	14	černozem na lesnoj terasi	Kisač, salaš Karaman	0-30
3	rendzina	Sremski Karlovci	0-30	15	černozem na lesnoj terasi	Kisač, salaš Karaman	30-60
4	rendzina	Sremski Karlovci	30-60	16	černozem na pesku	selo Ljutovo, Mamužić	0-30
5	sirozem na lesu	titelski breg	0-30	17	černozem na pesku	selo Ljutovo, Mamužić	30-60
6	sirozem na lesu	titelski breg	30-60	18	černozem na lesnoj terasi	Rimski šančevi	0-30
7	ritska crnica	Lok	0-30	19	černozem na lesnoj terasi	Rimski šančevi	30-60
8	ritska crnica	Lok	30-60	20	černozem na lesnoj terasi	Čenej	0-30
9	Fluvisol	Kačka šuma	0-30	21	černozem na lesnoj terasi	Crepaja	0-30
10	Fluvisol	Kačka šuma	30-60	22	smonica	Svilajnac njiva	0-30
11	ranker*	Zmajevac	0-20	23	smonica	Svilajnac bašta	0-30
12	Gajnjača	put za vrdnik	0-30				

\*uzorak zemljišta ranker sa Zmajevca, uzet je samo sa dubine 0-20 cm, jer se došlo do matične stene

Tabela 2. Tip zemljišta, lokalitet, ratarske i povrtarske kulture i neki korovi, iz čije rizosfere su uzeti uzorci zemljišta

R.br	Lokalitet	Tip zemljišta	Biljka	R.br.	Lokalitet	Tip zemljišta	Biljka
20a	Čenej	černozem	Blitva	23b	Svilajnac-bašta	smonica	Grašak
20b	Čenej	černozem	Spanac	23c	Svilajnac-bašta	smonica	Kupus
20c	Čenej	černozem	Jagoda	23d	Svilajnac-bašta	smonica	Šargarepa
20d	Čenej	černozem	Sargarepa	23e	Svilajnac-bašta	smonica	Beli luk
20e	Čenej	černozem	Blitva	23f	Svilajnac-bašta	smonica	Štir
20f	Čenej	černozem	Crni luk	23g	Svilajnac-bašta	smonica	Zova
21a	Crepaja	černozem	Kukuruz	23h	Svilajnac-bašta	smonica	Paradajz
21b	Crepaja	černozem	Soja	23i	Svilajnac-bašta	smonica	Paradajz
21c	Crepaja	černozem	Kukuruz	23j	Svilajnac-bašta	smonica	Beli luk
21d	Crepaja	černozem	Soja	23k	Svilajnac-bašta	smonica	Krompir
21e	Crepaja	černozem	Lan	23l	Svilajnac-bašta	smonica	Celer
21f	Crepaja	černozem	Lan	23lj	Svilajnac-bašta	smonica	Japanski pasulj
23a	Svilajnac-bašta	smonica	Grašak	23m	Svilajnac-bašta	smonica	Paradajz

Uzorkovanje je urađeno sterilnim nožem, a uzorci su stavljeni u sterilne polietilenske kese i transportovani u laboratoriju. Za mikrobiološke analize uzorci su prečišćeni od većih nečistoća i korenja, osušeni na vazduhu i usitnjeni u sterilnom avanu. Nakon usitnjavanja svaki uzorak je podeljen na četiri jednaka dela, od kojih su se dva odstranila, a preostala dva spojila i po 50 g je čuvano u sterilnim kesama na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za fizičko-hemijska ispitivanja, uzorci su nakon vazdušnog sušenja samleveni u mlinu za zemljište, prosejani kroz sito od 0.2 mm i čuvani u kartonskim kutijama na sobnoj temperaturi.

### **3.4. Određivanje mehaničkog sastava zemljišta**

Za određivanje mehaničkog sastava zemljišta koristio se kombinovani postupak, koji obuhvata metodu prosejavanja pomoću sita i metodu taloženja čestica u mirnoj vodi. Ovaj postupak se naziva „pipet-metoda“, postupak pripreme uzorka sa Na-pirofosfatom (internacionalna B metoda) (Bošnjak, 1997). Na osnovu utvđenog %-nog sadržaja ili zastupljenosti pojedinih frakcija određena je vrsta, tj. teksturna klasa zemljišta prema Klasifikaciji na osnovu međunarodne podele čestica prema *Tommerup*-u (Belić i sar., 2014).

### **3.5. Vodne osobine zemljišta**

U svim uzorcima određena je retencija vode na 0.33b i 6.25b - pomoću aparata sa poroznom pločom i retencija vode na 15b - pomoću aparata sa membranom pod pritiskom (Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA) (Bošnjak i sar., 2012).

### **3.6. Hemijske analize zemljišta**

Osnovna hemijska svojstva zemljišta analizirana su sledećim metodama:

1. pH-vrednost zemljišta određena je u suspenziji zemljišta sa vodom(aktivna kiselost) i u suspenziji 1M KCl (supstytuciona kiselost), potenciometrijski, pH metrom (Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, 1996).
2. Sadržaj slobodnog kalcijum-karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) određen je volumetrijski, pomoću Scheiblerov-og kalcimetra (Belić i sar., 2014)
3. Sadržaj humusa određen je metodom Tjurin-a oksidacijom organskih supstanci (Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, 1996).
4. Ukupan sadržaj azota određen je mikroelementalnom analizom po metodi AOAC 972.43:2000, CHNS analizatorom.

5. Određivanje lakopristupačnog fosfora (ekstrakcija sa amonijum-laktatom po Egner i Riehm, 1960) - AL metodom i spektrofotometrijski (Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, 1996).

6. Određivanje lakopristupačnog kalijuma (ekstrakcija sa amonijum-laktatom po Egner i Riehm, 1960) - AL metodom i plamenom fotometrijom (Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta, 1996).

### 3.7. Određivanje sadržaja teških metala

*Priprema uzorka zemljišta za određivanja sadržaja ukupnih teških metala* uključuje njihovu digestiju i prevođenje u rastvor. Uzorci su pripremani po metodi EPA 3051. Odmereno je po 0,4 grama uzorka zemljišta na analitičkoj vagi KERN ABJ 120 sa tačnošću 0,0001 g. Nakon toga odmerena masa uzorka je kvantitativno prenesena u teflonske kivete, dodato je 9 ml  $\text{ccHNO}_3$  i 3 ml rastvora vodonik-peroksida i kivete su zatvorene zaštitnim teflonskim i aluminijumskim rupturnim diskovima i na kraju zavrnete teflonskim zatvaračima. Ceo postupak pripreme uzorka odvijao se u digestoru.

Spaljivanje uzoraka je išlo po sledećem programu:

**1. Korak:**  
Temperatura (°C): 230  
Pritisak (bar): 40  
Vreme (min): 20  
Rampa (min): 1  
Snaga (%): 90

**2. Korak:**  
Temperatura (°C): 230  
Pritisak (bar): 40  
Vreme (min): 20  
Rampa (min): 1  
Snaga (%): 90

**3. Korak:**  
Temperatura (°C): 230  
Pritisak (bar): 40  
Vreme (min): 10  
Rampa (min): 1  
Snaga (%): 90

**4. Korak:**  
Temperatura (°C): 100  
Pritisak (bar): 10  
Vreme (min): 2  
Rampa (min): 1  
Snaga (%): 10

**5. Korak:**  
Temperatura (°C): 100  
Pritisak (bar): 10  
Vreme (min): 2  
Rampa (min): 1  
Snaga (%): 10



Nakon spaljivanja uzorci su centrifugirani i filtrirani u normalne sudove od 25 ml, i dopunjeni ultračistom vodom (provodljivost 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$  na 25°C, tj. otpornost 18,2  $\text{M}\Omega\text{cm}$  na 25°C). Uzorci su pripremani u setovima od po deset uzoraka sa po dve slepe probe (smeša koncentrovane kiseline i oksidacionog sredstva, koja se koristi za digestiju uzoraka, digestirana na isti način kao i uzorci).

*Priprema uzorka zemljišta za određivanje sadržaja pristupačnih teških metala* je urađena ekstrakcijom zemljišta sa 0,005 M rastvorom dietilentriamin-pentasilicetne kiseline (DTPA) u 0,1 M TEA (trietanolamin) puferu i 0,01 M kalcijum-hloridu, pH 7,3, prema metodi opisanoj u radu Lindsey i Norwell, 1978. pH vrednost pripremljenog DTPA rastvora podešavana je pomoću rastvora 1 mol/l HCl. Odmereno je 10 grama uzoraka na analitičkoj vagi KERN ABJ 120 sa tačnošću 0,0001 g. Odmereni uzorak je kvantitativno prenesen u erlenmajer i dodato je 20 ml rastvora DTPA (odnos 1:2, w/v). Erlenmajeri su mućkani na mućkalici u toku 2h na 180 rpm. Zatim su uzorci profiltrirani kroz filter-papir (Munktell & Filtrak, prečnika 110 mm, 84  $\text{g}/\text{m}^2$ ) u plastične sudove.

Uzorci su analizirani po metodi EPA 6010c na aparatu ICP-OES sistem Thermo iCAP 6500 Duo. Sadržaj ispitivanih teških metala (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Mn) određen je nakon očitavanja intenziteta signala na talasnim dužinama za koje dati metal ima najosetljiviji odziv: Kadmijum (Cd) – 228,802 nm; Kobalt (Co) – 228,616 nm; Hrom (Cr) – 267,716 nm; Bakar (Cu) – 327,396 nm; Mangan (Mn) – 257,610 nm; Nikl (Ni) – 231,604 nm; Olovo (Pb) – 220,353 nm; Cink (Zn) – 213,856 nm. Pri određivanju su kao standardi korišćeni Trace Metal Standards I – TMS I.

### **3.8. Mikrobiološke analize**

Korišćene su standardne mikrobiološke metode za detekciju pojedinih grupa i rodova mikroorganizama. Metodom serijskog razblaženja određen je ukupan broj bakterija na agarizovanom zemljišnom ekstraktu, a brojnost amonifikatora određena je na mesopeptonskom agaru (Pochon i Tirdieux, 1962). Na bezazotnoj podlozi određena je zastupljenost diazotrofa (azotofiksatora), oligonitrofila i brojnost *Azotobacter*-a metodom

„fertilnih kapi“ na podlozi Fjodorova (Anderson, 1965). Brojnost aktinomiceta određena je na sintetičkoj podlozi (Krasilnikov, 1965), a zastupljenost gljiva na Czapek-Dox podlozi. Temperatura inkubacije je zavisila od testirane grupe organizama. Podloge su pripremljene po procedurama prikazanim u Prilogu 1.

Aktivnost enzima dehidrogenaze (DHA) određena je spektrofotometrijski, po modifikovanoj metodi Thalmann (1968).

Uzorci su rađeni u tri ponavljanja.

### **3.9. Izolovanje čistih kultura gljiva iz roda *Trichoderma* iz zemljišta**

Čiste kulture gljiva izolovane su standardnim mikološkim metodama na agarizovanoj Rose-Bengal-podlozi sa antibioticima za inhibiciju rasta bakterija (5 g l<sup>-1</sup> pepton, 1 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g l<sup>-1</sup> glukoze, 0.5 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, 0.5 ml l<sup>-1</sup> 0.2% rastvora dihloran-etanola, 0.25 ml l<sup>-1</sup> 5% Rose Bengal boje, 20 g l<sup>-1</sup> agara u koju je nakon hladjenja dodato 0.1 g l<sup>-1</sup> oksitetraciklina, 0.1 g l<sup>-1</sup> streptomycinai 0.1 g l<sup>-1</sup> hloramfenikola) (King i sar., 1979). Gljive su zatim presejane na krompir-dekstroznu (PDA) podlogu, na kojoj su čuvane na +4 °C, uz povremeno presejavanje.

### **3.10. Molekularna identifikacija gljiva roda *Trichoderma***

Ekstrakcija DNK iz gljiva urađena je iz micelija starih 5 dana upotrebom ZR Soil Microbe DNA MiniPrep Kit-a, prema uputstvima proizvođača (Prilog 2). Kvalitet i koncentracija DNK je određena elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (uz prisustvo 0,6 µg/mL etidijum-bromida) poređenjem sa lambda DNK standardom (u opsegu 20 do 100 ng). Horizontalna elektroforeza je rađena pri konstantnom naponu od 4 V/cm dužine gela, u trajanju od 1h, u 1xTBE (0.89 mol/l Tris/ 0.89 mol/l Borne kiseline/ 0.02 mol/l EDTA) puferu. Procenjena koncentracija DNK bila je 40 ng/µL. Takođe, za proveru koncentracije DNK korišćen je i NanoVue spektrofotometar.

Identifikacija izolata izvedena je parcijalnom analizom sekvence ITS regiona nakon amplifikacije u lančanoj reakciji polimeraze (PCR) upotrebom univerzalnih ITS1 i ITS4 prajmera prema radu White i sar. (1990) (Tabela 3). Za izolate koji nisu mogli da se identifikuju nakon umnožavanja fragmenata sa ITS prajmerima, korišćeni su prajmeri koji obuhvataju deo translaciono-elongacionog faktora TEF1- $\alpha$  gena (Tabela 3).

Tabela 3. Sekvence prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju u cilju identifikacije gljiva roda *Trichoderma*

Naziv prajmera	Sekvenca 5' - 3'	Veličina fragmenta
ITS1	TCCTCCGCTTATTGATATGC	600 bp
ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600 bp
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	1,4 kbp
TEF1-LLErev	AACTTGCAGGCAATGTGG	1,4 kbp

PCR amplifikacija za ITS se odvijala u sledećim uslovima: ~100 ng DNK, 0,2mM dNTP, 2,5 U *Taq*DNK polimeraze (Fermentas), 1x*Taq*puffer, 0,5  $\mu$ M prajmera i 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. U uređaju za PCR se koristio sledeći program: **1 ciklus**: inicijalna denaturacija DNKu trajanju od 5minuta na 94 °C; **30ciklusa**: denaturacija na 94 °C u trajanju od 1 minut, hibridizacija na 48 °C u trajanju od 1 minut, ekstenzija na 72 °C u trajanju od 1 minut; finalna ekstenzija na 72 °C u trajanju od 10 minuta. Ukupna zapremina smeše bila je 50  $\mu$ L. Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu, u prisustvu etidijum-bromida (0,6  $\mu$ g/mL).

PCR za TEF1 se odvijala u sledećim uslovima: ~100 ng DNK, 0,16mM dNTP, 0,025 U *Taq*DNK polimeraze, 1x*Taq*puffer, 0,25  $\mu$ M prajmera i 2mM MgCl<sub>2</sub>. U uređaju za PCR se koristio sledeći program: **1 ciklus**: inicijalna denaturacija DNKu trajanju od 5minuta na 94 °C; **30ciklusa**: denaturacija na 94 °C u trajanju od 1 minut, hibridizacija na 59 °C u trajanju od 1 minut, ekstenzija na 72 °C u trajanju od 1 minut; finalna ekstenzija na 72 °C u trajanju

od 10 minuta. Ukupna zapremina smeše bila je 50  $\mu$ L. Fragmenti DNK razdvajani su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu, u prisustvu etidijum-bromida (0,6  $\mu$ g/mL).

Razdvojeni proizvodi PCR reakcije su posmatrani na UV transiluminatoru, a dobijeni rezultati snimljeni i memorisani pomoću Bio-Print sistema. Dužina i masa umnoženih fragmenata je ocenjivana na osnovu migracije standarda 100 bp DNALadder, RTU 50 $\mu$ g/500 $\mu$ L.

### **3.11. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom**

DNK sekvencioniranje amplifikovanih fragmenata je urađeno u LGC Genomics laboratoriji, Nemačka. Izolovani izolati su identifikovani na osnovu ITS sekvenci u barkod programu *TrichOKEY* 2.0, koji je dostupan na web stranici International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy ([www.isth.info](http://www.isth.info)) (Druzhinina i sar., 2005). U slučaju gde *TrichOkey* 2.0 program nije identifikovao dobijene sekvence, primenjen je BLASTN algoritam, dostupan u NCBI bazi podataka ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (NCBI-National Center for Biotechnology Information) (Zhang i sar., 2000). Tako dobijeni rezultati provereni su i u *TrichOkey* 2.0 barkod programu. Izolati koji nisu dali precizan rezultat na osnovu ITS su dodatno analizirani prema sekvenci za deo translacionog elongacionog faktora TEF1- $\alpha$  gena. Sekvence svih izolovanih izolata su dostupne u NCBI banci gena, a pristupni brojevi su prikazani u Tabeli 51. Takođe, sve sekvence prikazane su u Prilogu 3.

### **3.12. Enzimska karakterizacija izolata**

#### **3.12.1. Priprema izolata**

Izolati su inkubirani na PDA podlozi i nakon 5 dana sa ivice kolonija je isečeno 5 diskova promera oko 5 mm i preneseno u erlenmajere sa po 200 ml sterilne krompir-dekstrozne

tečne podloge (PDB). Dalja inkubacija se odvijala u orbitalnom šejkeru na 160 rpm, 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.

Enzimska karakterizacija 16 odabranih izolata urađena je API ZYM testom (BioMerieux, France) prema uputstvu proizvođača. API ZYM je brza tehnika koja omogućava semi-kvantitativno određivanje enzimske aktivnosti, zasnovana na 19 reakcija u malim zapreminama uzorka. Sistem sadrži traku sa 20 bunarčića u čijoj osnovi se nalazi enzimski supstrat i njegov pufer. Ova osnova omogućava kontakt enzima i supstrata. Uzorak koji se u bunarčiće nanosi u tečnom stanju ujedno vrši rehidrataciju supstrata. Nakon inkubacionog perioda proizvodi reakcija se detektuju preko obojenja koje nastaje nakon dodatka reagensa.

### **3.12.2. Test za enzimsku karakterizaciju izolata**

Enzimska karakterizacija izolata je izvršena tako što je prvo naneto po 65 µl filtrata u bunare. U udubljenja zaštitne plastične kutije je uneto oko 5 ml destilovane vode radi održavanja vlage, a zatim su ubačene trake sa bunarima i inkubirane 4h na 37 °C. Nakon inkubacije u svaku reakcionu tubu je dodata po jedna kap reagenasa ZYM A i ZYM B, a posle pet minuta je vizuelno ocenjena promena boje i poređena sa APY ZYM Colour Chart-om. Prvi bunarčić predstavlja kontrolu, sa čijom bojom se poredi boja reakcionih bunara. Na osnovu intenziteta obojenja ocenjeno je prisustvo enzima: 0-bez prisustva; 1-slab intenzitet, 2-srednji intenzitet, 3-jak intenzitet.

### **3.13. *In vitro* ispitivanja rasta gljiva na podlogama sa teškim metalima**

Rast odabranih izolata gljiva je testiran na PDA u koji je dodat  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kao izvor bakra, a primenjene su koncentracije: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 i 10 mmol Cu/l. Za koncentracije od 4 i 10 mmolCu/l, pH vrednost je podešena dodavanjem 1 M rastvora NaOH pre autoklaviranja. Kao kontrola koristio se PDA bez dodatog Cu(II).

Kao izvor nikla dodat je  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  nakon autoklaviranja podloge, a primenjene su koncentracije 0,5, 1, 2 i 4 mmol Ni/l. Kao kontrola koristio se PDA bez dodatka Ni(II).

Izolati gljiva su preinkubirani na PDA podlozi na 25°C tokom 5 dana. Diskovi micelija dijametra 5 mm su sečeni ezom i postavljeni u centar kontrolnih petri ploča, kao i u centar ploča u kojim su bile različite koncentracije Cu(II) i Ni(II). Za svaku petri ploču rađena su tri ponavljanja. Petri ploče su čuvane na tamnom mestu, na 25 °C tokom 48h u slučaju bakra, dok se u slučaju nikla rast pratio i nakon 96h i nakon 144h. Dijametar kolonija je meren i procenat inhibicije je računat na osnovu formule (Edington i sar., 1971):

$$PI = \frac{(C - T)}{T} \times 100$$

PI – procenat inhibicije

C- dijametar kolonije (mm) na PDA podlozi

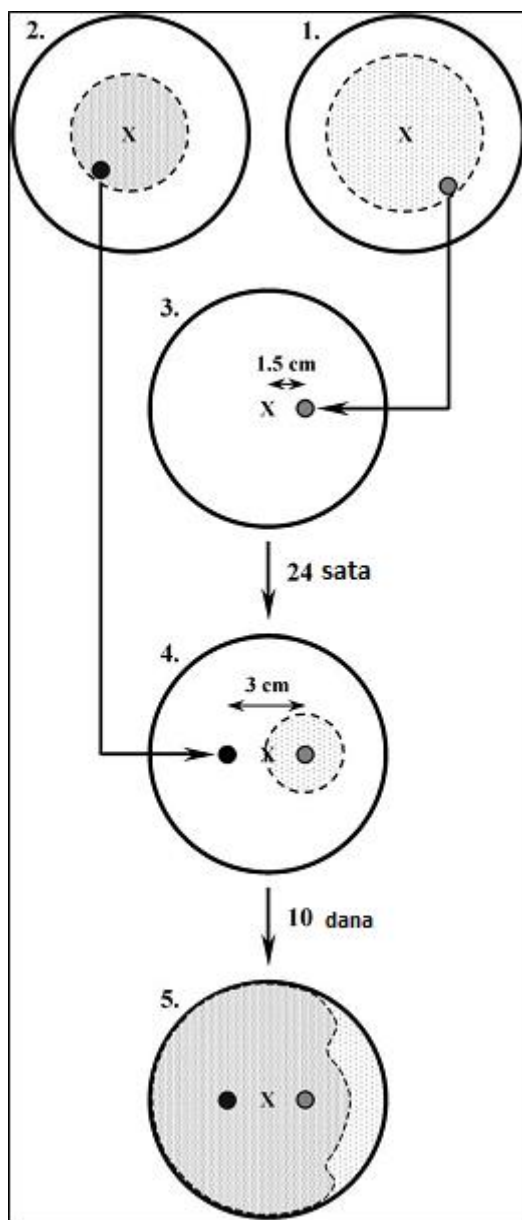
T – dijametar kolonije (mm) na PDA podlozi sa jonom metala

### **3.14. Proučavanje *in vitro* antagonizma odabranih izolata gljiva roda *Trichoderma***

*In vitro* antagonističke sposobnosti izolata roda *Trichoderma* prema fitopatogenim gljivama su ispitane na PDA) na 25 °C. Diskovi veličine 5 mm u prečniku su isecani iz agara na kome su se razvile kolonije fitopatogena stare 3 dana i inokulisane su na površinu PDA podloge u petri posude prečnika 9 cm. Nakon 24 h diskovi micelija 2 dana starih kolonija *Trichoderma* su inokulisane na isti način, ali 3 cm udaljene od inokuilisanog fitopatogena. Inokulacija izolata *Trichoderma* je izvedena na veoma precizan način kako bi se obezbedio potreban proces za rast obe gljive (Shema 1).

Petri šolje su fotografisane Kodak DX 3900 digitalnom kamerom na 18 cm udaljenosti od petri šolje 10 dana nakon inokulacije *Trichoderma*. Originalne slike su smanjene na veličinu 800 x 600 piksela, a DPI vrednost podešena na 300 koristeći Irfan View v3.95 softver i analizirane su upotrebom Scion Image v4.02 softvera (besplatno dostupan na sajtu Scion Corporation) koristeći opciju “slobodne ruke” (free hand tool). Tokom analiza skala je postavljena na 28,346 piksela/cm, a izračunata vrednost površine je bila u  $\text{cm}^2$ . Za izračunavanje vrednosti indeksa biokontrole (BCI) merena je površina petri šolje

prekrivena *Trichoderma* i patogenom ( $Sp/cm^2$ ) kao i površina patogena ( $Sp/cm^2$ ). Izračunata je srednja vrednost i standardna devijacija svih rezultata, a BCI indeks je računat putem formule:  $100 ((Sp/Stp)*100)$ . Vrednosti indeksa biokontrola (BCI) su računane na osnovu formule:  $BCI = (\text{prostor zauzet kolonijama } Trichoderma / \text{ukupna površina zauzeta kolonijama } Trichoderma \text{ i fitopatogena}) \times 100$  (Szekeres i sar. 2006).

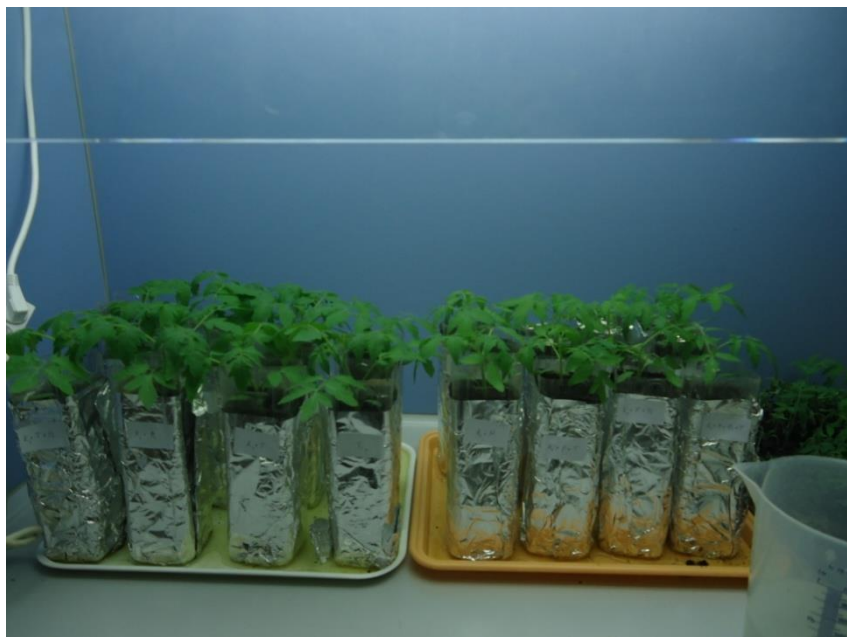


Shema 1. Šematski prikaz proučavanja *in vitro* antagonizma gljiva iz roda *Trichoderma* (Szekeres i sar. 2006)

### 3.15. Ispitivanje efekta odabranog izolata *Trichoderma* na tolerantnost biljaka prema suši

Promene u odgovoru biljaka paradajza na sušu ispitivane su u prisustvu izolata *T. brevicompactum* SZMC 22661, koji je pokazao najbolje rezultate u *in vitro* ispitivanjima rasta gljiva u prisustvu abiotskog stresa izazvanog teškim metalima.

Biljke paradajza gajene su u kontrolisanim uslovima (intenzitet svetlosti:  $250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fotoperiod 14h, temperatura dan/noć: 26/17°C, relativna vlažnost: 60%). Eksperiment je započet sa biljkama paradajza koje su imale šest potpuno razvijenih listova i trajao je dok se deseti list nije pojavio. Biljke su presađene u mešavinu zemlje, komposta i peska u zapreminskom odnosu 1:1:1, u providnim saksijama od pleksiglasa dubine 24 cm, zaštićene aluminijumskom folijom. Providne saksije su korišćene kako bi se pratio rast korena biljke pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *Trichoderma* (K+T), suša (S), suša sa prisustvom izolata *Trichoderma* (S+T). Sve biljke su zalivane sa 75 % od maksimalnog vodnog kapaciteta (Slika 4). Sedam dana nakon presađivanja biljke u tretmanu S i S+T nisu više zalivane.



Slika 4. Izgled biljaka tokom eksperimenta



Sedam dana nakon presađivanja biljaka u saksije sa tretmanom K+T i S+T dodato je po 5 ml suspenzije gljive. Kada su biljke razvile 9-10 listova, biljke u tretmanu S i S+T su prestale da se zalivaju.

Suspenzija gljiva je pripremljena tako što su pet dana stare kolonije *Trichoderma* ezom skinute sa podloga jedne petri ploče i rastvorene u 100 ml vode. Epruvete sa suspenzijom spora gljiva postavljene su u šejker i mučkane su 2 h brzinom od 50 rpm.

Broj spora izbrojan je prema proceduri brojanja mikroorganizama u komori za brojanje ćelija (Nojbauerova pločica) i preračunat korišćenjem formule:

$$X = M \times n \times 4000 \times q^{-1} \times 1000$$

Gde je: X –ukupan broj spora u 1 ml

M - ukupan broj spora u jednoj komori

n - razređenje

q - broj malih kvadratića (400 ili 80)

4000 – faktor zapremine male komorice.

Broj kolonija za izolat *Trichoderma* bio je  $1,75 \times 10^6$  u jednom ml suspenzije.

Sadržaj vode u zemljištu (SWC) meren je upotrebom *Theta* probe (*Delta-T, Cambridge, U.K*) na dubini od 6 cm. Stomatalna provodljivost (Gs) merena je na listovima porometrom (*AP4, Delta-T, Cambridge, U.K*). Relativni sadržaj vode u listovima(RWC) određen je merenjem sveže mase 10 lisnih isečaka površine 1 cm<sup>2</sup>. Lisni isečci su držani u mraku potpuno zasićeni vodom 4h. Nakon toga je određivana turgidna masa isečka (Tw). Zatim su isečci sušeni 24h u termostatu na temperaturi od 80°C. Posle sušenja izmerena je masa isečaka Dw. RWC je računat iz odnosa:

$RWC = [(F_w - D_w) / (T_w - D_w)] \times 100$ , gde su F<sub>w</sub> sveža, D<sub>w</sub> suva, a T<sub>w</sub> turgidna masa 10 lisnih diskova (2r = 1 cm).

Sadržaj hlorofila (Chl) i epidermalnih flavonola u listovima meren je *in vivo* Dualox Scientific senzorom (Cerović i sar., 2012). Procena sadržaja hlorofila zasnovana je na razlici transmisije na dve talasne dužine VIS (650 nm) i NIR (710 nm). Epidermalni sadržaj flavonola je određen poređenjem vrednosti apsorbcija na 375 nm (UV-A) i 650 nm. Obe talasne dužine ekscituju fluoroscenciju Chl, ali samo na UV-A se može odrediti sadržaj

flavonola. Razlika fluorescencije Chl merena na 710 nm je direktno proporcionalna količini epidermalnih flavonola. NBI (nitrogen balance index) se računao iz odnosa Chl/Flav.

Svi parametri mereni su 7 dana nakon izlaganja biljaka suši.

Sedam dana nakon izlaganja biljaka suši uzorci listova i korena su zamrznuti u tečnom azotu. Uzorci su isitnjeni u avanu uz dodatak tečnog azota i odvojeno je po 100 mg zamrznutog materijala od svakog uzorka, za određivanje sadržaja abscisinske kiseline (ABA) i za praćenje ekspresije gena, i čuvani su u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$  do merenja.

### **3.16. Određivanje sadržaja abscisinske kiseline u listu i korenu biljaka**

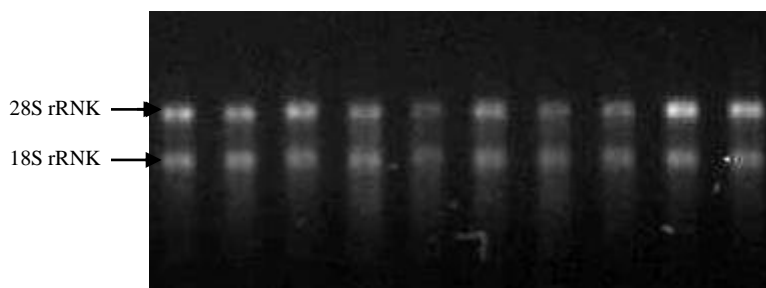
Ekstrakcija ABA je urađena iz biljnog materijala koji je usitnjen u avanu uz prisustvo tečnog azota. Odmereno je 100 mg biljnog tkiva i pomešano sa 1 ml destilovane vode i 2% PVP40. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 5 minuta, na  $4^{\circ}\text{C}$  pri brzini od 14000 obr./min (Sigma 2- 16K, Germany), a dobijeni supernatant je korišćen za dalju analizu. Nespecifična reakcija antitela za abscisinsku kiselinu, sa drugim jedinjenjima, je izbegnuta kratkim prokuvavanjem biljnog tkiva u vodi, nakon čega je nastavljena reakcija mućkanjem uzoraka 16h u mraku, na  $4^{\circ}\text{C}$  (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Određivanja sadržaja ABA u biljnim organima urađena su ELISA testom upotrebom MAC 252 monoklonskog antitela za ABA (Quarrie i sar., 1988) prema Asch (2000). Posle imunološke reakcije, vrši se bojenje dodatkom supstrata (p-nitrofenil fosfata), pri čemu se apsorbancija rastvora očitava na ELISA čitaču na 405 nm. Ova očitana vrednost obrnuto je proporcionalna koncentraciji ABA, koja se izračunava preko standardne (kalibracione) krive dobijene merenjem serije standardnih rastvora poznatih koncentracija ( $\pm$ ) ABA.

### 3.17. Ekspresija gena paradajza kao odgovor na sušu i dodatak suspenzije gljive

Iz zamrznutih uzoraka listova i korena izolovana je RNK uz pomoć Quiagen RNeasy Mini Kit-a, prema uputstvu proizvođača.

U cilju ocene efekta dodatka gljive iz roda *Trichoderma* kao biotskog i suše kao abiotskog stresa na biljke paradajza merena je ekspresija odabranih gena (Tabela 4) metodom kvantitativnog PCR umnožavanja. Iz zamrznutih uzoraka izolovana je RNK uz pomoć Quiagen RNeasy Mini Kit-a, prema uputstvu proizvođača. Kontaminacija sa gDNK je uklonjena dodatkom DNA-aze nakon čega je kvalitet izolovane RNK proveren je elektroforezom na 1% agaroznom gelu, a koncentracija RNK je određena uz pomoć NanoVuePlus spektrofotometra (Slika 5). cDNK je sintetisana iz 1µg ukupne RNA pomoću Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit prema uputstvu proizvođača. PCR amplifikacija izvedena je sa specifičnim prajmerima (Tabela 4). Reakcije su izvedene u LightScanner PCR sistemu sa Kapa SYBR FAST qPCR Master Mix.



Slika 5. Elektroforeza odabranih uzoraka RNK koja je ekstrahovana iz uzoraka biljaka paradajza na 1 % agaroznom gelu.

PCR amplifikacija urađena je u tri ponavljanja, zapremina reakcione smeše bila je 20µl u sledećim uslovima: 1 min na 94°C; 30 ciklusa od 15 s na 94°C, 30 s na 55°C (Osmotin like I) ili na 61°C (Aktin, PR1bI, PR-P2, PinII, TomLoxA, NCED1), i 1 min 45 s at 72°C; 10-min finalnaekstenzija na 72°C. Početna cDNK je razblažena u odnosu 1:5 za sve izvedene

reakcije. Dobijene Ct vrednosti (Ct – cycle treshold, ciklus na kome intenzitet fluorescencije prelazi zadati prag) iskorišćene su za izračunavanje relativne ekspresije gena, uporednom delta delta Ct metodom, koristeći kao endogenu kontrolu (referentni gen) gen za aktin:

$$\text{Relativna ekspresija gena} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Gde je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{uzorak u tretmanu}) - \Delta Ct (\text{kontrolni uzorak})$$

$$\Delta Ct (\text{uzorak u tretmanu}) = \Delta Ct(\text{target gen u uzorku u tretmanu}) - \Delta Ct(\text{referenti gen u uzorku u tretmanu})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrolni uzorak}) = \Delta Ct(\text{target gen kontrolnog uzorka}) - \Delta Ct(\text{referenti gen kontrolnog uzorka})$$

Tabela 4. Sekvence gena korišćenih u qPCR amplifikaciji

GEN	Funkcionalna kategorija	FORWARD PRIMER (5-3)*	REVERSE PRIMER(5-3)*
PR1b1	Signalni put salicilne kiseline	GCACTAAACCTAAAGAAAAATGGG	AAGTTGGCATCCCAAGACATA
PR-P2	Signalni put salicilne kiseline	GGAACAGGAACACAAGAAACAGTGA	CCCAATCCATTAGTGTCCAATCG
PinII	Signalni put jasmonske kiseline	GGCCAAATGCTTGACCTTT	CGTGGTACATCCGGTGGGATA
TomLoxA	Sinteza jasmonske kiseline	TGAACCATGGTGGGCTGAAA	CTGCCCCGAAATTGACTGCTG
Osmotin-like1	<i>Stres protein</i>	TTGGTGCCAGACCG	AGTACTTGTTGGATCGTC
NCED1	<i>sinteza abscisinske kiseline</i>	CTTATTTGGCTATCGCTGAACC	CCTCCAACCTTCAAACCTCATTGC
Act	Endogena kontrola	GTCCTCTTCCAGCCATCCAT	ACCACTGAGCACAATGTTACCG

\*F – engl. forward, nizvodni prajmer, R – engl. reverse, uzvodni prajmer

### 3.18. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata je urađena u programima MS Office 2007 Excel i IBM SPSS 22.0 za Windows (IBM Corp., Armonk, USA). Za poređenje razlika po grupama kod varijabli parametrijske raspodele korišćena je jednosmerna analiza varijanse ANOVA sa Duncan-ovim post hoc testom sa značajnošću razlike ispitivanih varijabli sa verovatnoćom  $p < 0.05$ , dok je kod neparametrijskih varijabli korišćena LOESS (analiza lokalne regresije-robust locally weighted sequential smoothing of the curves) analiza.

Duncan-ov test je statistički test višestrukog poređenja koji je modifikacija Student-Newman-Keuls testa sa većom moći diskriminacije odnosno pruža veću zaštitu od lažno negativnih grešaka, ali sa povećanim rizikom od lažno pozitivnih rezultata u smislu utvrđivanja statističke značajnosti.

Analiza lokalne regresije (LOESS) primenjena za ispitivanje veze između određenih parametara zemljišta, koji su uključili edafske faktore i sadržaj metala, i broj izolovanih vrsta gljiva roda *Trichoderma* spp. (Cleveland, 1979). LOESS predstavlja neparametrijsku jednostavnu analizu koja se koristi za prevođenje grafičkih kriva u empirijske podatke (to fit the smooth curves to empirical data). Smatra se korisnom tehnikom jer ne zahteva specifičnu vezu između zavisne i nezavisne varijable, što je veoma važno kada postoje ekstremne vrednosti u okviru merenih parametara. Najčešće se koristi kao scatterplot smoother, ali se primenjuje i na multivarijantne podatke (Jacoby, 2000).

Veza između svake ispitane varijable i broja izolovanih izolata ispitana je kao individualni model. The goodness-of fit individualnih modela je merena predviđanjem Pearson-ovog linearnog koeficijenta korelacije između zavisne varijable i fitovanih vrednosti individualnih modela. Veza između parova varijabli nije predstavljena u obliku jednačine, već je vrednost korelacionog koeficijenta predstavljena kao  $R^2$  i ona ukazuje na kvalitet neparametrijskog regresionog modela.

## 4. REZULTATI

Ispitivanja varijabilnosti gljiva iz roda *Trichoderma* rađena su iz različitih tipova zemljišta: rendzina, sirozem na lesu, ritska crnica, fluvisol, ranker, gajnjača, černozem sa različitim podtipovima. Takođe, uzorci su uzeti i iz rizosfere različitih ratarskih, povrtarskih kultura i nekih korova sa četiri lokaliteta: Svilajnac-tip zemljišta smonica, Čenej-tip zemljišta černozem i Crepaja-tip zemljišta černozem (Slika 6).



Slika 6. Lokaliteti sa kojih je uzorkovano zemljište

(1 - Sremski Karlovci 1 (0-30 i 30-60cm dubine); 2 - Sremski Karlovci2 (0-30 i 30-60cm); 3 - Titelski breg (0-30 i 30-60cm); 4-Lok (0-30 i 30-60cm); 5- Kačka šuma (0-30 i 30-60cm); 6 - Zmajevac (0-20cm); 7 - put za Vrdnik (0-30 i 30-60cm); 8 - Kisač (0-30 i 30-60cm); 9 - Ljutovo(0-30 i 30-60cm);10 - Rimski Šančevi (0-30 i 30-60cm); 11 - Čenej (0-30 i 30-60cm); 12 - Crepaja (0-30 i 30-60cm); 13 - Svilajnac1 (0-30 i 30-60cm); 14 - Svilajnac2 (0-30 i 30-60cm))

#### 4.1. Fizičko-hemijske karakteristike uzoraka zemljišta

##### UZORCI ZEMLJIŠTA 1 i 2

Lokalitet: Sremski Karlovci  
 Koordinate profila: N 45.186783; E 19.9304  
 Tip zemljišta: rendzina  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom  
 Vegetacija: vinograd

Tabela 5. Mehanički sastav uzorka zemljišta 1 i 2

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna Klasa prema Tommerupu
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Ukupna glina + prah, <0.02 mm	
rendzina	A	0-30	4.3	38.6	36.9	20.2	42.9	57.1	Glinovita ilovača
rendzina	A	30-60	4.1	36.3	39.2	20.4	40.4	59.6	Glinovita ilovača

Tabela 6. Retencija vode uzorcima zemljišta 1 i 2

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
rendzina	A	0-30	24.6	12.3	11.2
rendzina	A	30-60	25.3	12.7	11.2

Tabela 7. Hemijske osobine u uzorcima zemljišta 1 i 2

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
rendzina	A	0-30	17.61	8.2	7.6	1.74	0.15	32.7	24.1
rendzina	A	30-60	10.12	8.2	7.6	1.84	0.16	25.8	19.1

Na osnovu mehaničkog ispitivanja uzoraka uzetih sa dve dubine (0-30 i 30-60 cm) sa lokaliteta Sremski Karlovci, tip zemljišta rendzina prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u zauzima teksturnu klasu glinovita ilovača (Tabela 5). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u jako karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednosti sadržaja karbonata na dubini od 0-30 cm iznosila je 17.61 %, dok na dubini od 30-60 cm vrednost je iznosila 10.12 %. Kiselost zemljišta određena u H<sub>2</sub>O imala je istu vrednost na obe dubine i iznosila je 8.2, što ovaj tip zemljišta svrstava u umereno alkalna zemljišta (Belić i sar., 2014). Supstituciona kiselost (pH u KCl) na obe ispitane dubine iznosila oko 7.6. Prema sadržaju humusa ovaj tip zemljišta spada u slabo humusna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednosti su se kretale od 1.74 % do 1.84 % na dubinama od 0-30 cm do 30-60 cm, respektivno. Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je 0.15 % dok je neznatno veći sadržaj od 0.16 % određen na dubini od 30-60 cm, što ovo zemljište svrstava u klasu zemljišta srednje obezbeđenih azotom (Manojlović i sar., 1995). Prema nivou sadržaja fosfora P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg/100 g uzorci 1 i 2 mogu se svrstati u zemljišta sa visokim sadržajem fosfora (32.7 mg/100g na dubini od 0-30 cm, a 25.8 mg/100 g na dubini od 30-60 cm) (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj kalijuma u ovim uzorcima ukazao je na optimalnu obezbeđenost ovim elementom i na dubini od 0-30 cm izosio je 24.1mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 19.1 mg/100 g (Tabela 7). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti i kretao se od oko 11 % vol na 15b do oko 25 % vol na 0.33b (Tabela 6), što je u skladu sa teksturnom klasom glinovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).



## UZORCI ZEMLJIŠTA 3 i 4

Lokalitet: Sremski Karlovci  
 Koordinate profila: N 45.18795; E 19.930033  
 Tip zemljišta: rendzina  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom  
 Vegetacija: vinova loza, eko-tabla

Tabela 8. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 3 i 4

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna klasa prema Tommerupu
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Ukupna glina + prah, <0.02 mm	
Rendzina	A	0-30	2.1	40.7	35.7	21.5	42.7	57.2	Glinovita ilovača
Rendzina	A	30-60	2.3	42.9	31.8	23.1	45.2	54.8	Glinovita ilovača

Tabela 9. Retencija vode uzoraka zemljišta 3 i 4

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
rendzina	A	0-30	23.4	12.5	11.3
rendzina	A	30-60	23.2	12.6	11.7

Tabela 10. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 3 i 4

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
rendzina	A	0-30	0	10.9	7.9	7.31	1.49	0.128	43.8
rendzina	A	30-60	0	11.3	8.1	7.43	1.48	0.127	41.2

Na osnovu mehaničkog ispitivanja uzoraka uzetih sa dve dubine (0-30 i 30-60 cm) sa lokaliteta Sremski Karlovci sa eko-tabli vinograda oglednog dobra Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, tip zemljišta rendzina prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u zauzima teksturnu klasu glinovita ilovača (Tabela 8). Ovaj tip zemljišta spada u beskarbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), dakle sa vrednostima karbonata na obe dubine od 0 %. Reakcija zemljišnog rastvora jeveoma alkalna sa vrednostima pH u H<sub>2</sub>O od 10.9 (0-30 cm) i 11.3 (30-60 cm) (Belić i sar., 2014). Izmerene su vrednosti pH u KCl na dubini od 0-30 cm od 7.9, a na dubini od 30-60 cm vrednost je iznosila 8.1. Sadržaj humusa izmeren na obe dubine od oko 7,3 % svrstava ovaj uzorak u jako humusna zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota na obe dubine iznosio je oko 1.49 %, što ovo zemljište svrstava u srednje obezbeđeno azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iznosio je 0.128 mg/100g na obe dubine, pa se ovi uzorci svrstavaju u zemljišta sa vrlo niskim sadržajem fosfora (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm iznosio je 43.8 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila slična i iznosila je 41.2 mg/100 g (Tabela 10), što ova zemljišta karakteriše kao vrlo visoko obezbeđena kalijumom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti, i kretao se od oko 11 % vol na 15b do oko 23 % vol na 0,33b (Tabela 9), što je u skladu sa teksturnom klasom glinovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).

## UZORCI 5 i 6

Lokalitet: titelski breg

Koordinate profila: N 45.263197; E 20.173675

Tip zemljišta: sirozem na lesu

Red: automorfna zemljišta

Klasa: slabo razvijena zemljišta sa (A)-C ili Ai-C profilom

Vegetacija: pšenica

Tabela 11. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 5 i 6

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002m	Glina <0.002m	Ukupan pesak, >0.02m	Ukupna glina + prah, <0.02m	
sirozem na lesu	A	0-30	0.7	39.7	35.5	24.0	40.4	59.5	Glinovita ilovača
sirozem na lesu	A	30-60	0.5	38.5	34.6	26.3	39.1	60.9	Ilovasta glina

Tabela 12. Retencija vode uzoraka 5 i 6

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
sirozem na lesu	A	0-30	26.0	15.5	13.6
sirozem na lesu	A	30-60	26.6	15.8	13.4

Tabela 13. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 5 i 6

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
sirozem na lesu	A	0-30	7.96	8.1	7.5	3.26	0.22	42.5	35.5
sirozem na lesu	A	30-60	9.22	8.2	7.3	3.21	0.22	39.6	28.2

Na osnovu mehaničkog ispitivanja uzorka uzetog sa dubine 0-30 cm prema Tommerup-u pripada klasi glinovita ilovača, dok uzorak sa dubine 30-60 cm prema istoj klasifikaciji uzorak zauzima teksturnu klasu ilovasta glina (Tabela 11). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednosti sadržaja karbonata na dubini od 0-30 cm iznosila je 7.96 %, dok na dubini od 30-60 cm vrednost je iznosila 9.22 %. Reakcija ovog uzorka zemljišta je slabo-alkalna – pH vrednost u KCl na dubini od 0-30 cm je 7.5, a na dubini od 30-60 cm kiselost je bila 7.3, dok je pH u H<sub>2</sub>O iznosila je 8.1 a na dubini 30-60 cm 8.2, čime se ovi uzorci opisuju kao umereno alkalni (Belić i sar., 2014). Prema sadržaju humusa od oko 3.2 % na obe dubine, zemljište je srednje humosno (Belić i sar., 2014). Na osnovu sadržaja azota ovi uzorci su dobro obezbeđeni azotom, na obe ispitane dubine iznosio je oko 0.22 % (Manojlović i sar., 1995). Na osnovu sadržaja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mg/100g, uzorci zemljišta karakterišu se kao visoko obezbeđena (vrednosti su iznosile 42.5mg/100g na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila nešto manja 39.6 mg/100 g) (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm izosio je 35.5 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 28.2 mg/100 g (Tabela 13), što ovo zemljište karakteriše kao visoko obezbeđeno ovim elementom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti i kretao se od oko 13.5 % vol na 15b do oko 26 % vol na 0.33b (Tabela 12), što je u skladu sa teksturnom klasom ilovasta glina (Pekeč i sar., 2013).

## UZORCI 7 i 8

Lokalitet: Lok

Koordinate profila: N 45.210458; E 20.199186

Tip zemljišta: ritska crnica

Red: hidromorfna zemljišta

Klasa: humusno-akumulativna zemljišta sa A-C profilom

Vegetacija: semenski kukuruz

Tabela 14. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 7 i 8

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002m	Glina <0.002m	Ukupan pesak, >0.02m	Ukupna glina + prah, <0.02m	
ritska crnica	A	0-30	1.3	48.3	21.9	28.4	49.6	50.3	Ilovasta glina
ritska crnica	A	30-60	1.1	48.3	21.8	28.8	49.4	50.6	Ilovasta glina

Tabela 15. Retencija vode uzoraka 7 i 8

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
ritska crnica	A	0-30	25.0	16.3	14.3
ritska crnica	A	30-60	26.4	17.1	15.1

Tabela 16. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 7 i 8

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
ritska crnica	A	0-30	3.35	8.0	7.35	4.05	0.26	69.4	16.4

Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazuju da prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u uzorak sa lokaliteta Lok zauzima teksturnu klasu ilovasta glina (Tabela 14). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u srednje karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednosti sadržaja karbonata na dubini od 0-30 cm iznosila je 3.35 %, dok na dubini od 30-60 cm vrednost je iznosila 2.43 %. Vrednosti pH u KCl bile su 7.35 (0-30 cm) i 7.3 (30-60 cm). Na dubini 0-30 cm pH u H<sub>2</sub>O bila je 8.0, a na dubini 30-60 cm 7.9, što ga opisuje kao umereno alkalno zemljište (Belić i sar., 2014). Sadržaj humusa određen na dubini od 0-30 cm bio je 4.05 % , a na dubini od 30-60 cm bio je 4.65 %, pa se ovaj tip zemljišta klasifikuje u jako humusna zemljišta (Belić i sar., 2015). Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je 0.26 % dok je na dubini od 30-60 cm izmeren sadržaj od 0.29 %, čime se ovi uzorci zemljišta opisuju kao dobro obezbeđena azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iznosio je 69.4mg/100g na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 60.9 mg/100 g. Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm iznosio je 16.4 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 14.1 mg/100 g (Tabela 16). Na osnovu ocene nivoa sadržaja P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i K<sub>2</sub>O, ovi uzorci su vrlo visoko obezbeđeni fosforom, a optimalno obezbeđeni kalijumom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti kretao se od oko 15 % vol na 15b do oko 25.5 % vol na 0.33b (Tabela 15), što je u skladu sa teksturnom klasom ilovasta glina (Pekeč i sar., 2013).

## UZORCI 9 i 10

Lokalitet: Kačka šuma  
 Koordinate profila: N 45.292583; E 19.893889  
 Tip zemljišta: Fluvisol  
 Red: hidromorfna zemljišta  
 Klasa: nerazvijena hidromorfna zemljišta  
 Vegetacija: topola

Tabela 17. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 9 i 10

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav %						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002m	Glina <0.002m	Ukupan pesak, >0.02m	Ukupna glina + prah, <0.02m	
fluvisol	A	0-30	0.9	79.2	12.5	8.3	80.1	19.9	Sitno peskovita ilovača
fluvisol	A	30-60	1.4	83.6	9.2	5.8	85.0	15.0	Sitno peskovita ilovača

Tabela 18. Retencija vode uzoraka 9 i 10

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
fluvisol	A	0-30	17.4	6.1	5.5
fluvisol	A	30-60	22.9	5.0	4.8

Tabela 19. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 9 i 10

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
fluvisol	A	0-30	19.7	8.3	7.7	1.41	0.12	5.8	7.3
fluvisol	A	30-60	20.54	8.5	7.9	1.52	0.13	1.9	5.5

Na osnovu granulometrijskog sastava uzorak zemljišta sa lokaliteta Kačka šuma prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u zauzima teksturnu klasu sitno peskovita ilovača (Tabela 17). Sadržaj karbonata od 19.7 % na dubini 0-30 cm i 20.54 % na dubini od 30-60 cm svrstava ovaj uzorak u jako karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014). Uzorak spada u srednje alkalna zemljišta (Belić i sar., 2014) sa vrednostima pH u H<sub>2</sub>O od 8.3 (0-30 cm) i 8.5 (30-60 cm), dok su vrednosti pH u KCl 7.7 (0-30 cm) i 7.9 (30-60 cm). Prema sadržaju humusa koji se kretao od 1.41 % do 1.52 % na dubinama od 0-30 cm do 30-60 cm, uzorci odgovaraju slabo-humusnom zemljištu (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je 0.12 % dok je neznatno veći sadržaj od 0.13 % određen na dubini od 30-60 cm, pa su ovi uzorci zemljišta srednje obezbeđeni azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> izosio je 5.8 mg/100g na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila više od duplo manja 1.9 mg/100 g. Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm izosio je 7.3 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 5.5 mg/100 g (Tabela 19). Prema sadržaju P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i K<sub>2</sub>O uzorci se opisuju kao nisko obezbeđeni ovim elementima (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti, i kretao se od oko 5 % vol na 15b do oko 20 % vol na 0.33b (Tabela 18), što je u skladu sa zemljištima koja su teksturne klase peskovite ilovače, koja slabije zadržavaju vodu (Pekeč i sar., 2013).



## UZORAK 11

Lokalitet: Zmajevac  
 Nadmorska visina: N 45.15755; E 19.777567  
 Tip zemljišta: ranker  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna zemljišta sa A-C profilom  
 Vegetacija: livada (crni bor, hrast)

Tabela 20. Mehanički sastav uzorka zemljišta 11

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)					Ukupna glina + prah, <0.02mm	Teksturna Klasa prema Tommerupu
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002mm	Glina <0.002mm	Ukupan pesak, >0.02mm		
ranker	A	0-20	36.5	35.4	21.1	7.1	71.9	28.1	Krupnopeskovita ilovača

Tabela 21. Retencija vode uzorka 11

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
ranker	A	0-20	29.8	25.5	21.8

Tabela 22. Hemijske osobine uzorka zemljišta 11

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
ranker	A	0-20	0.34	7.6	6.8	7.35	0.47	3.1	24.5

Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazuju da prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u uzorak uzet iz tipa zemljišta ranker zauzima teksturnu klasu krupnopeskovita ilovača (Tabela 20). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u slabo karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), sa izmerenom vrednošću od 0.34 %  $\text{CaCO}_3$ . Kiselost zemljišta kretala se od 6.7 u KCl do 7.6 u  $\text{H}_2\text{O}$ , čime ovaj tip spada u slabo alkalna zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj humusa iznosio je 7.35 %, što ovaj tip svrstava u jako humusno zemljište (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj azota iznosio je 0.47 %, sadržaj fosfora predstavljen preko  $\text{P}_2\text{O}_5$  izosio je 3,1 mg/100g, dok je sadržaj kalijuma predstavljen preko  $\text{K}_2\text{O}$  izosio 24.5 mg/100 g (Tabela 22). Na osnovu ovih rezultata ovaj uzorak karakteriše se kao dobro obezbeđen azotom, vrlo niskim sadržajem fosfora i optimalno obezbeđenim sadržajem kalijuma (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet ovog uzorka kretao se od oko 21 % vol na 15b do oko 30 % vol na 0.33b (Tabela 21), što je visoka vrednost za zemljišta teksturne klase krupnopeskovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).

## UZORCI 12 i 13

Lokalitet: put za vrdnik

Koordinate profila: N 45.161; E 19.775117

Tip zemljišta: gajnjača

Red: automorfna zemljišta

Klasa: kambična zemljišta sa A-(B)-C profilom ili A-(B)-R profilom

Vegetacija: šuma (bukva, hrast, grab)

Tabela 23. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 12 i 13

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Ukupna glina + prah, <0.02 mm	
gajnjača	A	0-30	2.5	37.7	45.1	14.7	40.2	59.8	Prašasta ilovača
gajnjača	A	30-60	1.5	35.5	47.5	15.5	36.9	63.1	Prašasta glinovita ilovača

Tabela 24. Retencija vode uzoraka 12 i 13

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
gajnjača	A	0-30	29.3	16.6	14.0
gajnjača	A	30-60	25.8	19.0	13.1

Tabela 25. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 12 i 13

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
gajnjača	A	0-30	0	5.5	4.3	5.07	0.32	0.9	10.9
gajnjača	A	30-60	0	5.2	3.8	3.59	0.25	0.3	10

Na osnovu granulometrijskog sastava uzorak uzet sa dubine od 0-30 cm prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u zauzima teksturnu klasu prašasta ilovača, dok uzorak sa dubine 30-60 cm pripada klasi prašasta glinovita ilovača (Tabela 23). Prema sadržaju karbonata na obe dubine od 0 % pripada beskarbonatnom zemljištu (Belić i sar., 2014). Reakcija zemljišnog rastvora ovog uzorka zemljišta je kisela (Belić i sar., 2014), sa vrednostima pH u KCl 4.3 (0-30 cm) i 3.8 (30-60 cm), dok su vrednosti pH u H<sub>2</sub>O iznosile 5.5 i 5.2 na dubinama 0-30cm i 30-60 cm. Sadržaj humusa kretao se od 5.07 % do 3.59 % na dubinama od 0-30 cm do 30-60 cm, pa se ovaj tip zemljišta svrtava u grupu jako-humusnog zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je 0.32 % dok je sadržaj od 0.25 % određen na dubini od 30-60 cm. Sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> izosio je 0.9(mg/100g) na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 0.3 mg/100 g. Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm izosio je 10.9 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 10 mg/100 g (Tabela 25). Na osnovu dobijenih vrednosti ovaj uzorak se može opisati kao dobro obezbeđen azotom, vrlo nisko obezbeđen fosforom i nisko obezbeđen kalijumom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti i kretao se od oko 13.5 % vol na 15b do oko 28 % vol na 0.33b (Tabela 24), što ukazuje na dobro zadržavanje vode (Pekeč i sar., 2013).

## UZORCI 14 i 15

Lokalitet: Kisač

Koordinate profila: N 45.37595; E 19.770633

Tip zemljišta: černoziem na lesnoj terasi

Red: automorfna zemljišta

Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom

Vegetacija: kineski kupus

Tabela 26. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 14 i 15

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002m	Glina <0.002m	Ukupan pesak >0.02m	Ukupna glina + prah <0.02m	
černoziem na lesnoj terasi	A	0-30	0.1	30.2	37.8	31.9	30.3	69.7	Ilovasta glina
černoziem na lesnoj terasi	A	30-60	0.1	31.2	35.1	33.6	31.3	68.7	Ilovasta glina

Tabela 27. Retencija vode uzoraka 14 i 15

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
černoziem na lesnoj terasi	A	0-30	25.4	20.0	15.5
černoziem na lesnoj terasi	A	30-60	25.4	18.6	15.6

Tabela 28. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 14 i 15

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
černoziem na lesnoj terasi	A	0-30	0.7	8.3	7.5	3.68	0.25	30.8	41.8
černoziem na lesnoj terasi	A	30-60	1.82	8.2	7.6	3.46	0.24	15.5	35

Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazuju da prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u uzorak uzet na teritoriji Kisača zauzima teksturnu klasu ilovasta glina na obe uzorkovane dubine (Tabela 26). Prema izmerenim vrednostima sadržaja karbonata na dubini od 0-30 cm od 0.7 %, a na dubini od 30-60 cm od 1.82 % ovaj tip zemljišta spada u slabo karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014). Kiselost zemljišta bila je umereno alkalna (Belić i sar., 2014) i iznosila je 8.3 u H<sub>2</sub>O odnosno 7.5 u KCl na dubini od 0-30 cm, dok na dubini od 30-60 cm kiselost u H<sub>2</sub>O iznosila je 8.2, a u KCl 7.6. Prema sadržaju humusa ovaj uzorak zemljišta spada u srednje humusna zemljišta (Belić i sar., 2014) i kretao se od 3.68 % do 3.46 % na dubinama od 0-30 cm do 30-60 cm, respektivno. Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je oko 0.25 %, dok je neznatno manji sadržaj od 0.24 % određen na dubini od 30-60 cm, što karakteriše ovaj uzorak kao dobro obezbeđeno azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora predstavljen u formi P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iznosio je 30.8 mg/100g na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila duplo manja 15.5 mg/100 g. Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm izosio je 41.8 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 35 mg/100 g (Tabela 28). Na osnovu dobijenih rezultata ovaj uzorak se karakteriše kao visoko obezbeđen kalijumom i fosforom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti, i kretao se od oko 15 % vol. na 15 b do oko 25 % vol na 0.33b (Tabela 27), što je u skladu sa teksturnom klasom ilovasta glina (Pekeč i sar., 2013).

## UZORCI 16 i 17

Lokalitet: Ljutovo, selo Mamužić  
 Koordinate profila: N 46.079183; E 19.519783  
 Tip zemljišta: černoziem na pesku  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna zemljišta sa A-C profilom  
 Vegetacija: uljana repica

Tabela 29. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 16 i 17

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav (%)						Teksturna Klasa prema Tommerupu
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002mm	Glina <0.002mm	Ukupan pesak, >0.02mm	Ukupna glina + prah, <0.02mm	
černoziem na pesku	A	0-30	8.8	65.9	13.5	11.8	74.7	25.3	Sitno peskovita ilovača
černoziem na pesku	A	30-60	12.0	62.2	13.7	12.1	74.2	25.8	Sitno peskovita ilovača

Tabela 30. Retencija vode uzoraka 16 i 17

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
černoziem na pesku	A	0-30	18.1	8.9	8.1
černoziem na pesku	A	30-60	17.3	9.7	8.0

Tabela 31. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 16 i 17

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
černoziem na pesku	A	0-30	7.13	8.2	7.6	2.65	0.19	36.1	30
černoziem na pesku	A	30-60	6.71	8.2	7.6	2.57	0.19	33	17.3

Uzorci černozema na pesku su uzeti sa lokaliteta Ljutovo, selo Mamužić, sa dve dubine od 0-30 cm i od 30-60 cm. Na osnovu mehaničkog ispitivanja uzoraka sa obe dubine uzorci, prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u, pripadaju teksturnoj klasi sitno-peskovita ilovača (Tabela 29). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u srednje karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednosti sadržaja karbonata na dubini od 0-30 cm iznosila je 7.13 %, dok na dubini od 30-60 cm vrednost je iznosila 6.71 %. Kiselost zemljišta (pH) se nije značajno razlikovala na obe ispitane dubine i iznosila je 7.6 u KCl, odnosno oko 8.2 u H<sub>2</sub>O, što ga opisuje kao umereno alkalno (Belić i sar., 2014). Prema sadržaju humusa koji se kretao oko 2.7 % na obe ispitane dubine zemljište se klasifikuje kao umereno humosno (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota na obe dubine iznosio je 0.19 % što ovaj tip zemljišta opisuje kao srednje obezbeđeno azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) izosio je 36.1 mg/100g na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 33 mg/100 g, što ovaj tip zemljišta karakteriše kao visoko obezbeđeno fosforom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na dubini od 0-30 cm iznosio je 30 mg/100 g, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila duplo manja i iznosila je 17.3 mg/100 g, što u zavisnosti od dubine karakteriše ovaj uzorak od srednje do visoko obezbeđenog kalijumom (Tabela 30) (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti i kretao se od oko 8 % vol na 15b do oko 18 % vol na 0.33b (Tabela 31), što je u skladu sa teksturnom klasom sitno peskovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).



## UZORCI 18 i 19

Lokalitet: Rimski šančevi  
 Koordinate profila: N 45.3299; E 19.832633  
 Tip zemljišta: černoziem  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom  
 Vegetacija: uljana repica

Tabela 32. Mehanički sastav uzoraka zemljišta 18 i 19

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav %						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Ukupna glina + prah, <0.02 mm	
černoziem	A	0-30	0.4	37.5	32.8	29.3	37.8	62.1	Ilovasta glina
černoziem	A	30-60	1.0	36.8	31.7	30.5	37.7	62.2	Ilovasta glina

Tabela 33. Retencija vode uzoraka 18 i 19

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
černoziem	A	0-30	24.6	15.2	14.0
černoziem	A	30-60	25.3	15.7	13.8

Tabela 34. Hemijske osobine uzoraka zemljišta 18 i 19

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
černoziem	A	0-30	1.96	8.2	7.5	2.74	0.20	9.8	21.8
černoziem	A	30-60	1.82	8.2	7.5	2.2	0.16	10.5	22.3

Na osnovu rezultata dobijenih nakon mehaničkog ispitivanja zemljišta prema klasifikaciji po Tommerup-u uzorak uzet sa njive na Rimskim Šančevima zauzima teksturnu klasu ilovasta glina (Tabela 32). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u slabo karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednosti sadržaja karbonata se nisu značajno razlikovale i na obe ispitane dubine iznosile su oko 1.9 %. Na osnovu rezultata određivanja pH u KCl (na obe dubine 7.5) i u H<sub>2</sub>O 8.2) ovaj tip zemljišta spada u slabo-alkalna zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj humusa kretao se od 2.74 % do 2.2 % na dubinama od 0-30 cm do 30-60 cm, respektivno, pa ovaj tip zemljišta spada u umereno humusna zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je 0.20 %, dok je neznatno manji sadržaj od 0,16 % određen na dubini od 30-60 cm, čime se ovaj uzorak karakteriše kao dobro obezbeđeno azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iznosio je oko 9.8mg/100g na dubini od 0-30 cm, a na dubini od 30-60 cm vrednost je bila 10.5 mg/100 g. Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O na obe dubine izosio je oko 22 mg/100 g (Tabela 34). Na osnovu izmerenih sadržaja, ovaj uzorak se može opisati kao srednje do optimalno obezbeđeno fosforom i kalijumom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet nije se značajno razlikovao u odnosu na različite dubine sa kojih su uzorci uzeti i kretao se od oko 14 % vol na 15b do oko 25 % vol na 0.33b (Tabela 33), što je u skladu sa teksturnom klasom ilovasta glina (Pekeč i sar., 2013).

## UZORAK 20

Lokalitet: Čenej

Koordinate profila: N 45.351521;E 19.815889

Tip zemljišta: černozem

Red: automorfna zemljišta

Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom

Vegetacija: povrtarske kulture

Tabela 35. Mehanički sastav uzorka 20

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav %						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Ukupna glina + prah, <0.02 mm	
černozem	A	0-30	0.44	44.84	30.44	24.28	45.28	54.72	Glinovita ilovača

Tabela 36. Retencija vode uzorka 20

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
černozem	A	0-30	30.61	17.33	15.02

Tabela 37. Hemijske osobine uzorka 20

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
černozem	A	0-30	1.13	7.8	7.1	3.99	0.27	38.5	23.2

Uzorci su uzeti iz rizosfere različitih povrtarskih kultura predstavljenih u Tabeli 2. Na osnovu granulometrijskog sastava ovaj tip zemljišta sa lokaliteta Čenej, prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u, zauzima teksturnu klasu glinovita ilovača (Tabela 35). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u slabo-karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), a vrednost sadržaja karbonata iznosila je 1.13. Ovaj uzorak zemljišta ima neutralnu reakciju zemljišnog rastvora (Belić i sar., 2014) sa vrednošću pH u KCl od 7.1 i pH u H<sub>2</sub>O 7.8. Sadržaj humusa iznosio je 3.99 %, pa je ovaj uzorak na granici ka jako-humosnom zemljištu (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota na dubini od 0-30 cm iznosio je 0.27 %, što opisuje ovo zemljište kao dobro obezbeđeno azotom (Manojlović i sar., 1995). Sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> izosio je 38.5 mg/100 g, što opisuje ovaj uzorak zemljišta kao visoko obezbeđeno fosforom. Sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O iznosio je 23.2 mg/100 g (Tabela 37), čime se ovaj uzorak zemljišta karakteriše kao optimalno obezbeđeno kalijumom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet ovog uzorka iznosio je na 0.33b 30.61 (% vol.), zatim na 6.25b 17.33 (% vol.) i 15b 15.02 (% vol.) (Tabela 36), što je u skladu sa teksturnom klasom glinovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).

## UZORAK 21

Lokalitet: Crepaja  
 Koordinate profila: N 45.018116; E 20.645900  
 Tip zemljišta: černoziem  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom  
 Vegetacija: kukuruz, lan, soja

Tabela 38. Mehanički sastav uzorka 21

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav %						Teksturna Klasa prema Tommerupu
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002m	Glina <0.002m	Ukupan pesak, >0.02m	Ukupna glina + prah, <0.02m	
Černoziem	A	0-30	1.32	40.6	39.06	19.01	41.92	58.08	Ilovasta glina

Tabela 39. Retencija vode uzorka 21

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
černoziem	A	0-30	31.1	21.02	20.92

Tabela 40. Hemijske osobine uzorka zemljišta 21

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
Černoziem	A	0-30	20.62	8.0	7.4	3.25	0.22	34.80	52.73

Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazuju da prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u uzorci uzeti iz rizosfere različitih povrtnarskih kultura lokaliteta Crepaja zauzimaju teksturnu klasu ilovasta glina (Tabela 38). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta spada u jako karbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014) sa vrednosti sadržaja karbonata od 20.62 %. Na osnovu rezultata pH u KCl od 7.4 i pH u H<sub>2</sub>O od 8 ovaj uzorak se može svrstati u zemljišta sa umereno-alkalnom reakcijom (Belić i sar., 2014). Određen sadržaj humusa iznosio je 3.25 % pa se ovaj uzorak može svrstati u umereno-humusno zemljište (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota iznosio je 0.22 %, sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> iznosio je 34.8 mg/100 g, a sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O 52.73 mg/100 g (Tabela 40), čime se ovo zemljište karakteriše kao dobro obezbeđeno azotom, sa visokim sadržajem fosfora i vrlo visokim sadržajem kalijuma (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet ovog uzorka iznosio je na 0.33b 31.1 (% vol.), zatim na 6.25b 21.02 (% vol.) i 15b 20.92 (% vol.) (Tabela 39), što je u skladu sa teksturnom klasom glinovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).

## UZORAK 22

Lokalitet: Svilajnac  
 Koordinate profila: N 44.034688; E 20.693997  
 Tip zemljišta: smonica  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom  
 Vegetacija: kukuruz, soja

Tabela 41. Mehanički sastav uzorka zemljišta 22

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav %						Ukupna glina + prah, <0.02 mm	prema	
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Teksturna Klasa		Tommerupu	
smonica	A	0-30	3.6	34.1	34.8	27.4	37.6	68.1	Ilovasta glina		

Tabela 42. Retencija vode uzorka 22

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
smonica	A	0-30	28.9	17.92	15.33

Tabela 43. Hemijske osobine uzorka zemljišta 22

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
smonica	A	0-30	0	5.9	4.7	2.87	0.20	5.7	13.65

Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazuju da prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u uzorak uzet na lokalitetu Svilajnac zauzima teksturnu klasu ilovasta glina (Tabela 41). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj uzorak zemljišta spada u beskarbonatna zemljišta (Belić i sar., 2014), sa vrednosti sadržaja karbonata 0 %. Reakcija zemljišta je kisela sa vrednostima pH u KCl od 4.7 i pH u H<sub>2</sub>O 5.9, što svrstava ovo zemljište u umereno kisela zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj humusa bio je 2.87 % pa se ovo zemljište svrstava u srednje-humusna zemljišta (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota iznosio je 0.20 %,sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> izosio je 5.7 mg/100 g, dok je sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O izosio 13.65 mg/100 g (Tabela 43).Time se ovo zemljište karakteriše kao dobro obezbeđeno azotom, nisko obezbeđeno fosforom, i srednje obezbeđeno kalijumom (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet ovog uzorka iznosio je na 0.33b 28,9(% vol.), zatim na 6.25b 17,92(% vol.) i 15b 15.33(% vol.) (Tabela 42), što je u skladu sa teksturnom klasom glinovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).



## UZORAK 23

Lokalitet: Svilajnac  
 Koordinate profila: N 44.035242; E 20.695049  
 Tip zemljišta: smonica  
 Red: automorfna zemljišta  
 Klasa: humusno-akumulativna sa A-C profilom  
 Vegetacija: povrtarske kulture

Tabela 44. Mehanički sastav uzorka zemljišta 23

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Mehanički sastav %						Teksturna Klasa Tommerupu prema
			Krupan pesak 2.0-0.2mm	Sitan pesak 0.2-0.02 mm	Prah 0.02-0.002 mm	Glina <0.002 mm	Ukupan pesak, >0.02 mm	Ukupna glina + prah, <0.02mm	
smonica	A	0-30	3.9	32.4	37.1	26.5	36.4	63.6	Ilovasta glina

Tabela 45. Retencija vode uzorka 23

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	Retencija vode (% vol.)		
			0.33b	6.25b	15.0b
smonica	A	0-30	33.76	17.65	15.84

Tabela 46. Hemijske osobine uzorka zemljišta 23

Tip zemljišta	Horizont	Dubina (cm)	CaCO <sub>3</sub> (%)	pH		Humus (%)	Ukupan N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O (mg/100g)
				H <sub>2</sub> O	KCl				
smonica	A	0-30	0.51	7.3	6.7	4.04	0.26	79.3	118

Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazuju da prema klasifikaciji zemljišta po Tommerup-u uzorak 23, uzet iz rizosfere različitih povrtarskih kultura na teritoriji opštine Svilajnac, zauzima teksturnu klasu ilovasta glina (Tabela 44). Hemijska ispitivanja pokazala su da ovaj tip zemljišta pripada slabokarbonatnim zemljištima (Belić i sar., 2014) sa vrednošću sadržaja karbonata od 0.51 %. Na osnovu rezultata pH u KCl od 6.7 i pH u H<sub>2</sub>O od 7.3 ovaj uzorak se može svrstati u zemljišta sa neutralnom reakcijom (Belić i sar., 2014). Određen sadržaj humusa iznosio je 4.04 % pa se ovaj uzorak može svrstati u jako humozno zemljište (Belić i sar., 2014). Sadržaj azota iznosio je 0.26 %,sadržaj fosfora predstavljen preko P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> izosio je 79,3 mg/100 g, a sadržaj kalijuma predstavljen preko K<sub>2</sub>O 118 mg/100 g (Tabela 46). Shodno ovim rezultatima ovo zemljište se može okarakterisati kao dobro obezbeđeno azotom, i sa ekstremno visokim vrednostima fosfora i kalijuma (Manojlović i sar., 1995). Retencioni vodni kapacitet ovog uzorka iznosio je na 6,25b 17,65(% vol.) i 15b 15,84 (% vol.), a na 0,33b 33,76 (% vol.) (Tabela 45), što je u skladu sa teksturnom klasom glinovita ilovača (Pekeč i sar., 2013).

## **4.2. Sadržaj teških metala u uzorcima zemljišta**

### **4.2.1. Sadržaj ukupnih teških metala**

U ispitivanim uzorcima određen je ukupni sadržaj 8 metala (Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni i Zn). Sadržaj teških metala izražen je u mg metala/kg zemljišta (ppm) i prikazan u Tabeli 47. Sadržaj kadmijuma u uzorku zemljišta 11, tipa ranker, je bio < 0,1, dok je najveći sadržaj od 0.57 mg/kg određen u uzorku zemljišta 1, tipa rendzina, iz vinograda. Minimalni sadržaj hroma nađen je u uzorku 10, fluvisol, i iznosio je 20.29 mg/kg, a maksimalan u uzorku zemljišta 11, tipa ranker, vrednosti 718.1 mg/kg. Sadržaj kobalta kretao se od 3.88 mg/kg u uzorku 16, černozeza sa lokaliteta sela Ljutovo intenzivne poljoprivredne proizvodnje, do 57.18 mg/kg u uzorku zemljišta 11, ranker. Prisustvo bakra određeno u uzorcima variralo je od 8.15 mg/kg u uzorku šumskog zemljišta 12, tipa gajnjača, do 72.82 mg/kg u uzorku zemljišta br. 1, tipa rendzina, iz vinograda. Sadržaj olova u uzorcima kretao se od 5.96 mg/kg u uzorku br. 10, fluvisol, do 24.48 mg/kg u uzorku br. 23, smonica. Sadržaj mangana varirao je od 216,8 mg/kg izmeren u uzorku br. 7, ritska crnica, do 926.6 mg/kg u uzorku br. 23, smonica. Značajna variranja mogu se primetiti u sadržaju nikla gde je u uzorku zemljišta br.11 tipa ranker nađena maksimalna vrednost od 1587 mg/kg, dok je najmanja vrednost određena u uzorku br. 17, černozeza sa lokaliteta sela Mamužić, od 10.57 mg/kg. Vrednosti sadržaja cinka kretale su se od 42.51 do 80.50 mg/kg u uzorcima br.10 (fluvisol) i br.1 (rendzina), redom.

Tabela 47. Sadržaj metala u uzorcima zemljišta

Uzorak	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)
1	0.57	37.47	7.34	72.82	11.83	402.2	22.11	80.50
2	0.49	35.10	6.87	58.61	11.55	363.7	23.89	73.13
3	0.36	44.91	8.77	58.84	12.66	484.9	25.26	76.92
4	0.36	43.42	8.81	61.60	11.73	477.2	23.70	71.23
5	0.31	39.64	7.78	20.11	9.93	486.1	21.97	56.57
6	0.31	39.52	7.65	20.17	9.89	484.8	21.57	55.61
7	0.25	41.22	6.89	26.74	11.43	216.8	24.27	58.18
8	0.29	39.96	6.98	27.57	11.89	217.3	24.18	61.32
9	0.21	22.61	5.53	11.54	6.98	302.4	15.61	47.77
10	0.16	20.29	5.98	10.33	5.96	290.1	15.88	42.51
11	< 0.1	718.10	57.18	10.63	15.92	595.9	1587.00	66.49
12	0.13	102.80	9.32	8.15	14.80	220.4	57.58	51.10
13	0.16	97.38	9.92	9.12	13.29	220.6	57.03	52.12
14	0.28	51.89	9.04	26.29	11.97	457.3	26.32	68.69
15	0.26	45.70	8.85	25.26	11.09	423.7	24.92	65.33
16	0.22	23.26	3.88	35.53	6.24	329.3	10.67	43.92
17	0.21	23.29	3.97	28.61	6.03	326.8	10.57	44.79
18	0.28	50.04	8.94	23.48	12.71	523.2	26.79	64.41
19	0.27	49.13	8.70	23.22	12.61	520.9	24.90	65.11
20	0.27	48.49	8.96	23.40	12.20	598.7	24.66	56.96
21	0.42	36.99	6.88	22.32	9.66	566.3	19.64	50.31
22	0.17	60.72	11.09	21.65	20.56	748.7	30.35	56.69
23	0.27	71.76	16.59	33.94	24.48	926.6	38.48	73.81
MIN	< 0.1	20.29	3.88	8.15	5.96	216.8	10.57	42.51
MAX	0.57	718.10	57.18	72.82	24.48	926.6	1587.00	80.50
TAR	0.8	100	9	36	85	/	35	140
REM	12	380	240	190	530	/	210	720

\*MIN-minimalna koncentracija, MAX-maksimalna koncentracija, TAR-granične vrednosti, REM-remedijacione vrednosti

#### 4.2.2. Sadržaj lako pristupačnih teških metala

Sadržaj lako pristupačnih teških metala određen je u uzorcima ekstrakcijom u DTPA i rezultati su izraženi u mg metala/kg zemljišta (Tabela 48). Rezultati su pokazali da se sadržaj kadmijuma kretao od 0.01 mg/kg u uzorku br. 12 iz tipa zemljišta gajnjača do 0,209 mg/kg u uzorku zemljišta br.18, tipa černozem, sa Rimskih šančeva. Sadržaj hroma iznosio je 0.017 mg/kg u uzorku zemljišta br. 4, tipa rendzina, dok je najviši sadržaj određen u uzorku zemljišta br. 12, tipa gajnjača, i iznosio je 0.491 mg/kg. Sadržaj kobalta iznosio je 0.032 mg/kg u uzorku br. 23, zemljište tipa smonica, dok je najviši sadržaj (2.130 mg/kg) određen u uzorku br.11, zemljište tipa ranker. Najviši sadržaj bakra (19.684 mg/kg) određen je u uzorku zemljišta br. 1, tipa rendzina, iz vinograda, a najniži sadržaj od 0.556 mg/kg, određen je u uzorku br. 13, zemljišta tipa gajnjača. Sadržaj mangana varirao je od 8.842 mg/kg u uzorku 7 (ritska crnica, Lok) do 54.606 mg/kg u uzorku 11 (ranker). Sadržaj nikla kretao se od 0.232 mg/kg u uzorku br.10 (fluvisol) do 106.056 mg/kg u uzorku br.11 (ranker). Sadržaj olova kretao se od 0.661 mg/kg u uzorku br.10 (fluvisol) do 8.257 mg/kg u uzorku 12 (gajnjača). Sadržaj cinka kretao od 0.471mg/kg u uzorku br. 10 (fluvisol) do 5.584 mg/kg u uzorku br. 16 (černozem, organska poljoprivredna proizvodnja).

Tabela 48. Sadržaj lakopristupačnih teških metala u uzorcima zemljišta

Uzorak	Cd (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)
1	0.162	0.019	0.066	19.684	1.985	18.268	0.391	5.026
2	0.141	0.019	0.083	16.718	1.965	20.122	0.413	4.348
3	0.097	0.018	0.094	11.818	1.554	22.970	0.311	2.294
4	0.099	0.017	0.082	12.466	1.658	21.914	0.281	2.166
5	0.067	0.018	0.093	1.507	1.142	30.554	0.944	1.023
6	0.062	0.018	0.072	1.087	1.023	26.736	0.871	0.994
7	0.102	0.142	0.049	3.552	3.536	8.842	1.613	1.268
8	0.116	0.095	0.047	3.550	3.066	9.428	1.981	1.315
9	0.052	0.024	0.044	1.837	0.816	10.228	0.290	0.667
10	0.035	0.026	0.052	1.472	0.661	9.158	0.232	0.471
11	0.129	0.237	2.130	1.114	2.328	54.606	106.056	2.722
12	0.011	0.491	1.230	0.625	8.257	24.912	6.747	3.001
13	0.048	0.305	1.173	0.556	6.657	13.488	5.883	2.383
14	0.069	0.041	0.084	1.696	1.982	21.766	1.182	0.637
15	0.067	0.061	0.078	2.066	2.678	24.022	1.541	0.621
16	0.046	0.018	0.077	7.326	1.196	24.020	0.684	5.584
17	0.047	0.018	0.066	5.478	1.110	20.438	0.679	4.390
18	0.209	0.026	0.074	1.560	1.868	26.102	1.080	0.729
19	0.065	0.359	0.076	1.595	1.746	28.582	1.112	0.774
20	0.071	0.366	0.037	1.023	1.359	13.722	0.942	1.558
21	0.054	0.018	0.070	0.962	1.631	21.184	0.769	1.188
22	0.044	0.800	0.206	3.406	2.260	36.716	4.592	0.811
23	0.061	0.078	0.032	4.328	2.216	12.824	1.358	5.518
MIN	0.011	0.017	0.032	0.556	0.661	8.842	0.232	0.471
MAX	0.209	0.800	2.130	19.684	8.257	54.606	106.056	5.584

\*MIN-minimalna koncentracija; MAX-maksimalna koncentracija

Izmerene vrednosti za sadržaj ukupnih metala u ispitanim uzorcima zemljišta, značajno prelaze granične i remedijacione vrednosti u slučaju hroma i nikla, u uzorku 11. Povećane vrednosti izmerene su i u uzorcima 12 i 13, za iste elemente. U uzorcima 1-4 određene su povećane vrednosti bakra.

U poređenju sa značajno povećanom koncentracijom ukupnog hroma u uzorku 11., sadržaj lakopristupačnog hroma iznosio je 0.297 mg/kg, pa njegov procentualni udeo u ukupnom iznosi samo 0.05 %. U slučaju nikla u istom uzorku, određena koncentracija lakopristupačnog oblika bila je 106.056 mg/kg, što značajno prelazi granične vrednostia

njegov udeo u odnosu na ukupni iznosio oko 10 %. Najviši procentualni udeo može se primetiti za kadmijum, i kretao se od 8.29 % do 73.62 %, ne računajući uzorak 11, kod koga ovaj element nije ni detektovan. Povećan udeo lakopristupačnog u odnosu na ukupan sadržaj izračunat je i za bakar u uzorcima 1-4 i iznosio je od 20.08 do 27.03 %. Procentualni udeo pristupačnih metala u ukupnom sadržaju predstavlja dobar pokazatelj zagađenja zemljišta. Ukoliko je nizak, smatra se da je poreklo metala prirodno, u suprotnom smatra se da je izvor metala antropogenog porekla. Iz naših rezultata može se zaključiti da su izvori nikla i bakra u prethodno pomenutim uzorcima pretežno antropogenog porekla (Tabela 49). Ovo se ne može zaključiti za hrom i nikel, jer iako ukupne koncentracije ovih metala značajno prelaze preporučene vrednosti, na osnovu udela lakopristupačnog u ukupnom sadržaju, smatra se da je njihov sadržaj pretežno geološkog porekla.

Tabela 49. Procentualni udeo lakopristupačnih u ukupnom sadržaju metala

Uzorak	% udeo lakopristupačnih u ukupnom sadržaju metala							
	Cd	Cr	Co	Cu	Pb	Mn	Ni	Zn
1	28.63	0.05	0.90	27.03	16.78	4.54	1.77	6.24
2	28.35	0.05	1.21	28.52	17.01	5.53	1.73	5.95
3	26.83	0.04	1.07	20.08	12.27	4.74	1.23	2.98
4	27.36	0.04	0.93	20.24	14.13	4.59	1.19	3.04
5	22.30	0.05	1.20	7.49	11.49	6.29	4.30	1.81
6	19.97	0.05	0.94	5.39	10.34	5.51	4.04	1.79
7	41.11	0.34	0.71	13.28	30.94	4.08	6.65	2.18
8	39.79	0.24	0.67	12.88	25.79	4.34	8.19	2.14
9	25.05	0.11	0.80	15.92	11.68	3.38	1.86	1.40
10	21.47	0.13	0.87	14.25	11.08	3.16	1.46	1.11
11	/	0.03	3.73	10.48	14.62	9.16	6.68	4.09
12	8.29	0.48	13.20	7.67	55.79	11.30	11.72	5.87
13	29.23	0.31	11.82	6.10	50.09	6.11	10.32	4.57
14	24.96	0.08	0.93	6.45	16.56	4.76	4.49	0.93
15	25.97	0.13	0.88	8.18	24.15	5.67	6.18	0.95
16	20.89	0.08	1.99	20.62	19.18	7.29	6.41	12.71
17	22.97	0.08	1.66	19.15	18.41	6.25	6.42	9.80
18	73.62	0.05	0.83	6.64	14.70	4.99	4.03	1.13
19	24.37	0.73	0.87	6.87	13.85	5.49	4.47	1.19
20	26.67	0.75	0.41	4.37	11.14	2.29	3.82	2.74
21	12.92	0.05	1.02	4.31	16.88	3.74	3.92	2.36
22	25.39	1.32	1.86	15.73	10.99	4.90	15.13	1.43
23	22.53	0.11	0.19	12.75	9.05	1.38	3.53	7.48

### 4.3. Mikrobiološka analiza uzoraka zemljišta

Mikrobiološkom analizom uzoraka zemljišta određen je ukupan broj bakterija, amonifikatora, azotobaktera, oligonitrofila, aktinomiceta, gljiva po gramu suvog zemljišta, kao i dehidrogenzna aktivnost zemljišta (DHA). Brojnost i enzimska aktivnost mikroorganizama zavisili su od lokaliteta i tipa zemljišta sa kojih su uzeti uzorci (Tabela 50).

Tabela 50. Rezultati mikrobiološke analize uzoraka zemljišta

Broj uzorka	broj mikroorganizama po g <sup>-1</sup> suvog zemljišta						DHA μg TPF g <sup>-1</sup> zemljišta
	ukupan broj bakterija x 10 <sup>6</sup>	amonifikatori x 10 <sup>6</sup>	azotobakter x 10 <sup>1</sup>	oligonitrofil x 10 <sup>5</sup>	aktinomicete x 10 <sup>3</sup>	gljive x 10 <sup>3</sup>	
1	19.6	21.1	121	24.6	19.4	14.0	290
2	8.0	9.5	111	12.9	16.7	12.4	307
3	23.2	23.1	109	23.3	6.4	10.8	446
4	21.7	16.8	105	15.6	5.2	8.3	281
5	21.7	21.7	79	23.0	4.8	5.8	823
6	13.1	13.7	32	21.0	4.4	5.6	436
7	14.9	20.0	65	21.3	5.2	5.8	125
8	19.1	22.9	105	21.7	3.1	5.2	134
9	13.2	13.6	24	13.4	37.7	7.7	148
10	7.4	8.2	6	9.6	27.4	3.3	108
11	27.9	19.3	4	30.3	2.7	8.6	709
12	19.2	9.5	0	1.7	8.8	22.2	357
13	8.2	6.7	0	1.5	1.9	9.4	109
14	8.4	17.1	81	26.1	1.0	10.2	195
15	8.2	21.4	65	16.2	0.5	6.7	358
16	23.0	19.1	139	22.3	6.5	7.8	782
17	12.0	13.1	83	16.3	3.0	8.6	314
18	14.5	14.6	36	18.4	8.0	14.2	215
19	13.7	13.6	32	17.4	5.3	12.9	244
20	453	108	93	329	5.0	40	149
21	443	118	56	381	11.0	32	390
22	316	143	27	273	9.0	66	203
23	206	52	14	157	0	43	40
MIN	7.4	6.7	0	1.5	0	3.3	36
MAX	453	143	139	381	37.7	66	823

\*MIN-minimalna vrednost; MAX-maksimalna vrednost

Ukupan broj bakterija kretao se od 7.4 x 10<sup>6</sup>/g zemljišta uzorka 10, fluvisol, do 4.53 x 10<sup>8</sup>/g u uzorku br.20, černoze sa lokaliteta Čenej. Amonifikatori su najmanje bili zastupljeni u uzorku 13, gajnjača, 6.7 x 10<sup>6</sup>, a najviše u uzorku br.22, smonica 143 x 10<sup>6</sup>. Azotobakter u



uzorcima 12 i 13, iz zemljišta tipa gajnjača, nije konstatovan, a najviše je zastupljen u uzorku br. 16, černoze na lesnoj terasi (selo Mamužić)  $139 \times 10^1$ . Oligonitrofilni, koji se ubrajaju slobodne azotofiksatore, najmanje su zastupljeni u uzorku br. 13, šumskog zemljišta gajnjača,  $1.5 \times 10^5$ , a najviše  $381 \times 10^5$  u uzorku br. 21, zemljišta iz organske poljoprivredne proizvodnje černoze (Crepaja). Aktinomicete nisu konstatovane u uzorku br. 23, smonica(0), a najveći broj je u uzorku br. 9, fluvisol,  $37.7 \times 10^3$ .

Broj gljiva kretao se od  $3.3 \times 10^3$  u uzorku zemljišta br.10, fluvisol, do  $66 \times 10^3$  u uzorku zemljišta br. 22, tipa smonica.

Najveća vrednost dehidrogenazne aktivnosti zemljišta nađena je u uzorku zemljišta br. 5, tipa sirozem na lesu, od  $823 \mu\text{g TPF g}^{-1}$  zemljišta, a najmanja vrednost je određena u uzorku br. 23, zemljišta tipa smonica  $40 \mu\text{g TPF g}^{-1}$  zemljišta.

Ukupan broj mikroorganizama je najveći u uzorcima 20-23, zemljištima tipa černoze i smonica, koji je pratio povećan broj amonifikatora, oligonitrofila i gljiva u odnosu na ostale uzorke (Tabela 50). Međutim u tim uzorcima, posebno u uzorku br.23, dehidrogenazna aktivnost je veoma niska.

#### **4.4. Izolovanje i molekularna identifikacija gljiva iz roda *Trichoderma* iz različitih tipova zemljišta**

Na osnovu rezultata molekularne identifikacije ukupno je izolovan 41 izolat gljiva koje pripadaju rodu *Trichoderma* iz uzoraka zemljišta prikazanih u prethodnom odeljku. Molekularna identifikacija je urađena na osnovu ITS fragmenata. Sekvence PCR proizvoda dobijenih amplifikacijom ITS1/4 gena svih izolovanih izolata prikazane su u Prilogu 3. Iz različitih tipova zemljišta u uzorcima br. 1 do br. 19, uzetih sa dve dubine 0-30 cm i 30-60 cm, izolovano je ukupno 15 izolata, koji su identifikovani da pripadaju vrstama: *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. gamsii*, *T. citrinoviride*, *T. virens/Hypocrea virens* i *T. longibrachiatum* (Tabela 51). Tipovi zemljišta iz kojih su izolovani : rendzina, sirozem na lesu, ritska crnica, fluvisol, ranker, gajnjača i černoze. Izolati se čuvaju u kolekciji Fakulteta za nauku i informatiku u Segedinu (SZMC). Od

ukupno 15 izolata, samo 3 je izolovano sa dubine od 30-60 cm, iz uzoraka 6, 13 i 17. Dobijeni rezultati ukazali su da je površinski sloj zemljišta pogodan za rast i razvoj gljiva roda *Trichoderma*, pa je sledilo uzorkovanje i praćenje varijabilnosti ovih gljiva u rizosferi različitih povrtarskih kultura. Rezultati dobijeni nakon izolacije iz rizosfere različitih ratarskih i povrtarskih kultura i nekih korova na četiri lokacije: Svilajnac (njiva i bašta), Čenej i Crepaja, izolovano je ukupno 26 izolata među kojima je 9 različitih vrsta (Tabela 51).

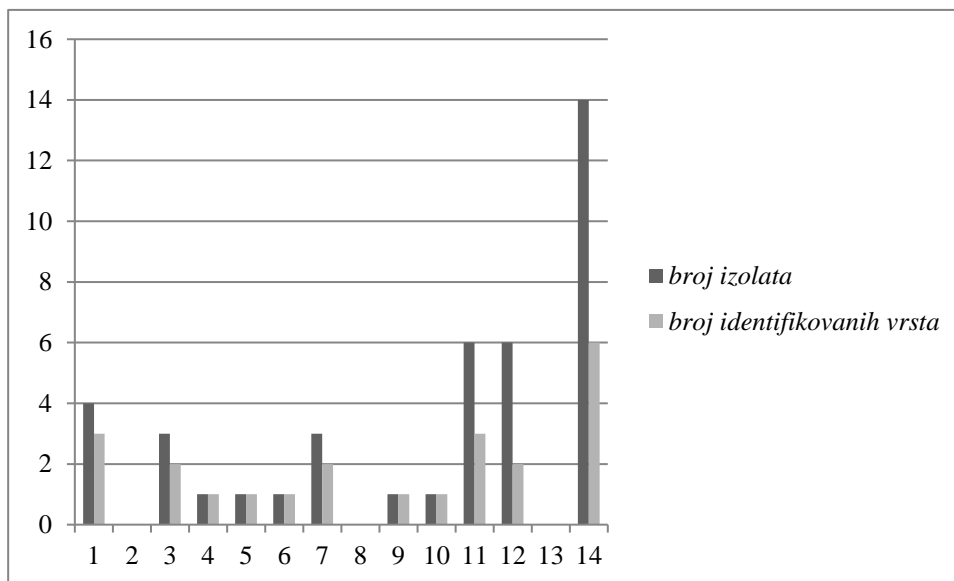
Četnaest izolata izolovanih iz uzorka Svilajnac (bašta) su identifikovani kao šest vrsta (Tabela 51). Sa lokaliteta Čenej i Crepaja izolovano je po šest izolata, za koje je identifikovano da pripadaju trima (Čeneja) odnosno dvema vrstama (Crepaja). Četiri izolata, identifikovana kao 3 vrste, su izolovana iz uzoraka zemljišta uzetih u Sremskim Karlovcima. Jedan izolat je izolovan iz uzoraka zemljišta sa sledećih lokaliteta: Titelski Breg, Lok, Kačka šuma, Zmajevac, put za Vrdnik, Ljutovo i Rimski Šančevi, dok, nijedan izolat nije izolovan iz uzoraka sa lokaliteta: Sremski Karlovci 2, Kisač i Svilajnac1 (Slika 7). Većina izolata izolovana je sa dubine 0-30cm. Od ukupno 41-nog izolata samo 3 je bilo sa dubine 30-60 cm.

Tabela 51. Molekularna identifikacija gljiva roda *Trichoderma* iz različitih uzoraka zemljišta

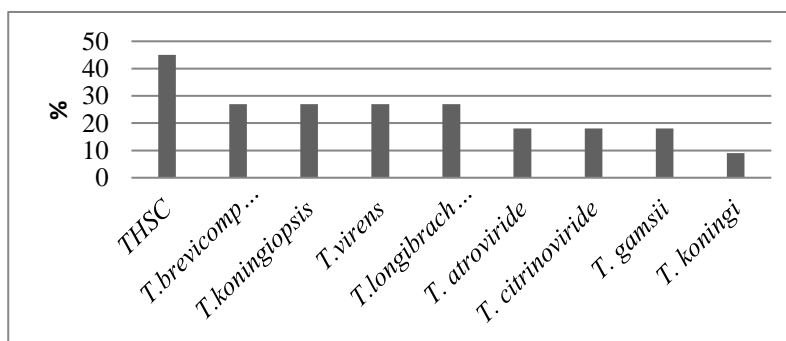
Broj uzorka	Tip zemljišta	Mesto uzorkovanja	Dubina (cm)	SZMC broj	GenBank Pristupni broj (ITS)	TrichOkey 2.0 ili NCBI identifikacija
1	Rendzina	Sremski Karlovci	0-30	SZMC 20966	<b>KP316411</b>	<i>T. koningiopsis</i>
				SZMC 20969	<b>KP316414</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20976	<b>KP316421</b>	<i>T. atroviride</i>
				SZMC 20978	<b>KP316423</b>	<i>T. koningiopsis</i>
2	Rendzina	Sremski Karlovci	30-60	-	-	
3			0-30	-	-	
4			30-60	-	-	
5			0-30	SZMC 22661	<b>KP316440</b>	<i>T. brevicompactum</i>
6	Sirozem na lesu	Titelski Breg	30-60	SZMC 22662	<b>KP316450</b>	<i>T. gamsii</i>
7			0-30	SZMC 22663	<b>KP316441</b>	<i>T. brevicompactum</i>
8	Ritska crnica	Lok	30-60	SZMC 22664	<b>KP316444</b>	<i>T. longibrachiatum</i>
9			0-30	SZMC 22668	<b>KP316445</b>	<i>T. citrinoviride</i>
10	Fluvisol	Kačka šuma	30-60	-	-	-
11	Ranker	Zmajevac	0-20	SZMC 22669	<b>KP316442</b>	<i>T. longibrachiatum</i>
12	Gajnjača	put za Vrdnik	0-30	SZMC 22665	<b>KP316443</b>	<i>T. longibrachiatum</i>
13			30-60	SZMC 22666	<b>KP316446</b>	<i>T. virens</i>
14	Černozem na lesnoj terasi	Kisač	0-30	-	-	-
15			30-60	-	-	-
16	Černozem na pesku	Ljutovo	0-30	-	-	-
17			30-60	SZMC 22660	<b>KP316448</b>	<i>T. harzianum</i>
18			0-30	SZMC 22659	<b>KP316449</b>	<i>T. virens</i>
19		Rimski Šančevi	0-30	-	-	-
		Rimski Šančevi	30-60	-	-	-
20	Černozem	Čenej	0-30	SZMC 20974	<b>KP316419</b>	<i>T. brevicompactum</i>
				SZMC 20977	<b>KP316422</b>	<i>T. brevicompactum</i>
				SZMC 20979	<b>KP316424</b>	<i>T. koningiopsis</i>
				SZMC 20985	<b>KP316430</b>	<i>T. gamsii</i>
				SZMC 20986	<b>KP316431</b>	<i>T. brevicompactum</i>
				SZMC 20988	<b>KP316433</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20971	<b>KP316416</b>	<i>T. brevicompactum</i>
21	Crepaja	0-30	SZMC 20973	<b>KP316418</b>	<i>T. brevicompactum</i>	
			SZMC 20975	<b>KP316420</b>	<i>T. harzianum</i>	
			SZMC 20982	<b>KP316427</b>	<i>T. harzianum</i>	
			SZMC 20990	<b>KP316435</b>	<i>T. brevicompactum</i>	
			SZMC 20994	<b>KP316439</b>	<i>T. harzianum</i>	
22		Svilajnac 1 (njiva)	0-30	/	/	/
23	Smonica	Svilajnac2 (bašta)	0-30	SZMC 20965	<b>KP316410</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20967	<b>KP316412</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20968	<b>KP316413</b>	<i>T. atroviride</i>
				SZMC 20970	<b>KP316415</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20972	<b>KP316417</b>	<i>T. koningii</i>
				SZMC 20980	<b>KP316425</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20981	<b>KP316426</b>	<i>T. harzianum</i>
				SZMC 20983	<b>KP316428</b>	<i>T. koningiopsis</i>
				SZMC 20984	<b>KP316429</b>	<i>T. koningiopsis</i>
				SZMC 20987	<b>KP316432</b>	<i>T. citrinoviride</i>
				SZMC 20991	<b>KP316436</b>	<i>T. virens</i>
SZMC 20992	<b>KP316437</b>	<i>T. harzianum</i>				
SZMC 20993	<b>KP316438</b>	<i>T. koningiopsis</i>				
SZMC 20989	<b>KP316410</b>	<i>T. harzianum</i>				

Zastupljenost, odnosno broj vrsta i izolata gljiva roda *Trichoderma*, izolovanih sa ukupno 11 lokaliteta od 14, prikazana je na Slici 7.

Najzastupljenija vrsta bila je *T. harzianum* (45 %), a potom slede *T. brevicompactum*, *T. koningiopsis*, *T. virens* i *T. longibrachiatum* sa zastupljenošću od oko 27 %. Zastupljenost ostalih vrsta bila je ispod 20 % (Slika 8).



Slika 7. Zastupljenost vrsta i izolata gljiva roda *Trichoderma* na različitim lokalitetima (1- Sremski Karlovci 1 (na dubini zemljišta od 0-30 i 30-60cm); 2- Sremski Karlovci2 (0-30 i 30-60cm); 3- Titelski breg (0-30 i 30-60cm); 4-Lok (0-30 i 30-60cm); 5-Kačka šuma (0-30 i 30-60cm); 6-Zmajevac (0-20cm); 7-put za Vrdnik (0-30 i 30-60cm); 8-Kisač (0-30 i 30-60cm); 9-Ljutovo(0-30 i 30-60cm);10-Rimski Šančevi (0-30 i 30-60cm); 11-Čenej (0-30 i 30-60cm); 12-Crepaja (0-30 i 30-60cm); 13-Svilajnac1 (0-30 i 30-60cm); 14-Svilajnac2 (0-30 i 30-60cm))



Slika 8. Učestalost vrsta gljiva roda *Trichoderma* u zemljištima sa različitih lokaliteta.

THSC-*Trichoderma harzianum* species complex

#### 4.5. Povezanost edafskih parametara i sadržaja metala sa brojem izolata gljiva roda *Trichoderma*

U Tabeli 52. prikazane su vrednosti korelacionih koeficijenata ( $R^2$ ), koje ukazuju na kvalitet neparametrijskog regresionog modela koji uključuje vezu između edafskih parametara/i sadržaja metala u zemljištu i broja izolata gljiva roda *Trichoderma* spp. Visoke  $R^2$  vrednosti dobijene su pri korelaciji broja izolata i vrednosti sadržaja lako-dostupnog K i P, kao i vrednosti pH zemljišta, sadržaja Cr, Co, Pb, Mn i Ni ( $R^2$  je jednako 0.8961, 0.7996, 0.6361, 0.7111, 0.8508, 0.8221, 0.8309, 0.8766, redom). Test prilagođenosti individualnih modela eksperimentalnim podacima, koji opisuje vezu između broja izolovanih izolata i drugih edafskih faktora, kao što su sadržaj  $\text{CaCO}_3$ , ukupnog azota, humusa, Cd, Cu i Zn je bila niža ( $R^2$  je jednaka 0.3147, 0.4318, 0.387, 0.3281, 0.479, 0.3827, redom).

Tabela 52. Povezanost broja izolovanih izolata gljiva roda *Trichodermai* varijabli, ispitana primenom statističke metode lokalne regresije (**LOESS**)

Edafski faktori	$\text{CaCO}_3$	pH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	pH (KCl)	Humus	Total N	$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{K}_2\text{O}$	Cd	Cr	Co	Cu	Pb	Mn	Ni	Zn
$R^2$	0.3147	0.6355	0.6361	0.4318	0.387	0.7996	0.8961	0.3281	0.7111	0.8508	0.479	0.8221	0.8309	0.8766	0.3827

## **4.6. Ekološko-biohemijska karakterizacija gljiva iz roda *Trichoderma***

### **4.6.1. Enzimski karakterizacija izolata**

Kao što je objašnjeno u pregledu literature, hidrolitički enzimi koje proizvode gljive roda *Trichoderma* imaju važnu ulogu u procesu biokontrole, indukciji otpornosti kod biljaka, kao i primeni vrsta gljiva roda *Trichoderma* u različitim granama biotehnologije. Pored identifikacije vrsta gljiva, ispitana je semikvantitativno aktivnost ekstraćelijskih enzima odabranih izolata kako bi se bolje razumeli procesi u kojima gljive učestvuju i razmotrile mogućnosti njihove primene. Očekuje se da će se varijabilnost gljiva u okviru roda *Trichoderma* koja je utvrđena na osnovu molekularne identifikacije odraziti i na metaboličke procese.

Većina 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 aktivnosti 19 enzima. Koristi se u taksonomiji različitih grupa bakterija, ali i eukaritskih organizama među kojima su gljive (Bridge i Hawksworth., 1984), jer može detektovati enzimsku aktivnost u različitim tečnostima i filtratima kultura gljiva.

Rezultati enzimske aktivnosti dobijeni API ZYM testom pokazali su da među ispitivanim izolatima postoje određene sličnosti, ali i razlike u enzimskoj aktivnosti (Tabela 53).

U slučaju svih ispitanih izolata aktivnosti kisele fosfataze, naftol-as-bi-fosfohidrolaze i N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze su bile pozitivne. Aktivnosti  $\beta$ -glukuronidaze,  $\alpha$ -glukozidaze i  $\beta$ -glukozidaze nisu detektovane ni u jednom od ispitanih filtrata. Samo kod *T. brevicompactum* (kolone 1 i 2 u Tabeli 53) izmerene su visoke aktivnosti  $\alpha$ -galaktozidaze i  $\beta$ -galaktozidaze. Pored toga, kod ovih izolata detektovane su najveće aktivnosti esteraze-lipaze i lipaze. Treba istaći da je izolat *T.koningiopsis* SZMC 20983 (kolona 12, Tabela 53), pored visokih aktivnosti kisele fosfataze i naftol-as-bi-fosfohidrolaze, koje su bile pozitivne kod svih uzoraka, pokazao najveće aktivnosti esteraze, alkalne fosfataze i N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze.

Tabela 53. Enzimaska karakterizacija odabranih izolata gljiva roda *Trichoderma*

Naziv enzima	Aktivnost ekstraćelijskih enzima odabranih izolata gljiva*															
	u okviru roda <i>Trichoderma</i>															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Alkalna fosfataza	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	3	1	0	1	1
Esteraza (C4)	3	3	0	0	1	1	0	2	1	0	2	3	0	0	0	2
Esteraza lipaza (C8)	3	3	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Lipaza (C14)	2	2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
Leucin-arilamidaza	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
Valin-arilamidaza	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
Cistin-arilamidaza	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
Tripsin	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
$\alpha$ -himotripsin	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Kisela fosfataza	3	3	2	3	3	3	2	3	2	3	2	3	1	1	3	3
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaza	3	3	2	3	3	3	2	3	2	3	2	3	1	1	3	3
$\alpha$ -galaktozidaza	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
$\beta$ -galaktozidaza	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -glukuronidaza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -glukozidaza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -glukozidaza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaza	1	1	1	3	2	3	0	0	2	3	3	3	0	1	2	0
$\alpha$ -manozidaza	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
$\alpha$ -fukozidaza	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*1-*T. brevicompactum* SZMC 22661; 2-*T. brevicompactum* SZMC 22663; 3-*T. longibrachiatum* SZMC 22664; 4-*T. citrinoviride* SZMC 22668; 5-*T. longibrachiatum* SZMC 22669; 6-*T. longibrachiatum* SZMC 22665; 7-*T. harzianum* SZMC 20994; 8-*T. harzianum* SZMC20988; 9-*T. harzianum* SZMC 20969; 10-*T. citrinoviride* SZMC 20987; 11-*T. harzianum* SZMC 20965; 12-*T. koningiopsis* SZMC 20983; 13-*T. gamsii* SZMC 20985; 14-*T. harzianum* SZMC 20982; 15-*T. atroviride* SZMC 20968; 16- *T. koningiopsis* SZMC 20984

\*\*Na osnovu intenziteta boje u odnosu na kontrolu procenjeno je prisustvo enzima: 0-bez prisustva; 1-slab intenzitet, 2-srednji intenzitet, 3-jak intenzitet

#### 4.6.2. *In vitro* ispitivanje antagonizma izolata odabranih izolata *Trichoderma* prema fitopatogenim gljivama

*In vitro* ispitivanje antagonizma rađeno je na 16 izolata *Trichoderma* (Tabela 54), od kojih su 9 izolovani iz rizosfere, a 7 iz različitih tipova zemljišta. Odabrani su izolati koji pripadaju različitim vrstama da bi se sagledali koji od njih su najefikasniji za primenu u biokontroli.

Tabela 54. Izolati gljiva iz roda *Trichoderma* odabrani za *in vitro* ispitivanje antagonizma prema fitopatogenim gljivama

Rod	Vrsta	Broj izolata u SZMC kolekciji
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	SZMC 20994
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	SZMC20988
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	SZMC 20969
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	SZMC 20965
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	SZMC 20982
<i>Trichoderma</i>	<i>atroviride</i>	SZMC 20968
<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>	SZMC 20983
<i>Trichoderma</i>	<i>koningiopsis</i>	SZMC 20984
<i>Trichoderma</i>	<i>gamsii</i>	SZMC 20985
<i>Trichoderma</i>	<i>citrinoviride</i>	SZMC 20987
<i>Trichoderma</i>	<i>brevicompactum</i>	SZMC 22661
<i>Trichoderma</i>	<i>brevicompactum</i>	SZMC 22663
<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>	SZMC 22664
<i>Trichoderma</i>	<i>citrinoviride</i>	SZMC 22668
<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>	SZMC 22665
<i>Trichoderma</i>	<i>longibrachiatum</i>	SZMC 22669

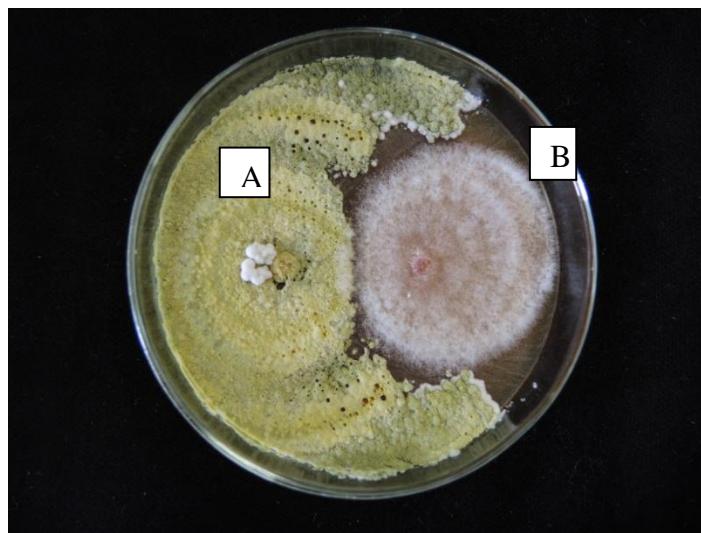
Kao antagonisti korišćene su fitopatogene gljive (Tabela 55), od kojih je 3 izolata pripadalo gljivama koje pripadaju taksonu *F. solani*, jedan izolat *A. alternata* i jedan izolat *P. cucurbitacearum*.



Tabela 55. Fitopatogeni korišćeni u *in vitro* testovima antagonizma

Rod	Vrsta	Broj izolaza u SZMC kolekciji
<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	SZMC 11057
<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	SZMC 11070
<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	SZMC 11063
<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	SZMC16085
<i>Phoma</i>	<i>cucurbitacearum</i>	SZMC16088

Antagonizam izolata izražen je preko Indeksa Biokontrole (BCI), koji je računat kao što je opisano u poglavlju Materijala i metoda. Vrednosti BCI kretale su se od 70.89% (izolat *T. citrinoviride* SZMC 22668 prema *F. solani* SZMC 11063 (Slika 9) do 100% izolat *T. atroviride* SZMC 20968 prema svim ispitanim fitopatogenima, kada je rast patogene gljive potpuno inhibiran prisustvom *Trichoderma*) (Tabela 56).



Slika 9. Primer *in vitro* testa za ispitivanje antagonizma na čvrstoj podlozi (A -*T. citrinoviride* SZMC 22668; B- *F. solani* SZMC 11063)

Tabela 56. Vrednosti indeksa biokontrole odabranih izolata gljiva

*Trichoderma*(1-16) prema fitopatogenima (a-e).

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (3 ponavljanja) ± standardna devijacija.

Izolati <i>Trichoderma</i> *	Izolati fitopatogena**				
	A	B	C	d	e
1	76.54 ± 1.50	76.01 ± 1.26	72.89 ± 5.26	100 ± 0.00	100 ± 0.00
2	73.34 ± 1.56	75.46 ± 4.08	79.56 ± 3.49	96.83 ± 1.57	100 ± 0.00
3	77.85 ± 2.56	73.37 ± 6.18	83.52 ± 7.31	100 ± 0.00	100 ± 0.00
4	92.60 ± 1.32	84.82 ± 0.00	98.29 ± 0.52	100 ± 0.00	100 ± 0.00
5	89.35 ± 2.04	87.73 ± 2.71	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
6	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
7	92.24 ± 3.27	92.13 ± 2.49	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
8	84.12 ± 5.19	93.16 ± 2.55	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
9	100 ± 0.00	82.02 ± 3.98	100 ± 0.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00
10	72.11 ± 0.54	82.54 ± 2.24	83.53 ± 2.12	100 ± 0.00	100 ± 0.00
11	83.72 ± 0.98	88.73 ± 10.69	79.02 ± 2.13	100 ± 0.00	96.74 ± 2.08
12	91.42 ± 9.01	82.13 ± 2.74	80.26 ± 4.31	100 ± 0.00	100 ± 0.00
13	90.02 ± 1.74	87.25 ± 1.38	90.48 ± 0.25	100 ± 0.00	94.02 ± 3.06
14	80.77 ± 0.94	80.78 ± 4.38	70.89 ± 1.89	93.54 ± 3.2	81.43 ± 4.88
15	91.27 ± 1.87	87.88 ± 1.73	88.08 ± 2.62	100 ± 0.00	92.21 ± 3.39
16	89.52 ± 1.17	84.01 ± 2.57	89.81 ± 2.79	100 ± 0.00	92.81 ± 2.13

\*1. THSC SZMC 20965; 2. THSC SZMC 20969; 3. THSCSZMC 20982; 4. THSC SZMC 20988; 5. THSC SZMC 20994; 6. *T. atroviride* SZMC 20968; 7. *T. koningiopsis* SZMC 20983; 8. *T. koningiopsis* SZMC 20984; 9. *T. gamsii* SZMC 20985; 10- *T. citrinoviride* SZMC 20987; 11. *T. brevicompactum* SZMC 22661; 12. *T. brevicompactum* SZMC 22663; 13. *T. longibrachiatum* SZMC 22664; 14. *T. citrinoviride* SZMC 22668; 15. *T. longibrachiatum* SZMC 22669; 16. *T. longibrachiatum* SZMC 22665; \*\*a. FSSC SZMC 11057; b. FSSC SZMC11070; c. FSSC SZMC 11063; d. *A. alternata*SZMC 16085; e. *P. cucurbitacearum*SZMC 16088

#### 4.7. *In vitro* ispitivanja otpornosti izolata gljiva *Trichoderma* na povećane koncentracije jona bakra i nikla

Izolati iz zemljišta (SZMC 22661, SZMC 22668, SZMC 22669, SZMC 22665) ispitani su na rast u prisustvu povećanih koncentracija bakra (II) i nikla (II). Pokazano je da između ispitivanih izolata postoji razlika u otpornosti na prisustvo oba metala.

Prisustvo jona bakra (II) u koncentracijama jednakim i većim od 0.5 mmol/l inhibira rast kolonija ispitivanih izolata, osim izolata *T. brevicompactum* (SZMC 22661). Ovaj izolat je najotporniji na prisustvo jona bakra (II). Utvrđeno je da bakar(II), u koncentracijama od 0.25, 0.5 i 0.75 mmol/l, ne inhibira već naprotiv stimuliše rast ovog izolata. Stepenn inhibicije rasta ispitanih izolata, pri koncentraciji od 1 mmol/l, kretao se od 8 - 79.7 (%) (Slika 10). Koncentracija bakar(II)-jona od 2 mmol/l i veće inhibirale su u potpunosti rast svih ispitivanih izolata (Tabela 57).

Tabela 57. Inhibicija rasta odabranih izolata gljiva *Trichoderma* u prisustvu različitih koncentracija bakar(II)-jona

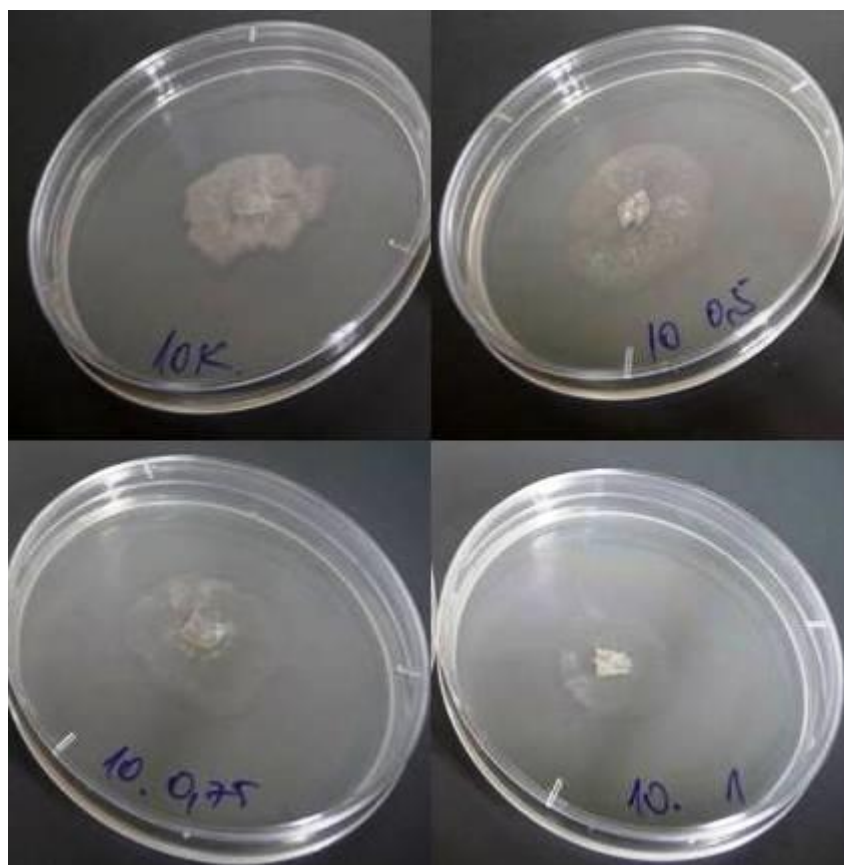
Izolat	Koncentracija bakar(II)-jona (mmol/l)				
	0.25	0.5	0.75	1	2
Inhibicija rasta (%)					
SZMC 22661	-24.1*	-10.9*	-2.3*	8.0	/
SZMC 22668	1.3	25.1	71.3	79.7	/
SZMC 22669	-16.9*	23.3	60.3	69.8	/
SZMC 22665	-1.7*	38.9	75.8	77.6	/

\*- prisustvo bakra stimulisalo je rast pojedinih izolata

Koncentracije nikla od 0.5 mmol/l nisu delovale inhibitorno na rast kolonija sva četiri testirana izolata u sva tri vremenska intervala (48, 96, 144 h) (Tabela 58). U slučaju tri izolata (SZMC 22668, SZMC 22669 i SZMC 22665) koncentracija od 0.5 mmol/l je delovala stimulatивно, a najviše u slučaju izolata SZMC 22668 (rast kolonija je povećan za 23,5 % u odnosu na kontrolu). Pri koncentraciji od 1 mmol/l, nikl(II)-jon je nakon 48h ispoljio slabu inhibiciju rasta kolonija sva četiri izolata, dok posle 96h i 144h rast kolonija nije bio inhibiran. Stepenn inhibicije rasta pri koncentraciji od 2 mmol/l je bio najniži u slučaju izolata *T. brevicompactum*, gde su nakon 144h kolonije izrasle kao kod kontrole. Ista koncentracija je bila skoro potpuno inhibitorna u slučaju izolata *T. citrinoviride*. Koncentracija od 4 mmol/l je bila potpuno inhibitorna u slučaju svih testiranih izolata (Tabela 58).

Tabela 58. Inhibicija rasta (%) odabranih izolovanih izolata gljiva *Trichoderma* u prisustvu različitih koncentracija nikl(II)-jona

Koncentracija nikla(II) (mmol/l)	Vreme	SZMC 22661	SZMC 22668	SZMC 22669	SZMC 22665
		<i>T.brevicompactum</i>	<i>T.citrinoviride</i>	<i>T.longibrachiatum</i>	<i>T.longibrachiatum</i>
Inhibicija rasta (%)					
0.5	48h	0	-23.5	-3	-4.4
	96h	0	0	0	0
	144h	0	0	0	0
1	48h	2,7	1,8	5,6	8,3
	96h	0	0	0	0
	144h	0	0	0	0
2	48h	58,8	94,1	78,5	75
	96h	11,76	86,47	32,19	26,32
	144h	0	85,88	3,43	14,47
4	48h	92,2	100	100	100
	96h	100	100	100	100
	144h	100	100	100	100



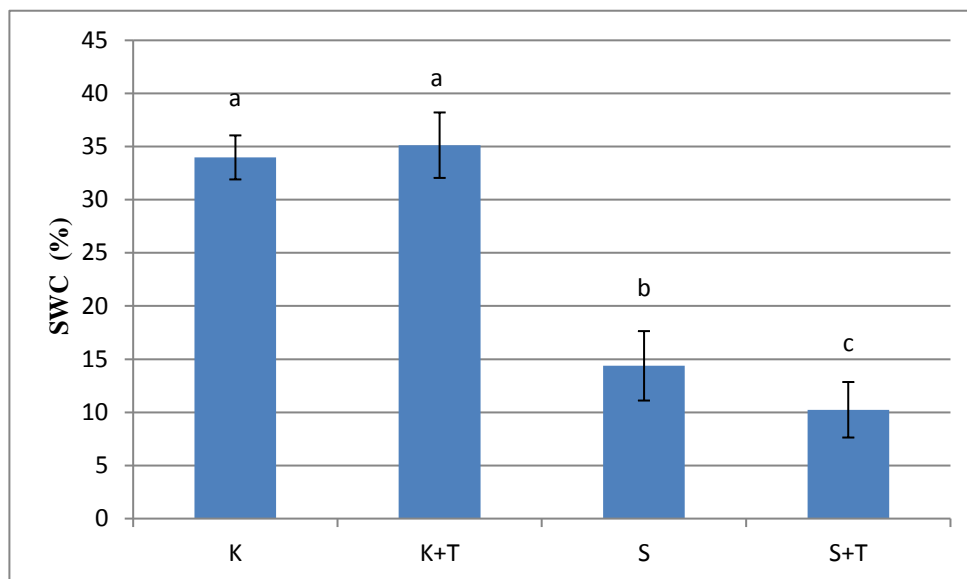
Slika 10. Prikaz rasta izolata *T. brevicompactum* SZMC 22661 u prisustvu različitih koncentracija Cu(II)-jona (0,5; 0,75 i 1 mmol/l)

#### **4.8. Efekti biotskog (dodatak *T. brevicompactum* SZMC 22661) i abiotskog (suše) stresa na biljke paradajza**

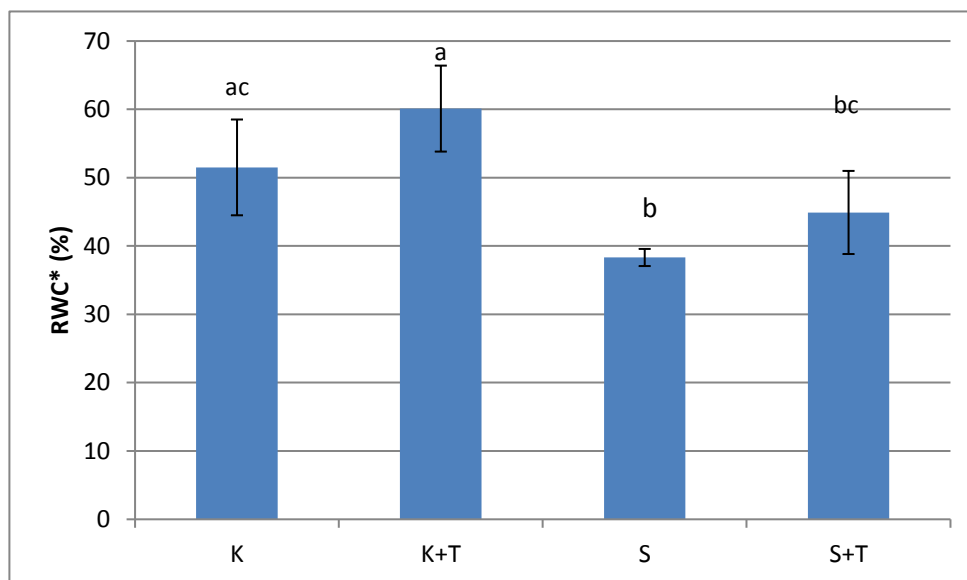
Kao što je napomenuto u uvodnom delu, postoje vrste gljiva iz roda *Trichoderma* koje pokazuju negativne efekte na biljke i smatraju se fitotoksičnim. Jedna od tih vrsta je i *T. brevicompactum* koja je, pored *T. harzianum*, izolovana kao jedna od najzastupljenijih vrsta u poljoprivrednim zemljištima, što se vidi iz Tabele 51. Prisustvo ove vrste u rizosferi biljaka ima i pozitivno dejstvo kao biokontrolni agens, međutim efekti na samu biljku nisu dovoljno ispitani (Shentu i sar., 2014; Kumari i sar., 2016). Pored biotskog stresa, izazvanog napadom patogenih organizama, biljke su izložene i različitim abiotskim stresovima, među kojima je suša jedan od najprisutnijih.

Kako se u životnoj sredini prepliću različiti abiotski i biotski stresovi, u ovom radu ispitano je delovanje *T. brevicompactum* kao biotskog, i suše kao abiotskog stresa na paradajz. Delovanje svakog stresa pojedinačno, kao i njihovo zajedničko delovanje, praćeno je merenjem parametara vodnog režima, određivanjem sadržaja pigmenata u listu paradajza, određivanjem sadržaja ABA i ispitivanjem ekspresija gena u listu i korenu biljke.

Sadržaj vode u zemljištu, kada su biljke optimalno zalivane, iznosio je  $\approx 35\%$  (K; K+T; Slika 11). Kod biljaka u tretmanu suše prekinuto je zalivanje dok sadržaj vode u zemljištu nije opao na  $10\%$  (S; S+T; Slika 11). Pod uticajem vodnog deficita došlo je do značajnog smanjenja sadržaja vode u listovima paradajza u poređenju sa kontrolom (Slika 12). U uslovima dobre snabdevenosti vodom, biljke koje su rasle u prisustvu izolata *Trichoderma* su imale veći relativni sadržaj vode u listovima u odnosu na kontrolu, ali razlika nije bila statistički značajna. U uslovima suše, RWC vrednosti (ispod  $40\%$ ) su bile statistički značajno niže u odnosu na tretman optimalnog zalivanja, ali je za uticaj dodatka *Trichoderma* u ovom tretmanu primećen isti trend kao i kod uslova dobre snabdevenosti biljaka vodom.

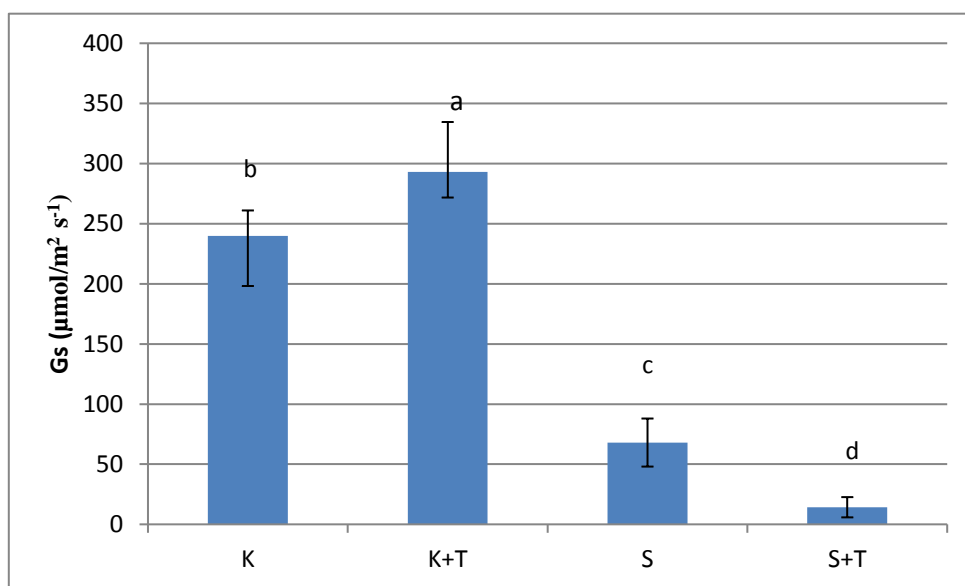


Slika 11. Sadržaj vode u zemljištu (SWC) pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S), optimalno zalivanje uz dodatak izolata *Trichoderma* (K+T) i suša uz dodatak izolata *Trichoderma* (S+T). Vrednosti koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).



Slika 12. Relativni sadržaj vode (RWC) u listovima paradajza, pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S), optimalno zalivanje uz dodatak izolata *Trichoderma* (K + T) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S+T). Vrednosti koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

Provodljivost stoma ( $G_s$ ) je bila statistički značajno ( $P < 0,05$ ) veća kod biljaka koje su bile optimalno zalivane u odnosu na biljke izložene suši (Slika 13). Uticaj izolata *Trichoderma* na provodljivost stoma zavisio je od snabdevenosti biljaka vodom. U uslovima optimalnog zalivanja  $G_s$  je bila veća u prisustvu gljive u odnosu na  $G_s$  biljaka koje su rasle bez njenog dodatka. Suprotno tome, u uslovima suše u prisustvu *Trichoderma* provodljivost stoma bila je manja nego kod biljaka koje su rasle bez njenog dodatka (Slika 13). Ovi rezultati ukazuju da je u uslovima suše bolji vodni status biljaka koje su rasle u prisustvu izolata *Trichoderma* povezan sa manjom provodljivošću stoma, odnosno sa zatvaranjem stoma. Za ovaj parametar utvrđena je značajna statistička razlika među primenjenim tretmanima.

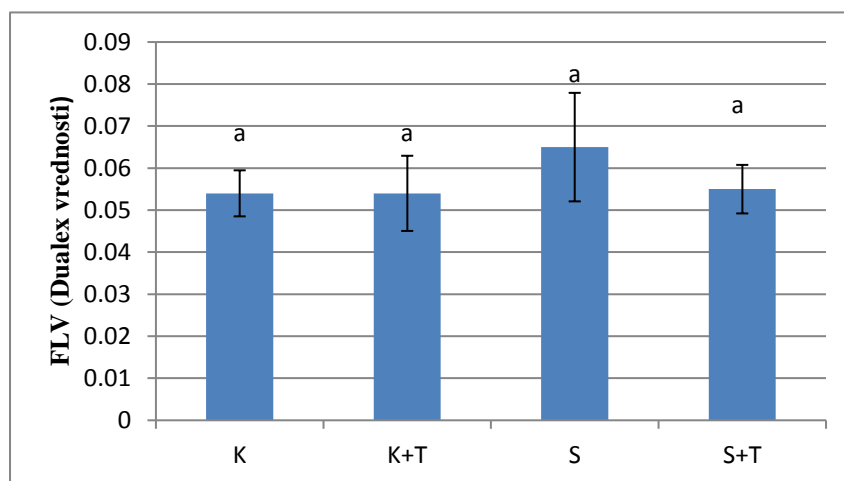


Slika 13. Provodljivost stoma ( $G_s$ ) pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S), optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K+T) i suša i prisustvo *Trichoderma* (S+T). Vrednosti koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

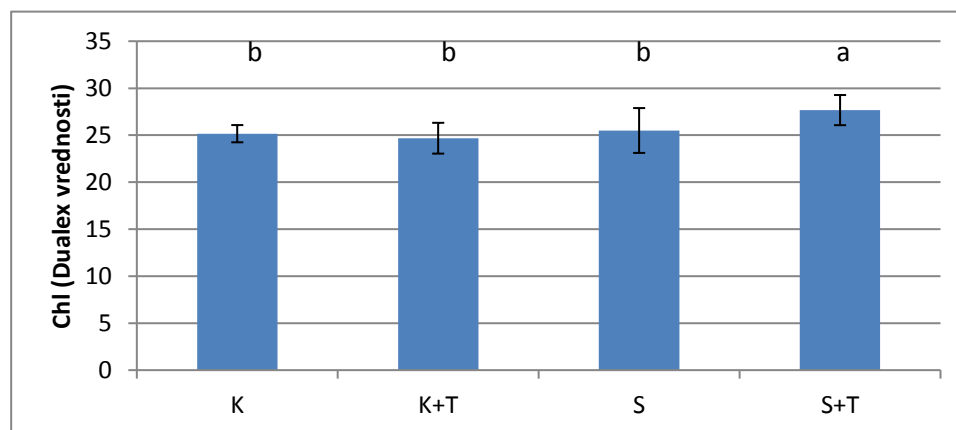
Na istim biljkama praćen je sadržaj epidermalnih flavonola i ukupnog hlorofila *in vivo*. Sadržaj flavonola se kretao ispod 0.09 relativnih jedinica, kao što je utvrđeno i kod biljaka koje se gaje u polukontrolisanim uslovima pri niskom intenzitetu svetlosti (Morales i sar., 2010). Ni suša, niti dodatak izolata *Trichoderma* nije imao značajnog efekta na epidermalne flavonole u turgidnim listovima (Slika 14). Međutim, povećanje sadržaja hlorofila kod



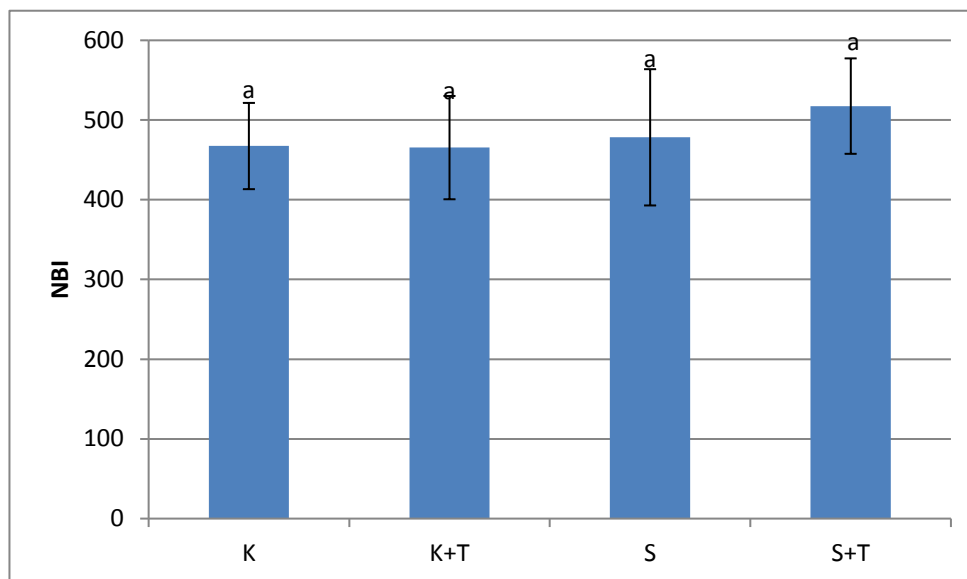
biljaka koje su gajene u prisustvu *Trichoderma* u uslovima suše (Slika 15), bilo je statistički značajno ( $P < 0,05$ ) u odnosu na biljke koje su rasle bez prisustva gljive. NBI indeks (izračunat iz odnosa sadržaja Chl/Flav) se nije značajno menjao u ispitivanim tretmanima (Slika 16).



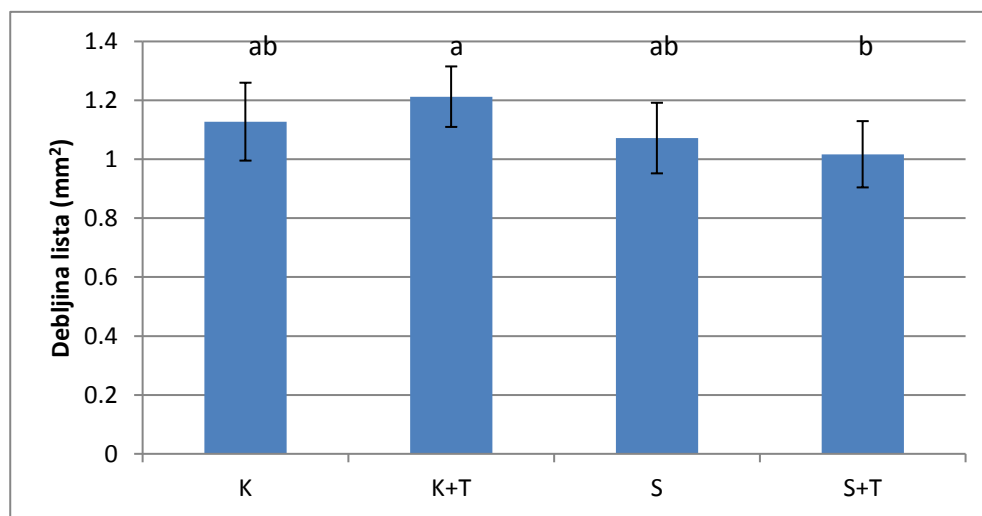
Slika 14. Sadržaj flavonola pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S); optimalno zalivanje uz dodatak izolata *Trichoderma* (K + T); suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T). Vrednosti koje su označene sa istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).



Slika 15. Sadržaj hlorofila pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S), optimalno zalivanje uz dodatak suspenzije gljive (K + T) i suša sa dodatkom suspenzije gljive (S + T). Vrednosti koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).



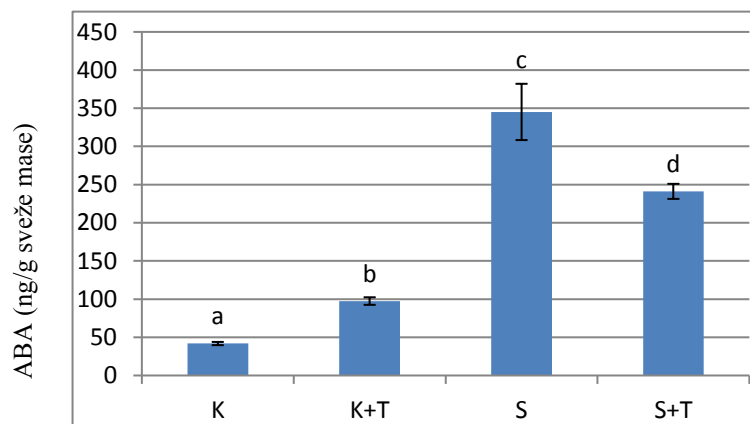
Slika 16. NBI indeks pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S), optimalno zalivanje uz dodatak suspenzije gljive (K + T) i suša uz dodatak suspenzije gljive (S + T). Vrednosti koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).



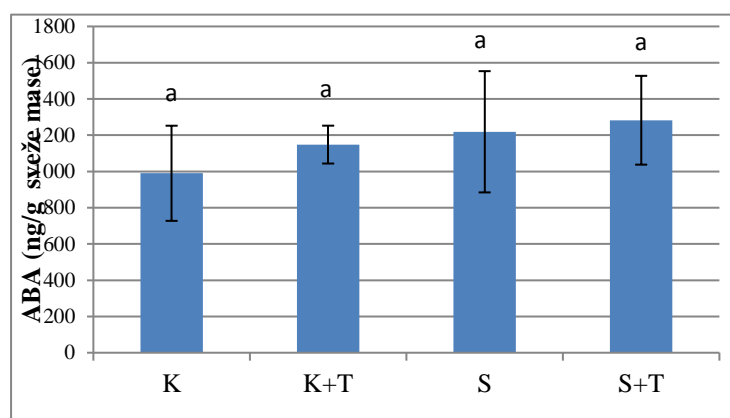
Slika 17. Debljina lista paradajza pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (K) i suša (S), optimalno zalivanje uz dodatak suspenzije gljive (K + T) i suša uz dodatak suspenzije gljive (S + T). Vrednosti koje su označene istim malim slovom nisu statistički značajno različite,  $P < 0,05$  (ANOVA analiza, Duncan-ov test).

Prema podacima dobijenim za debljinu lista može se primetiti da između biljaka koje su rasle u prisustvu izolata *Trichoderma* u kontrolnim i u uslovima suše postoje statistički značajne razlike. Međutim, dodatak *Trichoderma* kod biljaka koje su bile u tretmanu optimalnog zalivanja nije značajno uticao na porast debljine lista u odnosu na kontrolu, što je bio slučaj i kod biljaka koje su rasle u uslovima vodnog deficita (Slika 17).

Sadržaj ABA u korenu se značajno menjao pod dejstvom ispitivanih tretmana. Dodatak gljive je povećao sadržaj ABA kod biljaka koje nisu bile izložene vodnom deficitu za više od 100%. U korenu biljaka koje su bile u tretmanu suše došlo je do značajnog povećanja sadržaja ABA, dok je dodatak gljive uticao na smanjenje (Slika 18). Nasuprot tome sadržaj ABA u listu se nije značajno menjao u ispitivanim tretmanima (Slika 19).



Slika 18. Relativni sadržaj ABA u korenu paradajza



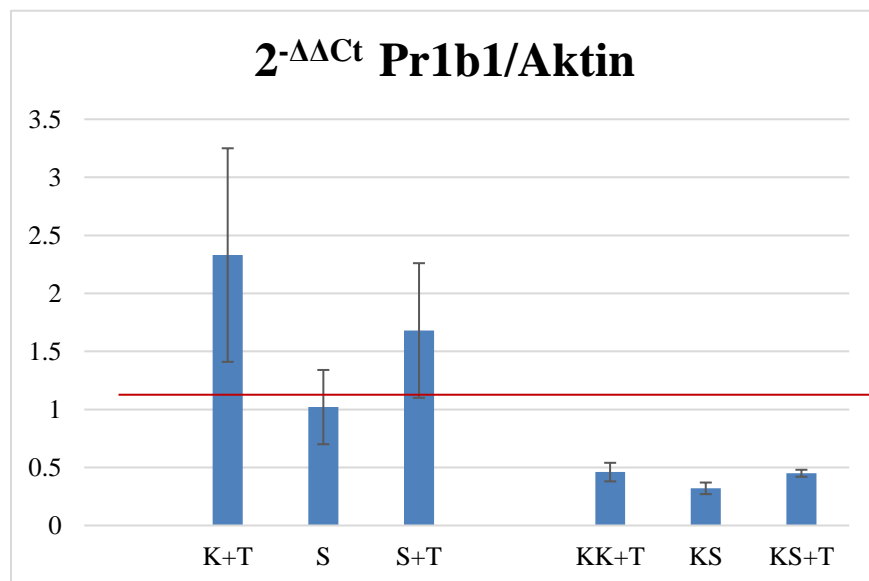
Slika 19. Relativni sadržaj ABA u listu paradajza

#### **4.9. Ekspresija gena u listu i korenu paradajza, kao odgovor na sušu i dodatak suspenzije gljive**

Ekspresija 6 gena je ispitana u listu i korenu metodom RT-PCR (Tabela 4). Kako bi se ispitalo da li odgovor biljaka paradajza na dodatak gljiva roda *Trichoderma* uključuje aktivaciju gena otpornosti (defence-related gena), analizirani su markeri signalnih puteva salicilne (PR1b1 i PrP2) i jasmonske (PinII i TomLoxA) kiseline, a kao odgovor na izloženost biljaka suši ispitan je marker gen za sintezu ABA, NCED1. Osmotin-like1 genje korišten kao marker gen za odgovor biljke na stres izazvan i abiotiskim i biotskim faktorom.

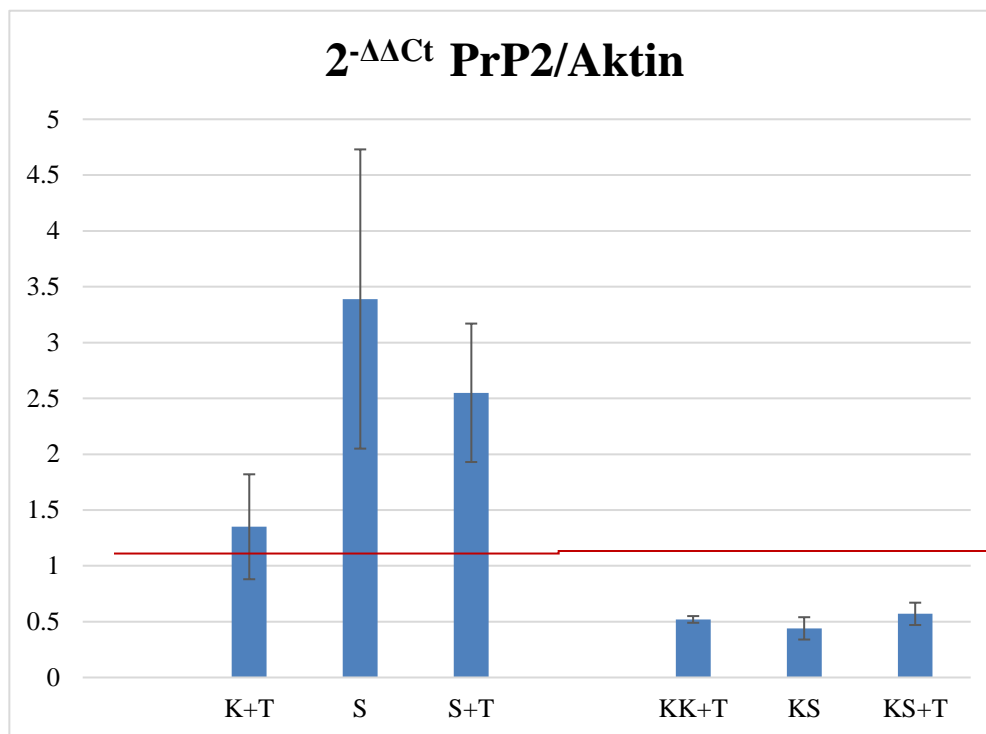
Relativne ekspresije gena su na graficima prikazane kao  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Kod uzoraka lista detektovana je povećana ekspresija PR1b1 gena u uslovima kada je dodata *Trichoderma*, i kod biljaka koje su gajene u optimalnim uslovima zalivanja i kod biljaka koje su rasle u uslovima suše (Slika 20). Ekspresija ovog gena u listu se nije menjala u uslovima suše. U uzorcima korena paradajza došlo je do smanjene ekspresije PR1b1 gena u svim ispitanim uslovima, pri čemu je suša imala veći inhibitoryni efekat od gljive.



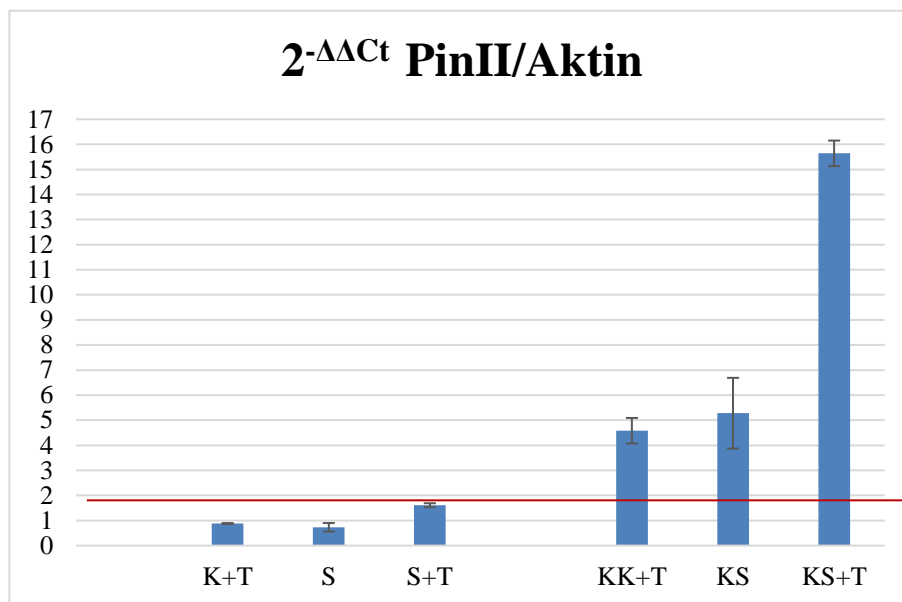
Slika 20. Ekspresija PR1b1 gena (izražena kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrednost) pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T) u listu i u korenu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (KK + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (KS + T). Vrednosti, dobijene iz tri nezavisna merenja, prikazane su kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.

Ekspresija PrP2 gena u uzorcima lista bila je povećana je pri svim ispitanim uslovima, s tim što je najveća stimulacija ekspresije bila u uslovima gde su biljke bile pod uticajem suše kao stresnog faktora (Slika 21A). Dodatak gljive *Trichoderma* u uslovima suše izazvao je smanjenu ekspresiju ovog gena u odnosu na samu sušu. U uzorcima korena nađena je smanjena ekspresija PrP2 gena u svim ispitanim uslovima (Slika 21B).

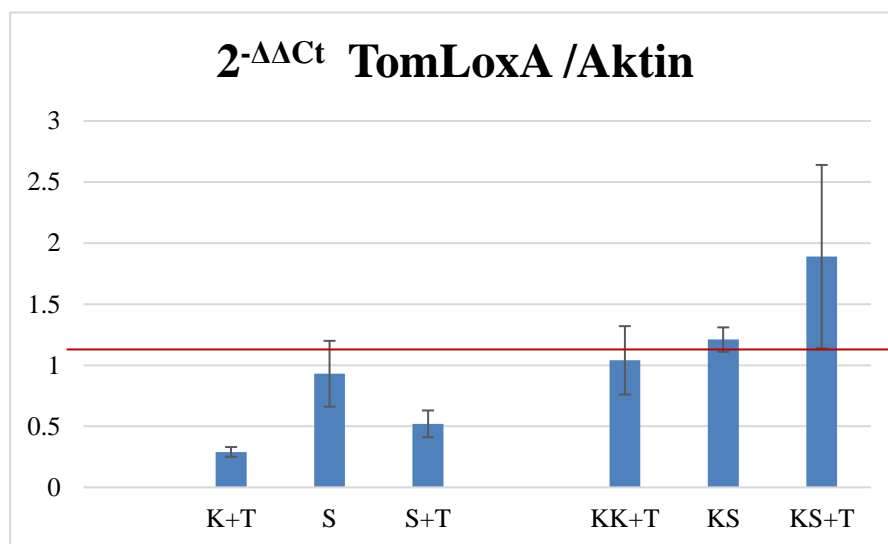


Slika 21. Ekspresija PrP2 gena, izražena kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrednost, pri različitim tretmanima. A. u listu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T) i B. u korenu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (KK + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (KS + T). Vrednosti, dobijene iz tri nezavisna merenja, prikazane su kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.

Kod uzoraka lista detektovana je povećana ekspresija PinII gena samo u uslovima gde je biljka bila izložena i vodnom deficitu i dodatku gljive (Slika 22A). U uzorcima korena došlo je do povećane ekspresije PinII gena u svim ispitanim uslovima, posebno u uslovima gde je biljka bila izložena i jednom i drugom stresu (Slika 22B).



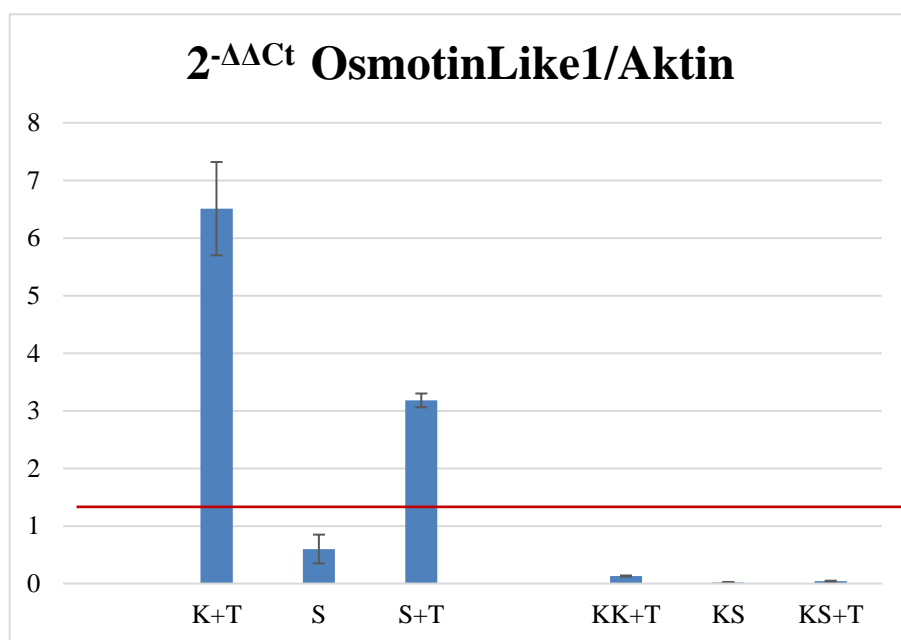
Slika 22. Ekspresija PinII gena, izražena kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrednost, pri različitim tretmanima. A. u listu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T) i B. u korenu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (KK + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (KS + T). Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.



Slika 23. Ekspresija TomLoxA gena, izražena kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrednost, pri različitim tretmanima: A. u listu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T) i B. u korenu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (KK + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (KS + T). Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.

U uzorcima lista je detektovana smanjena ekspresija TomLox gena u svim ispitanim uslovima, u odnosu na referentni gen (Slika 23A). Kod korena došlo je do povećane ekspresije ovog gena u slučaju suše kao stresnog faktora, a naročito u slučaju prisustva oba faktora (Slika 23B). Ekspresija ovog gena kod korena u slučaju optimalnog zalivanja uz dodatak gljive se nije značajno razlikovala od kontrole.

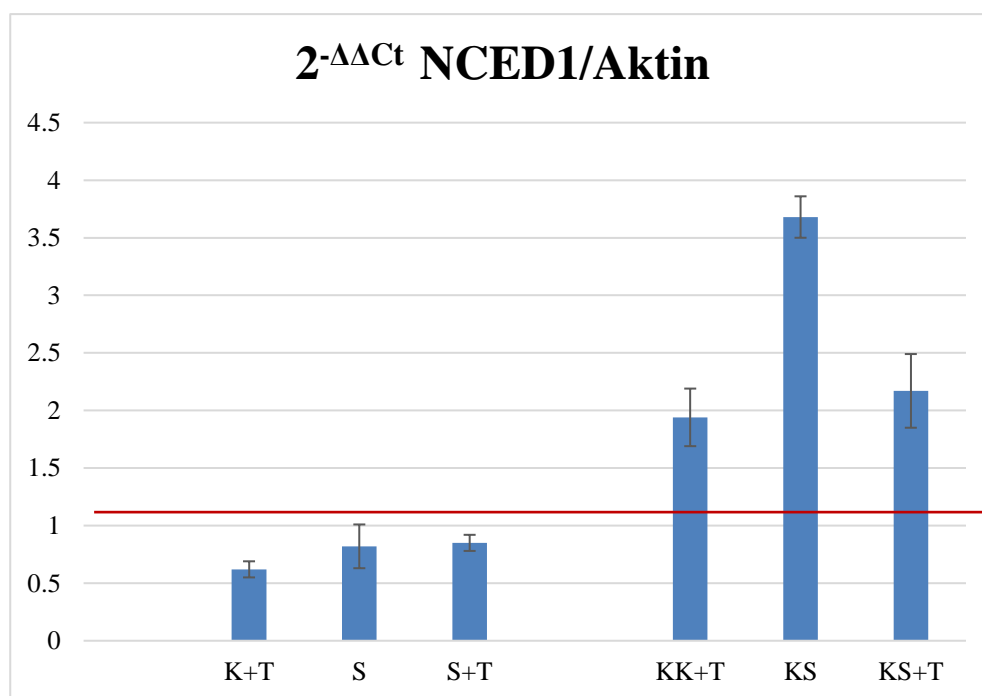
Ekspresija OsmotinLike1 gena u uzorcima lista bila je značajno viša u prisustvu *Trichoderma* (Slika 24). Stimulacija ekspresije je bila dvostruko veća u slučaju optimalnog zalivanja, nego u suši. Suprotno, u uzorcima korena ekspresija OsmotinLike1 gena bila je smanjena u svim primenjenim uslovima.



Slika 24. Ekspresija OsmotinLike1 gena, izražena kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrednost, pri različitim tretmanima, u listu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T), i u korenu: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (KK + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (KS + T). Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.



Kod uzoraka korena određena je veće ekspresija NCED1 gena u svim tretmanima, a najveća ekspresija je utvrđena u tretmanu sa uvedenom sušom. Sa druge strane, ekspresija ovog gena u uzorcima lista bila je manja, u svim ispitanim uslovima, u odnosu na referentni gen (Slika 25).



Slika 25. Ekspresija NCED1 gena, izražena kao  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  vrednost, pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje uz dodatak *Trichoderma* (K + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (S + T) u listu, i u korenu: optimalno zalivane uz dodatak *Trichoderma* (KK + T), suša (S) i suša u prisustvu *Trichoderma* (KS + T). Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna merenja i prikazane kao srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije.

## 5. DISKUSIJA

Novi pristup u identifikaciji vrsta gljiva iz roda *Trichoderma* donele su savremene molekularne metode njihove karakterizacije. Primenom ovih metoda ispitana je varijabilnost gljiva iz roda *Trichoderma* u velikom broju različitih ekosistema i klimatskih uslova: plavnih šuma srednje Evrope (Wuczowski i sar., 2003), doline Dunava (Fiedl i Druzhinina, 2012), zemljištu Mediterana (Migheli, 2009), zemljištima Rusije, Indije i Nepala (Kullnig i sar., 2000), Poljske (Blaszczyk i sar., 2011), jugoistočne Azije (Kubicek i sar., 2003), Kine (Sun i sar., 2012), Afrike (Sadfi-Zouaoui i sar., 2009), Južne Amerike (Hoyos-Carvajal i sar., 2009). U ovim radovima objavljen je veliki broj novih vrsta koje pripadaju rodu *Trichoderma*. Poslednjih godina sve veća pažnja posvećuje se i identifikaciji vrsta izolovanih iz rizosfere poljoprivrednih zemljišta (Sadfi-Zouaoui i sar., 2009; Naeimi i sar., 2011; Kormoczi i sar., 2013). U cilju ispitivanja varijabilnosti gljiva iz roda *Trichoderma* u Srbiji u ovom radu gljive su izolovane iz različitih tipova zemljišta i iz rizosfere povrtarskih i ratarskih kultura, kao i nekih korova. Tipovi zemljišta odabrani su prema zastupljenosti na teritoriji Vojvodine (rendzina, sirozem na lesu, ritska crnica, fluvisol, ranker, gajnjača i černoziem) i od ukupno 19 uzoraka zemljišta, a iz svakog tipa, izolovano je 15 izolata koji su pripadali vrstama: *T. koningiopsis*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. gamsii*, *T. citrinoviride*, *T. virens/Hypocrea virens* i *T. longibrachiatum*.

Iz rizosfere različitih povrtarskih kultura na četiri lokacije: Svilajnac (njiva i bašta), Čenej i Crepaja, izolovano je 26 izolata koji pripaju vrstama: *T. koningiopsis*, *T. koningi*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. gamsii*, *T. citrinoviride*, *T. virens/Hypocrea virens*.

Ukupno je izolovan 41 izolat, odnosno 9 različitih vrsta. U uzorcima iz rizosfere nije izolovan ni jedan izolat koji je pripadao vrsti *T. longibrachiatum*, dok u uzorcima zemljišta ni jedan izolat nije identifikovan kao *T. koningi*.

Najzastupljenija vrsta bila je *T. harzianum* (13/41), zatim *T. brevicompactum* (8/41) i *T. koningiopsis* (6/41). Najzastupljenija vrsta *T. harzianum* (Tabela 50; Slika 20), se najviše

koristi u biokontroli patogenih gljiva u poljoprivredi (Harman i sar., 2004). Izolati ove vrste izolovani su najviše iz zemljišta koja su korišćena za poljoprivrednu proizvodnju. Zatim, još jedna korisna vrsta, *T. virens*, je izolovana iz tri tipa zemljišta (gajnjača, černo zem i smonica), za koju je dokazano da je najčešće korišćena vrsta za pripremu preparata za biokontrolu (Benítez i sar., 2004). *T. atroviride*, koja se takođe često pominje u svrhe biokontrole, izolovana je iz dva tipa poljoprivrednog zemljišta (rendzina i smonica). *T. koningiopsis* je pretežno bila izolovana iz zemljišta vinograda. *T. longibrachiatum*, vrsta poznata kao oportunistički patogen kod pacijenata sa imunodeficijencijom (Hatvani i sar. 2013) izolovana je iz šumskog zemljišta i to u 3 od ukupno 10 tipova zemljišta. *T. brevicompactum*, vrsta poznata po proizvodnji supstance trihodermin (snažan antifungalni antibiotik i inhibitor sinteze proteina u ćelijama sisara, Degenkolb i sar., 2008), izolovana je u dva tipa zemljišta.

### **5.1. Uticaj fizičko-hemijskih i mikrobioloških karakteristika zemljišta na varijabilnost gljiva roda *Trichoderma***

Vrste gljiva roda *Trichoderma*, kao dobri antagonisti biljnih patogena su najviše ispitivane jer su kosmopolitske vrste koje se mogu izolovati iz različitih vrsta zemljišta (Gams i Bisset, 1998). Poznavanje efekata faktora životne sredine na preživljavanje i rast gljiva roda *Trichoderma* je od velike važnosti za njihovo proučavanje i upotrebu u različitim granama biotehnologije. Uticaj ovih efekata na rast gljiva roda *Trichoderma* je često ispitivan u *in vitro* uslovima (Antal i sar., 2000; Kredics i sar., 2003a; Longa i sar., 2009). Za praćenje ponašanja vrsta iz roda *Trichoderma* u slučaju promene prirodnih uslova razvijeni su različiti matematički modeli koji se zasnivaju na kombinovanju faktora životne sredine ispitanih u *in vitro* uslovima (Begoude i sar., 2007; Schubert i sar., 2009). Među najvažnijim faktorima koji utiču na prisustvo gljiva roda *Trichoderma* u zemljištu su izdvajaju se: dostupnost vode, temperatura, pH i sastav zemljišnog supstata (primarno dostupnost hranjivih supstanci). Kredics i sar. (2000) su odredili skoro linearnu korelaciju između vodnog potencijala i rasta kolonija *T. harzianum*. Schubert i sar. (2009) su pokazali

da je *T. atroviride* osetljivija na smanjen vodni status nego na temperaturu i sadržaj hranjivih supstanci. Slične rezultate za istu vrstu izolovanu iz trulog drveta dokazali su Longa i sar. (2008). Međutim, rezultati o povezanosti rasta i mogućnosti izolovanja vrsta iz roda *Trichoderma* vrste i karakteristike tipa zemljišta su malobrojne (Muniappan i Muthukumar, 2014). Rezultati koje su objavili Muniappan i Muthukumar (2014) ukazuju da su populacije gljiva u zemljištu koje su oni ispitivali u stanju ravnoteže i da na njih edafski faktori nemaju veći uticaj. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da je dostupnost vode važan faktor za varijabilnost gljiva iz roda *Trichoderma*. Najveći retencioni vodni kapacitet izmeren je u zemljištu tipa Smonica (33,76 % vol.), uzorkovanom iz bašte gde su gajene različite povrtarske kulture (Tabela 2, Tabela 50). Iz ovog tipa zemljišta, izolovan je najveći broj različitih vrsta- identifikovano je 6 od ukupno 9 vrsta (14 od ukupno 41-nog izolata) (Tabela 50; Slika 19). Kredics i sar. (2004) ističu da je za primenu gljiva roda *Trichoderma* u biokontroli važan faktor kiselost zemljišta. *In vitro* testom na agaru sa ekstraktom kvasca (YEM) utvrdili su da je za rast micelija gljiva roda *Trichoderma* optimalna pH vrednost 4. Na osnovu *in vitro* testova može se pretpostaviti da je kisela reakcija zemljišta pogodnija za rast gljiva iz ovog roda. Prema našim saznanjima, nema rezultata o uticaju pH vrednosti zemljišta na varijabilnost gljivau literaturi. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su gljive roda *Trichoderma* uspešno izolovane iz zemljišta različite kiselosti, u kojima je pH (u H<sub>2</sub>O) vrednost varirala od 5.26 do 8.3. Čak 37 izolata, koji su identifikovani u okviru 9 različitih vrsta je izolovano iz zemljišta čija je pH vrednost bila veća od 7.2. Prema tome, ovi rezultati ukazuju da su i slabo alkalna zemljišta pogodna za opstanak gljiva iz roda *Trichoderma*.

Longa i sar. (2008) su ispitivali preživljavanje gljiva *Trichoderma* u tri različita tipa zemljišta i pokazali da *T. atroviride* bolje opstaje u zemljištima gde su povećani sadržaji organskih supstanci materije, azota, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i K<sub>2</sub>O. Anita i Ponmurugan (2011) su pokazali da gustina populacija *Trichoderma* u uzorcima zemljišta sa različitih lokaliteta je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem kalijuma (r=0.910), fosfora (r= 0.686) i azota (r=0.602). Naši rezultati, takođe ukazuju da je povećan sadržaj fosfora povezan sa većom varijabilnošću vrsta, posebno u slučaju zemljišta tipa Smonica, uzorkovanom iz bašte u fazi punog rasta različitih povrtarskih kultura. Povećan sadržaj fosfora određen je i u zemljištu

tipa ritska crnica, gde je identifikovana samo jedna vrsta. Uzorkovanje na ovom lokalitetu rađeno je nakon uklanjanja useva, pa je izolacija rađena direktno iz zemljišta, a ne iz rizosfere uzoraka. Ovi rezultati ukazuju na značaj rizosfere kao faktora veće varijabilnosti gljiva roda *Trichoderma*. Kormoczi i sar. (2013) su takođe pokazali da je prisustvo ovih gljiva najveće u rizosferi povrtarskih kultura.

Od ispitanih fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta, pozitivan uticaj na varijabilnost gljiva roda *Trichoderma* pokazala su zemljišta sa slabo alkalnom reakcijom, dostupnost vode, kao i povećane vrednosti sadržaja kalijuma i fosfora. Ovo potvrđuju i vrednosti korelacionih koeficijenata ( $R^2$ ), koje ukazuju na kvalitet neparametrijskog regresionog modela koji uključuje vezu između edafskih parametara i izolovanog broja izolata gljiva roda *Trichoderma* spp. Visoke  $R^2$  vrednosti dobijene su pri korelaciji broja izolata i vrednosti sadržaja lako-dostupnog K i P, kao i vrednosti pH zemljišta.

Iako se vrste roda *Trichoderma* smatraju veoma agresivnim kolonizatorima, ipak one moraju da se bore za prostor i nutrijente sa drugim mikroorganizmima, koji mogu da im ograniče dostupnost supstrata. Mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u metaboličkoj aktivnosti zemljišta, jer učestvuju u obnavljanju esencijalnih hranjivih supstanci, kontroli biljnih patogena, održavanju strukture i plodnosti zemljišta kao i detoksifikaciji zemljišta od štetnih supstanci (Giller i sar., 1998). Distribucija mikroorganizama u zemljištu zavisi od raznih biotičkih i abiotičkih faktora (Jarak i sar., 1998). Brojnost i enzimska aktivnost mikroorganizama u uzorcima ispitanim u ovoj tezi zavisili su prvenstveno od tipa zemljišta i dubine uzorkovanja, ali i od prisustva teških metala.

Marinković i sar. (2012) ispitali su rasprostranjenost različitih grupa mikroorganizama u zemljištima na teritoriji Vojvodine ipokazali da su sve grupe mikroorganizama (ukupan broj mikroorganizama, azotobakter, oligonitrofil, aktinomicete i gljive) detektovane na svim ispitanim lokalitetima, međutim njihova brojnost je bila neujednačena i zavisila je od tipa zemljišta. U uzorcima zemljišta, obuhvaćenim u ovom istraživanju, u uzorcima 12 i 13 nije određeno prisustvo azotobaktera. Ovaj rezultat je očekivan, jer je poznato da su vrste roda *Azotobacter* veoma osetljive na kiselu reakciju zemljišta, koja je utvrđena u uzorcima 12 i 13 (pH vrednost između 5 i 6). Poznato je da kisela reakcija zemljišta pogoduje rastu gljiva, pa je u uzorku 22 određeno najveće prisustvo ukupnog broja gljiva. Aktinomicete su

pretežno zastupljene u alkalnim zemljištima (Plaster, 2013), što je i dokazano u ovom istraživanju. Naime, njihov broj je bio najveći u uzorcima zemljišta 9 i 10, koji su imali najveću alkalnu reakciju (pH vrednost između 8 i 9). Ukupan broj mikroorganizama u ispitivanim uzorcima zemljišta kretao se od  $74 \times 10^5$  u fluvisolu (uzorak 10) do  $4.53 \times 10^7$  u černozeu (uzorak 20), što ukazuje na značajnu biogenost svih ispitivanih uzorka. Velika brojnost mikroorganizama i diverzitet u ispitivanim uzorcima zemljišta, doprinosi stvaranju i održavanju stabilnosti ekosistema (Garbeva i sar., 2004). Broj oligonitrofila bio je namanje zastupljen u uzorcima zemljišta tipa gajnjača, a najzastupljeniji su bili u uzorcima zemljišta tipa černozeu. Oligonitrofilima, kao slobodnim azotofiksatorima, odgovara prisustvo razgradivih ugljenih hidrata, koji su u ispitivanim uzorcima najverovatnije dospeli dodavanjem stajnjaka. Brojnost amonifikatora bila je visoka u ispitivanim uzorcima, i u većini slučajeva opadala je sa dubinom uzorkovanja (Tabela 50).

Treba imati u vidu da je ogromnu raznolikost mikrobnih populacija u zemljištu teško proučavati i zbog nedostataka i ograničenja u metodama agarnih ploča. Naime, 99-99,9 % mikrobnih populacija se ne može, ili se veoma teško, gajiti na hranljivim podlogama (Torsvik i Ovreas, 2002), a razlozi izostanka rasta mikroorganizama na hranljivim medijumima mogu biti i niska stopa rasta ili spor rast (Vartoukian i sar., 2010).

Prema rezultatima mikrobiološkog ispitivanja različitih tipova zemljišta u ovom istraživanju pokazano je da su dominantne bakterije koje mogu da ograniče rast gljiva (Tabela 50). Iako je njihova zastupljenost bila najvećau zemljištima tipa Smonica i Černozeu, upravo u ovim tipovima zemljišta dokazana je i najveća brojnost gljiva iz roda *Trichoderma* (Slika 19). Shodno tome, može se zaključiti da mikrobiološke karakteristike ispitivanih tipova zemljišta nisu značajno uticale na varijabilnost gljiva iz roda *Trichoderma* (Tabela 50 i 51).

## 5.2. Sadržaj metala u zemljištu i otpornost odabranih izolata na povećane koncentracije odabranih teških metala

Pored primene kao antagonista biljnih potogena neki izolati gljiva roda *Trichoderma* primenjuju se u bioremedijaciji zemljišta zagađenih teškim metalima (Tripathi i sar., 2013). Prirodnim i veštačkim izvorima zagađenja teški metali sve više dospevaju u životnu sredinu. Iako su neki od njih, kao bakar, cink, gvožđe, mangan, esencijalni mikro-nutrijenti živih organizama, u povećanim koncentracijama mogu da postanu toksični. Bez obzira na izbor remedijacione tehnike oni ne mogu da se uklone, nego samo da se prevedu u manje toksične oblike.

Ispitivanja zagađenja zemljišta povećanim koncentracijama metala u Srbiji nije detaljno ispitivano. Milenkovic i sar. (2015) su ispitivali distribuciju teških metala na lokalitetima oko Kragujevca i pokazali da srednje vrednosti sadržaja Cr ( $109.25 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i Ni ( $120.12 \text{ mg kg}^{-1}$ ) prelaze dozvoljene vrednosti predviđene Holandskim standardom za vrednosti sadržaja ova dva metala u zemljištu ( $100$  i  $35 \text{ mg kg}^{-1}$ , respektivno) (VROM, 2000). Naši rezultati pokazali su da sadržaj hroma i nikla (Cr:  $718 \text{ mg kg}^{-1}$  i Ni:  $1587 \text{ mg kg}^{-1}$ ) u uzorku zemljišta sa Zmajevca značajno prevazilazi ove standarde. Mesto uzorkovanja na Zmajevcu, smešteno je na planini Fruška gora. Radi se o serpentinitnom zemljište koje leži na ultramafitnim stenama (Kostić i sar. 1998). Prilikom procedure uzorkovanja i mi smo naišli na dominantnu stenu na dubini od 20cm. Poznato je da serpentinitna zemljišta imaju prirodno povećane koncentracije nikla i hroma (Bonifacio i sar. 2010). Među različitim tipovima ovog zemljišta, Ranker se ističe sa značajno visokim koncentracijama ova dva metala (Mrvić i sar. 2014). I drugi autori potvrđuju da su povećane koncentracije hroma i nikla rezultat pedogenetskih procesa u zemljištu (Facchinelli i sar. 2001; Lee i Kao 2004; Bonifacio i sar. 2010).

U stvari, na lokalitetu Zmajevacu uzorku 11 (tip zemljišta ranker) nađen je najveći sadržaj za četiri teška metala (Cr, Co, Fe i Ni), što se može objasniti da se već na 20 cm od površine nalazila matična stena, pa je povećan sadržaj metala povezan sa geološkom osnovom matičnog susprata. Sadržaj lako-dostupnog nikla ( $106,056 \text{ mg/kg}$ ) u ovom uzorku takođe prekoračuje preporučenu MDK vrednost ukupnog sadržaja nikla (VROM,

2000) i značajno odstupa u odnosu na vrednosti nađene u uzorcima zemljišta saostalih lokaliteta. Iako je poznato da visoke koncentracije nikla mogu da utiču na brojnost mikroorganizama tako što inhibiraju enzimske aktivnosti, replikaciju DNK, transkripciju i translaciju vezivanjem za proteine i nukleinske kiseline (Ahmad i sar., 2013), u ovom uzorku zemljišta to nije bio slučaj. Iz ovog uzorka izolovan je samo jedan izolat gljive iz roda *Trichoderma*, i identifikovan kao *T. longibrachiatum*. Na osnovu mikrobiološkog ispitivanja ovog uzorka, ne može se zaključiti da je povećan sadržaj nikla uticao na brojnost mikroorganizama, sem u slučaju azotobaktera čija je brojnost značajno manja u odnosu na ostale uzorke, a što je u skladu sa rezultatima Wyszowska i sar. (2007). Maksimalni sadržaj kadmijuma, bakra i cinka određen je u zemljištu tipa rendzina (uzorak 1), uzorkovanom iz vinograda, pod konvencionalnom proizvodnjom, što se može dovesti u vezu sa upotrebom fungicida, posebno u slučaju povećane koncentracije bakra. Ovu pretpostavku potvrđuje i to da udeo lako-dostupnog bakra u ukupnom sadržaju prelazi 20 % (Tabela 49), što ukazuje da prisustvo ovog elementa dolazi iz antropogenih izvora.

Visoke  $R^2$  dobijene su između broja izolata i vrednosti sadržaja Cr, Co, Pb, Mn i Ni. Što može da ukaže da povećane vrednosti sadržaja ovih metala ne deluje negativno na prisustvo gljiva roda *Trichoderma*.

Novija istraživanja pokazala su da se određene vrste gljiva iz roda *Trichoderma* upotrebljavaju i u bioremedijaciji zemljišta zagađenih teškim metalima (Kredics i sar., 2001; Sahu i sar., 2012; Tripathi i sar., 2013; Kacprzak i sar., 2014). Kako bi utvrdili da li neki od izolovanih izolata u ovom radu može da se preporuči za potencijalnu primenu u bioremedijaciji zemljišta zagađenih teškim metalima, odabrana su četiri izolata (*T. brevicompactum*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum* i *T. longibrachiatum*) koja su testirana *in vitro* na povećane koncentracije bakra(II) i nikla(II).

Tripathi i sar. (2013) su dokazali visoku tolerantnost određenih izolata prema povećanim koncentracijama nikla, arsena i bakra. Prema njihovim rezultatima, četiri od ispitanih 13 izolata gljiva roda *Trichoderma* pokazale su tolerantnost prema nabrojana tri metala pri koncentracijama od 100 i 250 ppm. Naši rezultati su pokazali da je izolat *T.brevicompactum* SZMC 22661 tolerantan na koncentracije bakra u intervalu od 30-60 ppm (0.5-1 mmolCu/l), što je više od rezultata koje su dobili Kredics i sar. (2001), koji su



takođe ispitivali u *in vitro* uslovima uticaj povećanih koncentracija metala na rast gljiva roda *Trichoderma*. Na osnovu njihovih rezultata IC<sub>50</sub> vrednosti za bakar kretale su se od 0,14 do 0,20 mmol CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O /l (~10-20ppm). Slične rezultate dobili su i Ting i Choong (2009) i Anand i sar. (2006) sa izolatima *Trichoderma* izolovanim iz zagađenih sredina.

Od ispitivanih izolata, i u slučaju testa sa niklom, *T. brevicompactum* SZMC 22661 je pokazao najveću tolerantnost. Procenat inhibicije je, nakon 144h pri koncentraciji od 120ppm, iznosio 0%, dok pri koncentraciji od 240 ppm procenat inhibicije je bio 100 %. Ovo je u skladu sa rezultatima Tripathi i sar. (2013), koji su našli da je koncentracija nikla od 250 ppm inhibitorna za ispitane izolate. Međutim, ispitivanja Mishra i sar. (2016) su pokazala da je izolat *Trichoderma* T103 je rastao na podlogama uz dodatak 10 mmol (>500 ppm) Ni(II) i do 80% u odnosu na kontrolu, što znači da procenat inhibicije nije iznosio više od 20%. Za izolate ispitane u ovom radu, koncentracija nikla (II) od 4 mmola bila je potpuno inhibitorna za rast sva četiri ispitana izolata.

### **5.3. Antagonistička aktivnost gljiva roda *Trichoderma* prema fitopatogenima i osnova ove aktivnosti**

Poznato je da fitopatogene gljive izazivaju značajne posledice na poljoprivredne kulture od ekonomskog značaja (Verma i sar., 2007). Antagonističke sposobnosti gljiva iz roda *Trichoderma* prema različitim patogenim gljivama poput gljiva iz roda *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* i *Botrytis* su mnogo proučavane i dokazane (Harman i sar., 2004). U ovoj tezi ispitane su antagonističke sposobnosti nekih od izolovanih izolata gljiva roda *Trichoderma* prema biljnim patogenima *FSSC*, *A. alternata* i *P. cucurbitacearum*, za koje se zna da izazivaju gubitke u prinosu poljoprivrednih kultura. Odabrana su tri izolata iz kompleksa *F. solani*, kompleksa koji je taksonomski još uvek nedovoljno razjašnjen sistem- trenutno je poznato 45 vrsta (O'Donnell i sar., 2008). Antagonizam šesnaest izolata (9 izolovanih iz rizosfere i 7 iz različitih tipova zemljišta) ispitan je *in vitro* testom. Svi izolati su ispoljili dobre antagonističke sposobnosti prema biljnim patogenima, uz vrednosti indeksa biokontrole u opsegu od 70.89 do 100 (Tabela 56). Najviši indeks biokontrole od 100 % (ispitani izolat *Trichoderma* je u potpunosti

prerastao sve ispitane biljne patogene) određen je za izolat *T. atroviride* SZMC 20968. Svi ispitani izolati su pokazali bolje antagonističke sposobnosti prema vrstama iz kompleksa *F. solani* u odnosu na do sada objavljene rezultate (Bokhari i Perveen, 2012; Basak i Basak 2011), do kojih se došlo primenom drugih metoda. Sa druge strane, Cuervo-Parra i sar. (2011) su primenom iste metode (Szekeres i sar. 2006) našli da je izolat *T. harzianum* VSL 291 inhibirao rast *F. solani* sa indeksom biokontrole koji je iznosio 69.71, što je uporedivo sa našim rezultatima.

Slični rezultati dobijeni su i pri ispitivanju antagonističke aktivnosti izolata prema biljnom patogenu *A. alternata*. Vrednosti indeksa biokontrole dobijeni u ispitivanjima u ovoj tezi (od 93.54 do 100) su značajno više od rezultata Pandey (2010), koji su utvrdili procenat inhibicije rasta *A. alternata* od 66.67 do 67.7 za ispitane izolate *T. viride* i *T. harzianum*, određene 10 dana nakon inokulacije u petri posudama.

Iako su ispitivanja antagonističkih sposobnosti gljiva roda *Trichoderma* veoma brojna, izveštaja o njihovoj sposobnosti da utiču na rast patogena *P. cucurbitaceum* nema. Ispitivane gljive roda *Trichoderma* ispoljavaju visoku antagonističku aktivnost prema ovom patogenu što dokazuje indeks biokontrole koji je varirao od 81.43 do 100.

Na osnovu svih rezultata može se zaključiti da od 16 izolata ispitanih u ovoj tezi, izolati koji pripadaju *THSC* kao i izolat *T. atroviride* pokazuju najbolju antagonističku aktivnost prema ispitanim biljnim patogenima, što ih definiše kao najbolje kandidate za praktičnu aplikaciju u okviru biokontrole.

Šta je osnova utvrđenih antagonističkih svojstava ispitanih izolata? Kao što je navedeno u pregledu literature, antagonistički potencijal gljiva zasniva se na različitim mehanizmima, a aktivaciju bilo kog od nabrojanih mehanizama prati proizvodnja specifičnih supstanci, poput hidrolitičkih enzima, siderofora ili antibiotika (Benítez i sar., 2004). Gljive koje pripadaju rodu *Trichoderma* proizvode različite ekstraćelijske enzime, a u zavisnosti od količine i aktivnosti proizvedenih enzima zavisi njihova antagonistička aktivnost (Sharma i sar., 2012). Hitinaze, laminaraze i proteaze su enzimi koji imaju značajnu ulogu u mikoparazitizmu ovih gljiva, kao jednom od osnovnih mehanizama antagonizma (Sivan i Chet, 1989a,b).

Rezultati ispitivanja enzimskih aktivnosti 16 izolata, prikazani u ovoj tezi, pokazali su da su aktivnosti kisele fosfataze i naftol-as-bi-fosfohidrolaze visoke u slučaju svih ispitanih izolata. Niska aktivnost kisele fosfataze zabeležena je samo u 2 izolata. Altomare i sar. (1999) su pokazali da su gljive roda *Trichoderma* veoma kompetitivne za usvajanje fosfora u odnosu na neke fitopatogene gljive, pa time smanjuju njihov rast. Kompetitivnost za usvajanje fosfora može da se poveže sa visokim aktivnostima enzima kisele fosfataze i naftol-as-bi-fosfohidrolaze koje su dobijene u našim rezultatima. Poznato je takođe da kod biljaka kiselu fosfatazu povećava dostupnost fosfata, što vodi ka intenzivnijem rastu biljaka u prisustvu gljiva roda *Trichoderma* u rizosferi tih biljaka (Kapri i Tewari, 2010). Pored ova dva enzima, prisustvo enzima N-acetil- $\beta$ -glukozaminidaze je detektovano u svim ispitanim izolatima. Ovaj enzim je uključen u hitinolitički sistem vrsta roda *Trichoderma*. Katalizuje hidrolizu  $\beta$ -1,4 glikozidne veze između ostataka N-acetil-D-glukozamina u linearnom homopolimeru, glavnoj komponenti ćelijskih zidova patogenih gljiva, i tako je uključen u mehanizme antagonizma (Harman i sar., 2004). Takođe, ovaj enzim se koristi za proizvodnju preparata za zaštitu biljaka, a prvi put je izolovan iz izolata *T. harzianum* P1 (Harman i sar., 1995). Aktivnosti  $\beta$ -glukuronidaze,  $\alpha$ -glukozidaze,  $\beta$ -glukozidaze su bile negativne u svim ispitanim uzorcima. *T. brevicompactum* SZMC 22661 i SZMC 22663 su jedino pokazale slabu aktivnost  $\alpha$ -galaktozidaze i  $\beta$ -galaktozidaze.  $\alpha$ -galaktozidaza se primenjuje za modifikacije velikog broja poljoprivrednih proizvoda koji sadrže rafinisane šećere, za njihovu transformaciju do prostih šećera (Shabalin i sar, 2002). Zato se može pretpostaviti da bi ovi izolati mogli biti dobar izvor ovog enzima.

Kada se uporede rezultati *in vitro* ispitivanja antagonističke aktivnosti izolata gljiva roda *Trichoderma* sa dobijenim aktivnostima enzima, može se videti da su oni u korelaciji i da su aktivnosti ekstraćelijskih enzima važan deo antagonističkih sposobnosti ovih gljiva.

#### **5.4. Efekat izolata *T. brevicompactum* SZMC 22661 na biljke paradajza u uslovima suše**

Uticaj različitih abiotskih i biotskih stresova na biljke je do sada najčešće proučavan pojedinačno. Međutim, nedavno je pokazano da se reakcije biljaka na simultane stresove

razlikuju i da se ne mogu predvideti na osnovu reakcija na iste stresne faktore kada se oni primenjuju pojedinačno. Na primer, ekspresija gena za otpornost prema bolestima se menja pod uticajem različitih stresova. Pod uticajem toplotnog stresa ili kombinovanog toplotnog stresa i suše indukuju se različiti geni za otpornost prema bolestima iz klase TIR-NS-LRR geni (Chini i sar., 2004).

U ovom radu ispitani su parametri vodnog režima, određeni sadržaji hlorofila, flavonola i abscisinske kiseline, kao i NBI kod paradajza koji je bio gajen u uslovima suše sa i bez prisustva izolata *T. brevicompactum*. Takođe, praćena je ekspresija određenih gena u listu i korenu paradajza kao odgovor na prisustvo *T. brevicompactum* i stres izazvan sušom.

Stres izazvan sušom kod biljaka indukuje sledeće simptome: prestanak rasta izdanka, smanjenu stomatalnu provodljivost, smanjenu asimilaciju ugljen-dioksida, prestanak rasta korena, starenje listova i uvenuće (Passioura, 1996). Iako je do sada identifikovano više od 100 vrsta roda *Trichoderma*, a postoji i veliki broj mutanata, izolati i mutanti vrste *T. harzianum* (Shukla i sar., 2012) i *T. hamatum* (Bae i sar., 2009) najviše se koriste u ispitivanju otpornosti biljaka prema suši.

Za ova ispitivanja odabran je izolat *T. brevicompactum* SZMC 22661, koji je izolovan iz poljoprivrednog zemljišta, i koji je pokazao najbolje rezultate pri ispitivanju otpornosti na povećani sadržaj teških metala, kao što je istaknuto u poglavlju 5.2. Ova vrsta je prvi put identifikovana 2004 godine (Kraus i sar., 2004) i pripada *Brevicompactum* kladi. Karakteristična je po proizvodnji grupe jedinjenja koja pripada trihotecenima, definisanim kao mikotoksini-značajni antigljivični antibioticima, ali i inhibitori sinteze proteina (Tijerino i sar., 2011; Nielsen i sar., 2005; Degenkolb i sar., 2008). Takođe, ove vrste proizvode i alamicine (Degenkolb i sar. 2006) koji doprinose značajnosti ovih vrsta kao biokontrolnih agenesa (Corley i sar. 1994). Ispitivanja o uticaju ovih vrsta na biljke su veoma retka, posebno u poređenju sa primenom vrsta *T. viride* i *T. harzianum* (Malmeirca i sar., 2012, Shentu i sar., 2014).

Rezultati ove teze su pokazali da je kod biljaka, koje su optimalno zalivane, sadržaj vode u zemljištu bio za oko 20 % veći u odnosu na sadržaj vode u zemljištu na kome su rasle biljke izložene suši. Prisustvo *T. brevicompactum* je dovelo do povećanja relativnog sadržaja vode u listovima biljaka gajenih u opisanim uslovima. Slično su pokazali i Guller i sar.

(2016) gde je inokulacija klijanaca kukuruza izolatom *T. atroviride* značajno povećala vodni status listova. Ovo je u saglasnosti i sa rezultatima Bae i sar.(2009), koji su pokazali da prisustvo *T. hamatum* povećava vodni status biljaka kakaovca i na taj način dovodi do zaštite semena od abiotskog stresa izazvanog sušom.

Uticaj dodatka suspenzije gljive na provodljivost stoma (Gs) zavisio je od snabdevenosti vodom, pa je Gs bila veća kod tretmana gde je dodata suspenzija i biljke optimalno zalivane. Suprotno tome, u uslovima suše u prisustvu *Trichoderma* provodljivost stoma je bila manja nego kod biljaka koje su rasle bez njenog dodatka. Može se pretpostaviti da je u uslovima suše, bolji vodni status biljaka koje su rasle u prisustvu gljive povezan sa manjom provodljivošću stoma, odnosno zatvaranjem stoma što doprinosi ekonomičnijem korišćenju vode u biljci. U istraživanjima Contreras-Cornejo i sar (2015), pokazano je da je dodatak dve vrste *Trichoderma* izazivao smanjenje otvorenosti stoma i transpiracije kod *Arabidopsis*. Autori ovaj fenomen objašnjavaju povećanom ABA koju sintetiše *Trichoderma* (Contreras-Cornejo i sar 2015). Ovo je u skladu sa našim rezultatima, gde je dodatak *Trichoderma* u uslovima dobre oskrbljenosti vodom doveo do porasta sadržaja ABA u korenu paradajza za više od dva puta u odnosu na kontrolu. U suši je porast sadržaja ABA bio približno sedam puta veći. Međutim, u kombinovanom stresu (suša i prisustvo *Trichoderma*) sadržaj ABA je bio oko pet puta veći u odnosu na kontrolu, ali približno 0.71 puta manji u odnosu na samo dejstvo suše. Moguće da je u kombinovanom stresu došlo do povećane translokacije ABA iz korena u listove (De Diego i sar., 2013). U listovima je primećena tendencija rasta sadržaja ABA u uslovima stresa, ali razlike nisu bile statistički značajne. Sobeih i sar. (2004) ističu da nivo sadržaja ABA ne mora uvek da ukaže na zatvorenost stoma u uslovima suše. Naime, prema njihovim navodima postoje i drugi hemijski signali koji utiču na zatvorenost stoma. Ulogu hemijskih signala, koji dovode do redukcije rastenja biljaka i provodljivosti stoma, mogu da imaju i hormoni citokinini i etilen, ali i neki joni, npr.  $Ca^{2+}$  ili nitrati (Stikić i Jovanović, 2012).

Sadržaj hlorofila i flavonoida u listovima biljaka predstavlja važan indikator statusa azota u biljci, gde je sadržaj hlorofila u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem azota, a sadržaj flavonoida u negativnoj. Poznato je da suša utiče na smanjenje sadržaja hlorofila u listu (Guller i sar., 2016). U našem eksperimentu efekat suše nije značajno uticao na sadržaj

hlorofila. Međutim, tretman pri kome su biljke bile izložene i suši i dodatku gljive doveo je do statistički značajnog ( $P < 0,05$ ) povećanja vrednosti sadržaja hlorofila u odnosu na ostale tretmane. Uticaj dodatka *Trichoderma* (TaID20G) na povećan sadržaj hlorofila u uslovima suše potvrđen je i eksperimentom na klijancima kukuruza, rezultatima do kojih su došli Guller i sar. (2016).

Sadržaji flavonoida, dobijeni pri različitim tretmanima paradajza nisu se značajno razlikovali, što se odrazilo i na vrednosti NBI, koji se takođe nisu menjale. Prema podacima dobijenim za debljinu lista može se primetiti da biljke koje su rasle u prisustvu izolata *Trichoderma* u kontrolnim, kao i u uslovima suše postoje statistički značajne razlike.

Uloga signalnih molekula JA, SA i ABA, kao rezultat interakcije između gljive i biljke, smatra se da je povezana sa odbrambenim sistemom biljke i njenim razvojem (Hermosa i sar., 2012, Muñoz-Espinoza i sar., 2015). Rezultati Muñoz-Espinoza i sar. (2015) pokazali su da je ekspresija ključnih gena, uključenih u biosintezu ovih hormona, podstaknuta sušom, kao i to da je regulacija ovih hormona različita u korenu i listu. Pored ABA i JA, koji se javljaju kao odgovor na sušu (Fujita i sar., 2011; De Ollas i sar., 2013, 2015), noviji rezultati u literaturi potvrđuju da i signalni put salicilne kiseline ima značajnu ulogu u odgovoru biljaka prema vodnom deficitu (Singh i Usha, 2003; Muñoz-Espinoza i sar. 2015).

NCED1 gen reguliše jednu od ključnih reakcija u sintezi ABA i njegova ekspresija se javlja kao odgovor biljke na vodni stres. Muñoz-Espinoza i sar. (2015) su utvrdili visoku ekspresiju NCED1 gena u korenu paradajza u uslovima vodnog deficita. U našem eksperimentu korišćen je isti genotip. Nađena je povećana ekspresija NCED1 gena u korenu paradajza, pri svim tretmanima, a posebno pri suši, što je u direktnoj vezi sa utvrđenim statistički značajnim povećanjima sadržaja ABA u korenu.

Pored povećane ekspresije NCED1 gena, u korenu paradajza utvrđena je i povećana ekspresija gena TomLoxA i PinII pri svim tretmanima, a posebno u kombinovanom stresu suša u prisustvu *T. brevicopmactum*. Povećana ekspresija ovih gena ukazuje na povećanu sintezu jasmonske kiseline. Za razliku od naših rezultata, Cardoza i sar. (2015) primetili su smanjenu ekspresiju TomLoxA gena u prisustvu *T. harzianum* (T34-5.27-tri4.2), u koju je bio kloniran gen iz *T. arundinaceum*, vrste koja pripada posebnoj grupi u okviru vrste

*Brevicompectum*. Snižena ekspresija NCED1 i TomLoxA gena u listovima paradajza bila je snižena u odnosu na kontrolu, što ukazuje na smanjenu biosintezu JA i ABA u listovima. Međuzavisnost signalnih puteva JA i ABA u korenu, objašnjavaju de Ollas i sar. (2013), koji navode da je za povećan sadržaj ABA neophodno prisustvo JA kod korena limuna u uslovima suše. Janiak i sar. (2016), objašnjavaju da je regulatorni sistem uključen u odgovor korena biljaka na sušu veoma složen i da uključuje veliki broj transkripcionih faktora (TF) i regulatornih proteina. Iako su mnogi TF zajednički za list i koren, novijim istraživanjima se ističu specifični putevi koji dovode do različite ekspresije gena među ova dva organa.

Naši rezultati su pokazali da je ekspresija gena Pr1b1 i PrP2, uključenih u signalni put salicilne kiseline, bila smanjena u korenu kao odgovor biljaka na vodni deficit i dodatak *Trichoderma*. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Cardoza i sar. (2015), koji su takođe našli smanjenu ekspresiju ovih gena u korenu inokulisanom izolatom *Trichoderma*.

Sa druge strane, naši rezultati ukazuju na povećanu ekspresiju ovih gena u listovima, odnosno na aktiviranje puta salicilne kiseline, koji je najčešće povezan sa biotskom vrstom stresa. Ekspresija Pr1b1 i PrP2 gena je u korelaciji sa ekspresijom Osmotin likeI gena, potvrđujući da je dodatak *Trichoderma* indukovao sistemski stečenu otpornost (SAR) u listovima. Povećana ekspresija OsmotinlikeI gena u listovima zapažena je i u radu Alfano i sar. (2007), koji su ekspresiju pratili u listovima paradajza nakon inokulacije sa *T.hamatum* 382, sugerišući da gljiva indukuje fiziološke odgovore kod paradajza kao odgovor na stres. Aktivacija SAR putem salicilne kiseline potvrđena je i povećanom ekspresijom PrP2 gena u listovima u našem eksperimentu.

Tucci i sar. (2011) su pratili reakciju više genotipova paradajza prema dva izolata *Trichoderma*. U većini slučajeva su u listovima utvrdili povećanu ekspresiju gena uključenih u put salicilne kiseline, dok je odgovor gena uključenih u JA signalni put ukazao da je on manje aktivan. Slično su pokazali Cardoza i sar. (2015), da je SA signalni put više aktiviran nego JA put signalizacije u nadzemnim delovima klijanca paradajza, koji su tretirani fitotoksičnim trihotecenima.

Rezultati analize ekspresije gena ukazuju da su u listovima i korenu aktivirani različiti signalni putevi u našim eksperimentalnim uslovima. Ekspresija gena markera signalnog

puta SA povećana je u listovima, a smanjena u korenu. Obrnuta je situacija sa genima markerima signalnog puta JA, njihova ekspresija je smanjena u listovima, a povećana u korenu. To je slučaj i sa NCED1 genom koji reguliše sintezu ABA. Naši rezultati potvrđuju rezultate Munoz-Espinoza i sar. (2015) o interakciji SA i JA signalnog puta i ABA u uslovima suše. Pored toga ukazuju na postojanje ove interakcije i u odgovoru biljke na *Trichoderma*. Zajedničko dejstvo ispitivanih stresova dovodi do modifikacije ekspresije gena u odnosu na reakciju prema pojedinačnom stresu. Npr. signalni put JA je u uslovima simultanog dejstva suše i *Trichoderma* značajno aktiviran u korenu u odnosu na pojedinačno delovanje stresova. U listu simultano delovanje stresova dovodi do povećanja ekspresije jednog od markera JA puta, PinII gena, koji je imao smanjenu ekspresiju pri pojedinačnom delovanju stresova.

Svi navedeni rezultati ukazuju na značajnu kompleksnost i povezanost između signalnih puteva zaduženih za odgovor biljke na udruženi biotski i abiotski stres. Naime, odgovor biljaka na dejstvo više udruženih stresora nije uvek isti, čime se ukazuje na potrebe za daljim istraživanjima kako bi se detaljnije razumeli mehanizmi uključeni u otpornost biljaka prema biotskom i abiotskom stresu.



## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prikazanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Iz 23 odabrana uzorka zemljišta izolovan je 41 izolat gljiva koje pripadaju rodu *Trichoderma*: 26 izolata izolovano je iz rizosfere različitih biljnih vrsta iz zemljišta u konvencionalnoj i organskoj proizvodnji, a 15 je izolovano iz zemljišta uzorkovanom sa dve dubine: 0-30 cm i 30-60 cm. Izolati su svrstani u 9 različitih vrsta nakon identifikacije na molekularnom nivou.
- Na osnovu fizičko-hemijske karakterizacije zemljišta pokazano je da slabo bazna zemljišta kao i veći vrednosti sadržaj kalijuma i fosfora u zemljištu, doprinose većoj varijabilnosti gljiva iz roda *Trichoderma*. Mikrobiološke karakteristike ispitanih tipova zemljišta (rendzina, sirozem na lesu, ritska crnica, fluvisol, ranker, gajnjača, černoziem sa različitim podtipovima i smonica) nisu značajno uticale na varijabilnost gljiva iz roda *Trichoderma*.
- Sadržaj jona teških metala (Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni i Zn) u zemljištima nije bio inhibirajući faktor za prisustvo gljiva roda *Trichoderma*. Iako je u uzorku zemljišta sa lokaliteta Zmajevac utvrđeni sadržaj Cr i Ni po gramu zemljišta bio veći od preporučenih vrednosti za remedijaciju, iz ovog uzorka izolovan je i identifikovan *T. longibrachiatum* izolat SZMC 22669.
- U testu tolerantnosti na metale, izolat *T. brevicompactum* SZMC 22661 je u *in vitro* uslovima pokazao najveću otpornost, odnosno najbolji rast u prisustvu različitih koncentracija bakra(II) i nikla(II).
- Od identifikovanih vrsta gljiva u ovom radu, izolati koji pripadaju vrsti *T. harzianum* i *T. atroviride* pokazali su najveće antagonističke aktivnosti prema pet različitih fitopatogena (3 izolata gljiva *F. solani*, kao i po jedan izolat vrste *A. alternata* i vrste *P. cucurbitacearum*), ukazujući na mogućnost njihove potencijalne

primene kao biokontrolnih agenasa ili komponenata komercijalnih preparata.

- Analiza fizioloških parametara paradajza, kao odgovora na prisustvo *T. brevicompactum* i na sušu (biotski i abiotski stress), pokazala je da je bolji vodni režim biljaka povezan sa smanjenom stomatalnom provodljivošću. Analiza ekspresije gena (PR1b1, PrP2, PinII, TomLoxA, Osmotin-like1, NCED1 i Act) kod biljaka paradajza u uslovima dva ispitivana stresna faktora, suše i primene izolata *T. brevicompactum* SZMC 22661 (pojedinačni i kombinovani efekti), ukazuje da su u listovima i korenu aktivirani različiti signalni putevi. Ekspresija gena markera signalnog puta SA povećana je u listovima, a smanjena u korenu. Obrnuto, ekspresija markera signalnog puta JA je smanjena u listovima, a povećana u korenu. To je slučaj i sa NCED1 genom koji reguliše sintezu ABA. Dobijeni rezultati ukazuju na povezanost SA i JA signalnog puta i ABA u uslovima suše, kao i u u odgovoru biljke na gljive roda *Trichoderma*. Zajedničko dejstvo ispitivanih stresova dovodi do modifikacije ekspresije gena u odnosu na reakciju prema pojedinačnom stresu.
- U smislu potencijalne primene autohtonih izolata gljiva roda *Trichoderma* u različitim granama biotehnologije i poljoprivredi, a na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se izolati iz vrste *T. harzianum* i *T. atroviride* mogu preporučiti za primenu u biokontroli biljnih bolesti; izolat *T. brevicompactum* SZMC 22661 izdvaja se sa svojim pozitivnim efektima, u povećanju otpornosti biljaka ka suši, ali i kao izolat koji je u *in vitro* uslovima pokazao visoku toleranciju prema različitim koncentracijama metala.

## 7. LITERATURA

Ahmad, I., Bissett, J., Malloch, D. (1995). Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma* species and its implications for their control of phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry Physiology* 53: 49-59.

Ahmad, Z., Rehman, A. U., Anees, M. (2013): Microcosmic Study of Nickel Stress towards Soil Bacteria and their Biochemical Characterization. *Journal of Bio-Molecular Sciences (JBMS)*, 1(1), 37-44.

Alfano, G., Ivey, M. L., Cakir, C., Bos, J. I. B., Miller, S. A., Madden, L. V., Kamoun, S., Hoitink, H. A. J. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*, 97(4), 429-437.

Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T., Harman, G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2926-2933.

Anand, P., Isar, J., Saran, S., Saxena, R. K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97(8):1018-1025.

Anderson, G.R. (1958). Ecology of *Azotobacter* in soils of the palouse region I. Occurrence. *Soil Science*, 86:57–62.

Anita, S., Ponmurugan, P. (2011). *In vitro* evaluation of *Trichoderma atroviride* against *Phomopsis theae* a casual agent of collar canker disease in tea plants. *International Journal of Agricultural Research* 6:620–631.

Antal, Z., Manczinger, L., Szakács, G., Tengerdy, R.P., Ferenczy, L. (2000). Colony growth, *In vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycological Research* 104:545–549.

Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 29(4):719-739.

Asch, F. (2000). Laboratory Manual on Determination of Abscisic Acid by indirect Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). KVL Agrohydrology & Bioclimatology. Technical Series 1-2000

Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11): 3279-3295.

Basak, A.C., Basak, S.R. (2011). Biological control of *Fusarium solani* sp. *dalbergiae*, the wilt pathogen of *Dalbergia sissoo*, by *Trichoderma viride* and *T. harzianum*. *Journal of Tropical Forest Sciences*, 23:460–466.

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(2), 318-340.

Begoude, B.A.D., Lahlali, R., Friel, D., Tondje P.R., Jijakli, M.H.(2007). Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and  $a_w$  on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Applied Microbiology* 103:845–854.

Belić, M., Nešić, Lj., Ćirić V. (2014): Praktikum iz pedologije. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Novom Sadu.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4):249-60.

Beškoski, V. P., Gojgić-Cvijović, G. Đ., Milić, J. S., Ilić, M. V., Miletić, S. B., Jovančičević, B. S., Vrvić, M. M. (2012): Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog naftom i naftnim derivatima: mikroorganizmi, putanje razgradnje, tehnologije. *Hem. Ind*, 66(2), 275-289.

Bissett, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69:2357-2372.

Bissett, J. (1991b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69:2373-2417.

Bissett, J. (1991c). A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69:2418-2420.

Błaszczyk, L., Popiel, D., Chelkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G. J., Sobieralski, K., Siwulski, M. (2011). Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of applied genetics*, 52(2), 233-243.

Blumenthal, C. Z. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2):214-228.

Bochner, B.R., Gadzinski, P., Panomitros, E. (2001). Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome research*, 11(7):1246-1255.

Bokhari, N.A., Perveen, K. (2012). Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. *African Journal of Microbiology Research* 6:7193–7197.

Bonifacio E, Falsone G, Piazza S (2010): Linking Ni and Cr concentrations to soil mineralogy: does it help to assess metal contamination when the natural background is high?. *J Soils Sediments* 10(8):1475-1486.

Bošnjak, Đ., Dragović, S., Hadžić, V., Babović, V., Kostić, N., Burlica, Č., Đorović, M., Pejković, M., Mihajlović, T.D., Stojanović, S., Vasić, G., Stričević, R., Gajić, B., Popović, V., Šekularac, G., Nešić, Lj., Belić, M., Đorđević, A., Pejić, B., Maksimović, I., Karagić, Đ., Lalić, B., Arsenić, I. (1977): Metode istraživanja i određivanja fizičkih svojstava zemljišta. JDPZ, Beograd.

Bošnjak, Đ, Pejić, B., Mačkić, K. (2012): Navodnjavanje poljoprivrednih useva, praktikum, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Bourguignon, E. (2008). *Ecology and diversity of indigenous Trichoderma species in vegetable cropping systems* (Doctoral dissertation, Lincoln University, Canterbury, New Zealand).

Bridge, P.D., Hawksworth, D.L. (1984). The API ZYM enzyme testing system as an aid to the rapid identification of *Penicillium* isolates. *Microbiol Sciences*, 1(9):232-4.

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology* 147:779–789

Cardoza, R. E., McCormick, S. P., Malmierca, M. G., Olivera, E. R., Alexander, N. J., Monte, E., Gutiérrez, S. (2015). Effects of trichothecene production on the plant defense

response and fungal physiology: overexpression of the *Trichoderma arundinaceum* tri4 gene in *T. harzianum*. *Applied and environmental microbiology*, 81(18), 6355-6366.

Chet, I. (1987). *Innovative approaches to plant disease control*. Wiley.

Chet, I. Baker, R. (1981). Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 71:286-290.

Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake GJ (2004) Drought tolerance established by enhanced expression of the CC–NBS–LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant Journal*, 38:810–822

Clarkson, J. P., Mead, A., Payne, T., Whipps, J. M. (2004). Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology*, 53:353-362.

Cleveland, W. S., (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *Journal of the American Statistical Association*, 74(368):829–836.

Contreras-Cornejo H.A, Macías-Rodríguez L., Ek del-Val, Larsen J.(2016): Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants, *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 4:1-17.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Vergara, A. G., López-Bucio, J. (2015). *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2), 425-432.

Corley, D. G., Miller-Wideman, M., Durley, R. C. (1994): Isolation and structure of harzianum A: A new trichothecene from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 57:442-425.

Cuervo-Parra, J.A., Ramirez-Suero, M., Sánchez-López, V., Ramirez-Lepe, M. (2011). Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology* 10:10657-10663

Danielson, R. M., Davey, C. B. (1973). The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Biology Biochemistry* 5:485-494.

De Diego, N., Rodríguez, J. L., Dodd, I. C., Pérez-Alfocea, F., Moncaleán, P., Lacuesta, M. (2013). Immunolocalization of IAA and ABA in roots and needles of radiata pine (*Pinus radiata*) during drought and rewatering. *Tree physiology*, 33(5), 537-549.

De Marco, J.L., Felix, C.R. (2002). Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches'broom disease. *BMC Biochemistry*, <http://www.biomedcentral.com/1472-2091/3/3>

De Ollas C., Arbona V., Gómez-Cadenas A. (2015). Jasmonoyl isoleucine accumulation is needed for abscisic acid build-up in roots of *Arabidopsis* under water stress conditions. *Plant Cell Environment*, 38:2157–2170.

De Ollas C., Hernando B., Arbona V., Gómez-Cadenas A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia. Plantarum*. 147, 296–306.

Degenkolb, D., Nielsen, K.F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., Chaverri, P., Ismaiel, A., Brückner, H., von Döhren, H., Thrane, U., Petrini, O., Samuels G.J. (2008). The *Trichoderma brevicompactum* clade: a separate lineage with new species, new peptaibiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* 7:177–219.

Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H. I., Gams, W., & Brückner, H. (2006). *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7047-7061.

Draborg, H., Kauppinen, S., Dalboge, H., Christgau, S. (1995). Molecular cloning and expression in *S. cerevisiae* of two exochitinases from *T. harzianum*. *Biochemistry and molecular biology international*, 36:781– 791.

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10):813-828.

Druzhinina, I.S., Schmoll. M., Seiboth. B., Kubicek, C.P. (2006a). Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2126–2133.

Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P. (2006b). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47:55–64.

Duffy, B. K., Ownley, B. H. Weller, D. M. (1997). Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology* 87: 1118-1124.

Dugalić, G., Gajić B. (2012): Pedologija. Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku

Durand, H., Clanet, M., Tiraby, G. (1988). Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(6):341-346.

Edington, L.V., Khew, K.L., Barron, G.I. (1971). Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61(1): 41-42.

Facchinelli A, Sacchi E, Mallen L (2001): Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils. *Environ Pol* 114: 313–324.

Foreyt, W.J., Leathers, C.W. (1985): *Trichoderma* sp. infection in the alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Herpetology*, 19:530-531.

Friedl, M. A., Druzhinina, I. S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, 158(1): 69-83.

Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124: 509–525.

Gams, W. Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 3-31. Edited by C. P. Kubicek G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor Francis.

Garbeva, P., van Veen, J. A., van Elsas J. D., 2004: Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 243-270.

Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology Biochemistry*, 23:1011-1020.



Giller, K. E., Witter, E., Mcgrath, S. P. (1998): Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10), 1389-1414.

Govedarica, M., Jarak, M., Milošević, N. (1996): Uloga mikroorganizama u zemljištu I proizvodnji voća. U: Mikrobiologija voća i proizvodnja od voća. Ed. Škrinjar, M I sar., Tehnološki fakultet, Novi Sad, pp. 49-64.

Griffin, D. H. (1994). *Fungal Physiology*, 2nd edn. New York: Wiley-Liss.

Guller, N. S., Pehlivan, N., Karaoglu, S. A., Guzel, S., Bozdeveci, A. (2016). *Trichoderma atroviride* ID20G inoculation ameliorates drought stress-induced damages by improving antioxidant defence in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6): 1-9.

Hadžić, V., Sekulić, P., Vasin, J., Nešić, L. (2005). Geološka osnova zemljišnog pokrivača Vojvodine. *Ekonomika poljoprivrede*, 52: 429-438.

Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I. (1995). New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. *Mycology Research*, 99(4):441– 446.

Harman, G. E., Lorito, M., Di Pietro, A., Hayes, C. K. (1995). *U.S. Patent No. 5,474,926*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I, Lorito, M. (2004a). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1):43-56.

Harman, G.E., Lorito, M., Lynch, J.M. (2004b). Uses of *Trichoderma* spp. to Remediate Soil and Water Pollution. *Advances in Applied Microbiology*, 56:313-330.

Harman, G.E. (2006): Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96:190-194

Harman, G.E., Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M (2012). Special issue: *Trichoderma*: from basic biology to biotechnology. *Microbiology*, 158:1-2.

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.

Hatvani, L., Manczinger L., Vágvölgyi C., Kredics, L. (2013). *Trichoderma* as a human pathogen, in: Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Singh U.S., Mukherjee M and Schmoll M (Eds.), *Trichoderma - Biology and Applications*, CABI, Wallingford, pp. 292–313.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1):17-25.

Hjeljord, L. Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 131-152. Edited by C. P. Kubicek G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor Francis.

Howell, C. R. (1998). The role of antibiosis in biocontrol. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 173-184. Edited by C. P. Kubicek G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor Francis.

Howell, C. R., Stipanovic, R. D. (1984). Phytotoxicity to crop plants and herbicidal effects on weeds of viridiol produced by *Gliocladium virens*. *Phytopathology* 74:1346-1349.

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 Technology* 3:435-441.

Hoyos-Carvajal, L., Bissett, J. (2011). Biodiversity of *Trichoderma* in neotropics. *The Dynamical process of Biodiversity-Case studies of evolution and spatial distribution. Intech*, 303-320.

Islas Pelcastre, M., Villagomez Ibarra, J. R., Madariaga Navarrete, A., Castro Rosas, J., González Ramírez, C. A., Acevedo Sandoval, O. A. (2013). Bioremediation perspectives using autochthonous species of *Trichoderma* sp. for degradation of atrazine in agricultural soil from the Tulancingo Valley, Hidalgo, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(2), ISSN 18700462.

Jacobson, E.R. (1980). Necrotizing mycotic dermatitis in snakes: clinical and pathologic features. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177:838-841.

Jacoby WG (2000): Loess: a nonparametric, graphical tool for depicting relationships between variables. *Electoral Studies*, 19(4): 577-613.

Jaklitsch, W.M. (2009): European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. *Stud Mycol*, 63:1–91.

Janiak, A., Kwaśniewski, M., Szarejko, I. (2016). Gene expression regulation in roots under drought. *Journal of experimental botany*, 67(4), 1003-1014.

Jarak, M., Milošević, N, Govedarica, M., Hadžić, V., Belić, M. 1998. Effect of chemical amelioration on microbiological characteristics of soil. *A Periodical of Scientific Research on Field and Vegetable Crops*, 30: 545-555.

Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta (1996). Priručnik za ispitivanje zemljišta, Knjiga I, Hemijske metode ispitivanja zemljišta, Urednici Bogdanović, M., Velikonja N, Racz, Z. str. 78-86.

Kacprzak, M. J., Rosikon, K., Fijalkowski, K., Grobelak, A. (2014): The effect of *Trichoderma* on heavy metal mobility and uptake by *Miscanthus giganteus*, *Salix* sp., *Phalaris arundinacea*, and *Panicum virgatum*. *Applied and Environmental Soil Science*, 2014.

Kapri, A., Tewari, L. (2010). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, ISSN 1517-8382.

Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J. Kubicek, C. P. (1998). Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics Biology*, 24:298-309.

King, A.D.Jr, Hocking, A.D., Pitt, J.I. (1979). Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37:959–964.

Klein, D. Eveleigh, E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 57-69. Edited by C. P. Kubicek G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor Francis.

Koga, K., Iwamoto, Y., Sakamoto, H., Hatano, K., Sano, M., Kato, I. (1991). Purification and characterization of beta-Nacetylhexosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 55:2817–2824

Koivula, A., Linder, M., Teeri, T. T. (1998). Structure-function relationships in *Trichoderma* cellulolytic enzymes. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 3-24. Edited by C. P. Kubicek, G. E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor Francis.

Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S. (2005). TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological research*, 109(06):658-660.

Körmöczi, P., Danilovic, G., Manczinger, L., Jovanovic, L., Pankovic, D., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2013): Species composition of *Trichoderma* isolates from the rhizosphere of vegetables grown in Hungarian soils. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(6), 1736-1741.

Kostić N, Wilson J, Živković M, Bain D (1998): Mineralogy and geochemical speciation of heavy metals in some serpentine soils of Serbia. 16th World Congress of Soil Science. pp. 444- 455. Elsevier, Amsterdam.

Krasilnikov, N.A. (1965) . Biology of some actinomycetes groups. Science, Moscow.

Krasilnikov, N.A. (1965). Biology of some actinomycetes groups. Science, Moscow.

Kraus, G. F., Druzhinina, I., Gams, W., Bissett, J., Zafari, D., Szakacs, G. Kubicek, C. P. (2004). *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia*, 96(5): 1059-1073.

Kredics, L., Antal Z., Manczinger L. (2000). Influence of water potential on growth, enzyme secretion and *in vitro* enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. *Current Microbiology*, 40:310–314.

Kredics, L., Dóczy I., Antal Z., Manczinger L. (2001). Effect of heavy metals on growth and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66:249–254.

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei F., Nagy E. (2003a). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41:37–42.

Kredics, L., Antal, Z., Dóczy, I., Manczinger, L., Kevei, F., Nagy, E. (2003b). Clinical importance of the genus *Trichoderma*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 50:105-117.

Kredics, L., Manczinger, L., Antal, Z., Péntzes, Z., Szekeres, A., Kevei F., Nagy, E. (2004). *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal of Applied Microbiology* 96:491–498.

Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Druzhinina I. (2014). Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats, in: Gupta V.K., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R.S., Druzhinina I. and Tuohy M. (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 3–24.

Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 1.

Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics Biology*, 38:310–319.

Kullnig, C., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2000). Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, 104(9), 1117-1125.

Kullnig-Gradinger, C. M., Szakacs, G. Kubicek, C. P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106:757-767.

Kumari, I., Chaudhary, N., Sandhu, P., Ahmed, M., Akhter, Y. (2016). Structural and mechanistic analysis of engineered trichodiene synthase enzymes from *Trichoderma harzianum*: towards higher catalytic activities empowering sustainable agriculture. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(6), 1176-1189.

Lee CS, Kao MM (2004) Distribution of forms of heavy metals in soils contaminated by metallurgical smelter emissions. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 39: 577–585

Lindsay, W. L., Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, management and copper. *Soil Sci* 42, Society American Journal, (421-42

Llado, S., Jiménez, N., Viñas, M., Solanas A.M. (2009). Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil. *Biodegradation*. 20:593–601.

Longa, C.M, Pertot, I., Tosi, S. (2008). Ecophysiological requirements of a *Trichoderma atroviride* isolate with biocontrol potential. *Journal of Basic Microbiology* 48:269–277.

Longa, C.M., Savazzini, F., Tosi, S. Elad, Y., Pertot, I. (2009). Evaluating the survival and environmental fate of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 in vineyards in northern Italy. *Journal of Applied Microbiology* 106:1549–1557.

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.

Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Woo, S. L., di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*. 11. Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83:302-307.

Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E., Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from ‘Omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48:395–417.

Lumsden, R. D., Locke, J. C., Adkins, S. T., Walter, J. F. Ridout, C. J. (1992b). Isolation and localization of the antibiotic gliotoxin produced by *Gliocladium virens* from alginate prill in soil and soilless media. *Phytopathology* 82:230-235

Lumsden, R. D., Ridout, C. J., Vendemia, M. E., Harrison, D. J., Waters, R. M. Walter, J. F. (1992a). Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38:1274-1280.

Lutz, M. P., Wenger, S., Maurhofer, M., Defago, G. Duffy, B. (2004). Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology* 48:447-455.

Malmierca, M. G., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., McCormick, S. P., Hermosa, R., Monte, E., Gutiérrez, S. (2012). Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the

biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14): 4856-4868.

Manojlović, S., Ubavić, M., Bogdanović, D., Dozet, D. (1995): Praktikum iz agrohemije. Poljoprivredni fakultet. Institut za ratarsvo i povrtarstvo, Novi Sad.

Marinković, J., Bjelić, D., Vasin, J., Tintor, B., Ninkov, J. (2012). The distribution of microorganisms in different types of agricultural soils in the Vojvodina province. *Research Journal of Agricultural Science*, 44(3):73-78.

Marković, S.B., Bokhorst, M.P., Vandenberghe, J., McCoy, W.D., Oches, E.A., Hambach, U., Gaudenyi, T., Jovanović, M., Zöller L., Stevens, T., Machalet, B. 2008. Late Pleistocene loess–paleosol sequences in the Vojvodina region, North Serbia. *J. Quaternary Sci.*, 23: 73–84.

Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... Danchin, E. G. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature biotechnology*, 26(5):553-560.

Mastouri, F., Björkman, T., Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11):1213-1221.

Migheli, Q., Balmas, V., Komoń-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A. G., ... & Druzhinina, I. S. (2009). Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental microbiology*, 11(1), 35-46.

Milenkovic B, Stajic JM, Gulan L, Zeremski T, Nikezic D (2015): Radioactivity levels and heavy metals in the urban soil of Central Serbia. *Environ Sci Pollut Res*, 22:16732–16741.

Mishra, N., Khan, S. S., Sundari, S. K. (2016): Native isolate of *Trichoderma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 1-23.

Morales, L. O., Tegelberg, R., Brosché, M., Keinänen, M., Lindfors, A., Aphalo, P. J. (2010). Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiol*, 30(7), 923-934.

Morales, L. O., Tegelberg, R., Brosché, M., Keinänen, M., Lindfors, A., & Aphalo, P. J. (2010). Effects of solar UV-A and UV-B radiation on gene expression and phenolic accumulation in *Betula pendula* leaves. *Tree Physiol*, 30(7), 923-934.

Mrvic, V., Kostic-Kravljanc, L., Sikiric, B., Delic, D., Jaramaz, D. (2014): methods for the assessment of background limits of Cd and Cr in the soil of moravicki district. *Glasnik Sumarskog Fakulteta*, 109, 137.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1):35-45.

Muniappan, V., Muthukumar, T. (2014). Influence of crop species and edaphic factors on the distribution and abundance of *Trichoderma* in Alfisol soils of southern India. *Acta Botanica Croatica* 73:37–50.

Muñoz-Espinoza, V. A., López-Climent, M. F., Casaretto, J. A., Gómez-Cadenas, A. (2015). Water Stress Responses of Tomato Mutants Impaired in Hormone Biosynthesis Reveal Abscisic Acid, Jasmonic Acid and Salicylic Acid Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6:997.

Naeimi, S., Khodaparast, S., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2011). Species pattern and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of Southern Caspian sea, Iran. *Cereal Research Communications*, 39(4), 560-568.

Nagy, E., Kredics, L., Antal, Z., Papp, T. (2004). Molecular diagnosis, epidemiology and taxonomy of emerging medically important filamentous fungi. *Review in Medical Microbiology* 15:153-162.

Nešić, Lj., Belić, M., Ćirić, V. (2010): Korišćenje poljoprivrednog zemljišta Vojvodine, Ekspertiza za potrebe izrade Regionalnog prostornog plana AP Vojvodine, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni Fakultet, Departman za ratarstvo i povrtarstvo.

Nevalainen, H., Suominen, P., Taimisto, K. (1994). On the safety of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 37(3):193-200.

Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Zafari, D., Thrane, U. (2005). Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(21):8190-8196.



O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N., Geiser, D.M. (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Reviews in Medical Microbiology* 46:2477–2490.

Pandey, A. (2010). Antagonism of two *Trichoderma* Species against *Alternaria alternata* on *Capsicum frutescens*. *Journal of Experimental Sciences*, 1(5).

Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23:23-54.

Park, Y. H., Stack, J. P. Kenerley, C. M. (1991). Production of gliotoxin by *Gliocladium virens* as a function of source and concentration of carbon and nitrogen. *Mycological Research* 95: 1242-1248.

Parkinson, D., Taylor, G. S., Pearson, R. (1963). Studies on fungi in the root region. I. The

Passioura, J. B. (1996). Drought and drought tolerance. In *Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis* (pp. 1-5). Springer Netherlands.

Pekeč, S., Trudić, B., Pilipović, A. (2013). Variability of Water-Air Properties of Hydromorphic Soils in Relation to the Granulometric Composition. *SEEFOR (South-east European forestry)*, 4(1), 35-41.

Peterbauer, C.K., Lorito, M., Hayes, C.K., Harman, G.E., Kubicek, C.P. (1996). Molecular cloning and expression of the nag1 gene (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. *Current Genetics* 30:325–331.

Plaster, E. (2013). Soil science and management. Cengage learning, 110p.

Pochon, J., Tardieux P. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle, Saint Mandé, 111p.

Quarrie S.A., Whitford P.N., Appleford N.E.J., Wang T.L., Cook S.K., Henson I.E., Loveys B.R. (1988). A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 173:330–339.

Rajkumar, M., Prasad, M. N. V., Swaminathan, S., Freitas, H. (2013). Climate change driven plant–metal–microbe interactions. *Environment international*, 53, 74-86.

Renshaw, J.C., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G., Livens, F.R., Collison, D., Taylor, R.J. (2002). Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research*, 106:1123–1142.

Rey, M., Delgado-Jarana, J. Benitez, T. (2001). Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Applied Microbiology Biotechnology* 55:604-608.

Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116:1-56.

Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Rouaissi, M., Hajlaoui, M. R., Rubio, M. B., Monte, E., ... Hermosa, M. R. (2009). Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Canadian journal of microbiology*, 55(2), 154-162.

Sahu, A., Mandal, A., Thakur, J., Manna, M. C., Rao, A. S. (2012). Exploring bioaccumulation efficacy of *Trichoderma viride*: an alternative bioremediation of cadmium and lead. *National Academy Science Letters*, 35(4), 299-302.

Sánchez-Rodríguez, E., Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Rosales, M. A., Romero, L., Ruiz, J. M. (2010). Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Science*, 178(1):30-40.

Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisanatac, I., Scala, F., Harman, G. E. Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibolantibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied Environmental Microbiology* 60:4364-4370.

Schubert, M., Mourad, S., Fink, S., Schwarze, F.W.M.R. (2009). Ecophysiological responses of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* (T-15603.1) to combined environmental parameters. *Biological Control* 49:84–90.

Schuster, A., Bruno, K. S., Collett, J. R., Baker, S. E., Seiboth, B., Kubicek, C. P., Schmoll, M. (2012). A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 5(1):1.

Schuster, A., Schmoll, M. (2010). Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3):787-99.

Shabalin, K. A., Kulminskaya, A. A., Savel'ev, A. N., Shishlyannikov, S. M., Neustroev, K. N. (2002). Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 231-239.

Shabalin, K. A., Kulminskaya, A. A., Savel'ev, A. N., Shishlyannikov, S. M., Neustroev, K. N. (2002). Enzymatic properties of  $\alpha$ -galactosidase from *Trichoderma reesei* in the hydrolysis of galactooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:231–239.

Sharma, P., Joshi, A., Dhaker, R.C. (2012). A brief review on mechanism of *Trichoderma* fungus use as biological control agents. *International Journal of Innovations in Bio-Science*, 2(4):200-210.

Sharma, P., Patel, A. N., Saini, M. K., Deep, S. (2012). Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural Science*, 4(8), 65.

Shentu, X. P., Liu, W. P., Zhan, X. H., Xu, Y. P., Xu, J. F., Yu, X. P., Zhang, C. X. (2014). Transcriptome sequencing and gene expression analysis of *Trichoderma brevicompactum* under different culture conditions. *PloS one*, 9(4), e94203.

Shukla, N., Awasthi, R. P., Rawat, L., Kumar, J. (2012). Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54:78-88.

Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virology Mycology* 3:127.

Singh, B., Usha, K. (2003). Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, 39(2): 137-141.

Sivan, A., Chet, I. (1989a). Degradation of fungal cell walls by Lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, 135:675-682.

Sivan, A., Chet, I. (1989b). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79(2):198-203.

Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In *Trichoderma and Gliocladium*, pp. 139-192. Edited by C. P. Kubicek G. E. Harman. London; Bristol, PA. Taylor Francis.

Sobeih, W. Y., Dodd, I. C., Bacon, M. A., Grierson, D., & Davies, W. J. (2004). Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. *Journal of Experimental Botany*, 55(407), 2353-2363.

Steyaert, J. M., Ridgway, H. J., Elad, Y. Stewart, A. (2003). Genetic basis of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4), 281-291.

Stikić, R., Jovanović, Z. (2015): Fiziologija biljaka. Naučna KMD. Beograd.

Sun, R. Y., Liu, Z. C., Fu, K., Fan, L., Chen, J. (2012). *Trichoderma* biodiversity in China. *Journal of applied genetics*, 53(3), 343-354.

Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredics, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. (2006). A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. *Journal of microbiological methods*, 65:619–622.

Škorić, A., Filipovski, G., Ćirić, M. 1985. Klasifikacija zemljišta Jugoslavije. Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, Sarajevo.

Thalmann A, (1968). Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch* 21:249–258.

Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., ... Hermosa, R. (2011). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(3): 285-296.

Ting, A.S.Y., Choong, C.C. (2009). Bioaccumulation and biosorption efficacy of *Trichoderma* isolate SP2F1 in removing copper (Cu (II)) from aqueous solutions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25.8: 1431-1437.

Torsvik, V, Ovreas, L., (2002): Microbial diversity and function of soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 240-245

Tripathi P, Singh PC, Mishra A, Chauhan PS, Dwivedi S, Bais RT, Tripathi RD (2013): *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technology and Environment*, 15, 541–550.

Tronsmo, A. Dennis, C. (1978). Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Transactions of the British Mycological Society* 71:469-474.

Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341-354.

Ulhoa, C. J. Peberdy, J. F. (1991). Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 37:2163-2169.

Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., Wade, W. G., (2010): Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 309: 1-7.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.

Vinale F., Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S., Lorito M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48:705–711.

Viterbo A, Montero M, Ramot O, Friesem D, Monte E, Llobell A Chet I (2002). Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics* 42:114–122.

VROM (2000) Circular on Target values and intervention values for soil remediation annex A: target values, soil remediation intervention values and indicative levels for serious contamination. Dutch Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment

(VROM)[http://www.esdat.net/Environmental%20Standards/Dutch/annexS\\_I2000Dutch%20Environmental%20Standards.pdf](http://www.esdat.net/Environmental%20Standards/Dutch/annexS_I2000Dutch%20Environmental%20Standards.pdf)

Weindling, R. Emerson, O. (1936). The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. *Phytopathology* 26:1068-1070.

Wells, H. D., D. K. Bell, And C. A. Jaworski. (1972). Efficacy of three plant species and two pathogens as a biological control for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-447.

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* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky T. J. White), pp. 315-322. Academic Press : San Diego, U.S.A.

Wilcox, W. F., Harman, G. E. Di Pietro, A. (1992). Effect of gliotoxin on growth, sporulation, and zoospores motility of seven *Phytophthora* spp. *in vitro*. *Phytopathology* 82, 1121.

Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181-185.

Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L. Rowland, C. (1994). Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root-rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98:1357-1363.

Wuczkowski, M., Druzhinina, I., Gherbawy, Y., Klug, B., Prillinger, H., & Kubicek, C. P. (2003). Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiological research*, 158(2), 125-133.

Wyszkowska J, Boros E, Kucharski J (2007) Effect of interactions between nickel and other heavy metals on the soil microbiological properties. *Plant Soil and Environment* 53, 544–552.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7:203-214.

[www.isth.info](http://www.isth.info)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

## ***Prilog 1.***

### Priprema mikorbioloških podloga

1. Zemljišni agar: Odmeri se oko 1 kg uzorkovanog zemljišta i prelije sa 2 l vode, i ostavi se da odstoji 24h, posle čega se sterilise 1 h u autoklavu na 128 °C. Nakon hlađenja tečnost se odlije i filtrira nekoliko puta da se dobije bistar ekstrakt. Po 250 ml ekstrakta razlije se u boce i sterilise u autoklavu 20 minuta na 128 °C. Ovako pripremljenom ekstraktu zemljišta doda se 750 ml destilovane vode i 16 g agara, prokuva se i pH se podesi na 7.0 -7.2 i nakon sterilizacije koristi se za zasejavanje. Zasejana podloga se inkubira u termostatu na 28 pet dana. Izrasle kolonije se izbroje i broj se preračuna na 1 g apsolutno suvog zemljišta.
2. Czapek-Dox podloga: 30 g/l saharoze, 2 g/l NaNO<sub>3</sub>, 0.5 g/l MgPO<sub>4</sub>; 0.35 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.5 g/l KCl; 0.01 g/l FeSO<sub>4</sub>; 20 g/l agar; destilovana voda, pH se podesi na 5.6.
3. Meso peptonski agar: 3 g/l mesni (beef) ekstrakt; 10 g/l pepton; 5 g/l NaCl; 2.5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 16 g/l agar; pH 7.
4. Sintetička podloga po Krasljnikovu (1965): 0.7 g CaCO<sub>3</sub>; 0.7 g KNO<sub>3</sub>; 0.35 g MgSO<sub>4</sub>; 0.35 g NaCl; 0.35 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.35 g FeSO<sub>4</sub>; 14 g glukoze; 20 g agar; pH 7.4
5. Fjodorova podloga: 20 g manit; 0.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.2 g/l CaHPO<sub>4</sub>; 0.3 g/l MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/l NaCl; 0.1 g/l FeCl<sub>3</sub>; 2.5 g/l CaCO<sub>3</sub>; mikroelementi 1 ml/l; agar 16 g/l; pH 7. Rastvor mikroelemenata: 5 g H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>; 5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0.5 g KI; 0.5 g NaBr; 0.2 g ZnSO<sub>4</sub>; 0.3 g Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.

## Prilog 2.

### Protokol za ekstrakciju DNK mikroorganizama iz zemljišta

#### (ZR Soil Microbe DNA MiniPrep, strana 4)

Pre početka rada (samo ukoliko se radi sa uzorcima zemljišta) treba pripremiti **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters** (kolonica sa zelenim čepom)

1. Odlomiti donji plastični deo
  2. Staviti kolonicu sa zelenim poklopcem u kolekcionu tubu
  3. Centrifugirati 3 min na 8 000g
- 
1. Dodati 0, 25g uzorka zemljišta u **ZR BashingBead™ Lysis Tube**. Dodati 750 µl **Lysis Solution** u tubu.
  2. **ZR BashingBead™ Lysis Tube** staviti u disruptor i treskati 5 min na maksimalnoj brzini.
  3. Centrifugirati **ZR BashingBead™ Lysis Tube** u trajanju od 1 min na 10 000g
  4. Preneti 400 µl supernatanta u **Zymo-Spin™ IV Spin Filter** (Bele kolonice na koje se stavi narandžasti poklopac. Pre nego što prenesemo supernatant u ove kolonice treba im odlomiti donji plastični deo i smestiti ih u kolekcionu tubu). Nakon dodavanja supernatanta kolonice koje su u sabirnoj tubi centrifugirati 1 min na 7 000g.
  5. Dodati 1 200 µl **Soil DNA Binding Buffer** na filtrat u kolekcionoj tubi iz koraka 4.
  6. Preneti 800 µl iz koraka 5 u **Zymo-Spin™ IIC Column** smeštenu u kolekcionu tubu i centrifugirati 1min na 10 000g.
  7. Baciti (odliti) sve što je prošlo u kolekcionu tubu i ponoviti korak 6.
  8. Dodati 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** u **Zymo-Spin™ IIC Column** smeštenu u novu kolekcionu tubu i centrifugirati 1min na 10 000g.
  9. Dodati 500 µl **Soil DNA Wash Buffer** u **Zymo-Spin™ IIC Column** i centrifugirati 1min na 10 000g.
  10. Preneti **Zymo-Spin™ IIC Column** u čistu epruveticu i dodati maksimalno 100 µl (minimalno 25 µl, u zavisnosti od procene) **DNA Elution Buffer** direktno na membranu kolone. Ostaviti da stoji na sobnoj temperaturi 10-ak minuta a zatim centrifugirati 30 sekundi na 10 000 g da bi se eluirala DNA.
  11. Preneti eluiranu DNA iz koraka 10 u pripremljenu **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters** (kolonica sa zelenim čepom) smeštenu u čistu epruveticu i centrifugirati 1 min na 8 000 g.
  12. Ekstrahovanu DNK čuvati u zamrzivaču na – 20 °C.



**Prilog 3. Sekvence PCR produkata dobijenih amplifikacijom ITS1/4 gena i/ili *tef1* gena**

<p><b>KP316411</b></p>	<p>&gt;gi 753248045 gb KP316411.1  <i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate SZMC 20966 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TTTCACTCCAACCCATGTGACCATAACAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTTCGCAGC  CCCCGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCT  TACAGCTCTGAGCAAAAATCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT  GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC  ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGG  GGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCC  GCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACAC  CCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT</p>
<p><b>KP316414</b></p>	<p>&gt;gi 753248048 gb KP316414.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20969 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  ATGTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTTCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGC  GCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTT  TCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCT  TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCT  CGCCGACCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCTCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAA  ACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA</p>
<p><b>KP316421</b></p>	<p>&gt;gi 753248055 gb KP316421.1  <i>Trichoderma atroviride</i> isolate SZMC 20976 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TGTGACCATAACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGC  CCGCCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCA  AAAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA  AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC  AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGG  GGACCTCGGGAGCCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTCT  GCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTCTGAA  ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC</p>
<p><b>KP316423</b></p>	<p>&gt;gi 753248057 gb KP316423.1  <i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate SZMC 20978 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TGTGACCATAACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGC  CCGCCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAA  AAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC  GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGG  GATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTCTGCG  CAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTCTGAAATG  TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATA</p>
<p><b>KP316440</b></p>	<p>&gt;gi 753248074 gb KP316440.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 22661 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGCAGCCCCGGACCAAG  GCGCCCGCCGGAGGACCAATTTACAACTCTTTGTATATCCCATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCCT  TCTCGGCGCTCCTAGCGAGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCT  TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAG  CCTCTCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGGCCGTAAAACAACCCAA  ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT</p>

<b>KP316450</b>	<p>&gt;gi 753248084 gb KP316450.1  <i>Trichoderma gamsii</i> isolate SZMC 22662 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>ACCATACAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGC CGGAGGGACCAACCAAACTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAA TTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTA TTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGAT CGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAG TAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGTCCACGTCCGTAAAACACCAACTTCTGAAATGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA</p>
<b>KP316441</b>	<p>&gt;gi 753248075 gb KP316441.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 22663 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TATGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGACCAAG GCGCCCGCCGGAGGACCAATTTACAACTCTTTTGTATATCCCATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCTT TCTCGGCGCTCCTAGCGAGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCACCTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAG CCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGGCCGTAAAACAACCCAA ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT</p>
<b>KP316444</b>	<p>&gt;gi 753248078 gb KP316444.1  <i>Trichoderma longibrachiatum</i> isolate SZMC 22664 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCA TGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCAAACCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTT TATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAAC GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC ATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAAT ACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGC CACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA AGCAT</p>
<b>KP316445</b>	<p>&gt;gi 753248079 gb KP316445.1  <i>Trichoderma citrinoviride</i> isolate SZMC 22668 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCAT GGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCAAACCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTACGTCGCGGCTCTGTTT TTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGG ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT TTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATAC AGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCA CAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG ATATCAT</p>
<b>KP316442</b>	<p>&gt;gi 753248076 gb KP316442.1  <i>Trichoderma longibrachiatum</i> isolate SZMC 22669 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGATCCCA TGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCAAACCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTT TATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAAC GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC ATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAAT</p>

	ACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGGC CACAGCCGTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA AGCATAT
<b>KP316443</b>	>gi 753248077 gb KP316443.1  <i>Trichoderma longibrachiatum</i> isolate SZMC 22665 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGCGCGTTCGACGCCCGGATCCCA TGGCGCCCGCCGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTT TATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAAC GGATCTCTTGGTTCGTCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC ATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAAT ACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGGC CACAGCCGTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA AGCAT
<b>KP316446</b>	>gi 753248080 gb KP316446.1  <i>Trichoderma virens</i> isolate SZMC 22666 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence GTGACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGCGCGTTCGACGCCCGGACCAAGGCGC CCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTACTATCTGAGCCATCTCG GCGCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGG GGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCT CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAAC TCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
<b>KP316447</b>	>gi 753248081 gb KP316447.1  <i>Trichoderma virens</i> isolate SZMC 22667 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGCGCGTTCGACGCCCGGACCAAGGC GCCCCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTACTATCTGAGCCATCT CGGCGCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCC GGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACG CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAA CTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
<b>KP316448</b>	>gi 753248082 gb KP316448.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 22660 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTTCGACGCCCGGACCAAGGC GCCCCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTTATAATCTGAGCC TTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT GAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC CTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGT TCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAA ACACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
<b>KP316449</b>	>gi 753248083 gb KP316449.1  <i>Trichoderma virens</i> isolate SZMC 22659 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGAACGTTACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTTCGACGCCCGGACCAAGGC GCCCCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTACTATCTGAGCCATC TCGGCGCCCTCGTGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA

	CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTC CGGGGGGTCGCGCTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCGAG CCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCCAA ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
<b>KP316419</b>	>gi 753248053 gb KP316419.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 20974 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCG CCCCCGGAGGACCAATTTACAAACTCTTTGTATATCCCATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCTTTCT CGGCGCTCCTAGCGAGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCC GGGGGTCGCGCTTGGGGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCGAGCCT CTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGGCCGTAAAACAACCCAACT TCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
<b>KP316422</b>	>gi 753248056 gb KP316422.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 20977 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGG CGCCCGCGGAGGACCAATTTACAAACTCTTTGTATATCCCATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCTTT CTCGGCGCTCCTAGCGAGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCT CCGGGGGTCGCGCTTGGGGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCGAGC CTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGGCCGTAAAACAACCCAAA CTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
<b>KP316424</b>	>gi 753248058 gb KP316424.1  <i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate SZMC 20979 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence CTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCA ACCAAACCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAAT CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCA TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTA AGACGGGATCCCAGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAA CTCGACCCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTA AAAACACCCA ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
<b>KP316430</b>	>gi 753248064 gb KP316430.1  <i>Trichoderma gamsii</i> isolate SZMC 20985 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGGACCAA CCAAACTCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAAT CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCA TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTA AGACGGGATCCCAGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAA CTCGACCCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTA AAAACACCCA ACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
<b>KP316431</b>	>gi 753248065 gb KP316431.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 20986 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTTGCCTCGGCGGGATTCTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAA TTTACAAACTCTTTTGTATATCCCATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCTTTCTCGGCGCTCCTAGCGAG CGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGG GGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTT TGCACACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGGTCCACGGCCGTAAAACAACCCAACTTCTGAAATGTTGACCT CGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

<b>KP316433</b>	<p>&gt;gi 753248067 gb KP316433.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20988 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>ATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTTCGAGCCCCGGACCAAGGC  GCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTT  TCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCC  TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCT  CGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAA  CACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAT</p>
<b>KP316416</b>	<p>&gt;gi 753248050 gb KP316416.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 20971 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATTTCTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGACCAAGGCG  CCCGCCGGAGGACCAATTTACAAACTCTTTTGTATATCCCATCGCGGATCTTTACATTCTGAGCTTTCT  CGGCGCTCCTAGCGAGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG  ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCCTCC  GGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCT  CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACC GGGAGCGCGGCGCGTCCACGGCCGTAAAAACAACCCAAACT  TCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA</p>
<b>KP316418</b>	<p>&gt;gi 753248052 gb KP316418.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 20973 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATTTCTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCGGACCAAGGCG  CCCGCCGGAGGACCAATTTACAAACTCTTTTGTATATCCCATCGCGGATCTTTACATTCTGAGCTTTCT  CGGCGCTCCTAGCGAGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG  ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCCTCC  GGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCT  CTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACC GGGAGCGCGGCGCGTCCACGGCCGTAAAAACAACCCAAACT  TCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA</p>
<b>KP316420</b>	<p>&gt;gi 753248054 gb KP316420.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20975 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>GTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTTCGAGCCCCGGACCAAGGCGC  CCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTTC  TCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATC  GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA  CGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCCTC  CGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCG  CCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACA  CCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA</p>
<b>KP316427</b>	<p>&gt;gi 753248061 gb KP316427.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20982 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTTCGAGCCCCGGACCAAGGC  GCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTT  TCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA  TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCC  TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCT  CGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAA  CACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT</p>

<p><b>KP316435</b></p>	<p>&gt;gi 753248069 gb KP316435.1  <i>Trichoderma brevicompactum</i> isolate SZMC 20990 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  CTGTTGCCTCGGCGGGATTTCTGCCCGGGCGCGTTCGCAGCCCCGGACCAAGGGCGCCCGGAGGACCA  ATTTACAAACTCTTTTGTATATCCCATCGCGGATTCTTTACATTCTGAGCTTTCTCGGCGCTCCTAGCGA  GCGTTTTCGAAAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC  CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTG  GGGATCGGCACTTACCTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGT  TTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGCGCTCCACGGCCGTAAACAACCCAAACTTCTGAAATGTTGACC  TCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATACAATA</p>
<p><b>KP316439</b></p>	<p>&gt;gi 753248073 gb KP316439.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20994 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCG  CCCCCGGAGGACCAACCAAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTC  GGCGCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGA  TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG  CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCG  GGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCAGCGGGGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG  CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCC  AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG</p>
<p><b>KP316410</b></p>	<p>&gt;gi 753248044 gb KP316410.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20965 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TTTCACTCCAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGC  AGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTT  TTATAATCTGAGCCTTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGA  TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT  TCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGA  AATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGC  GTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT  AAGCATA</p>
<p><b>KP316412</b></p>	<p>&gt;gi 753248046 gb KP316412.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20967 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCG  CCCCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTT  CTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCAT  CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA  ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCT  CCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTC  GCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCTCCACAGCCGTTAAAC  ACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT</p>
<p><b>KP316413</b></p>	<p>&gt;gi 753248047 gb KP316413.1  <i>Trichoderma atroviride</i> isolate SZMC 20968 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  TTTAACTCCAACCAATGTGACCATAACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTTCAGCCCCGGGTGCCTCGCAG  CCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAACCTTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTT  CTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCG  ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCC  GGGGGTTCGGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCTAAGACGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTC  GCACAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCTCCACAGCCGTTAAAC</p>

	ACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
<b>KP316415</b>	>gi 753248049 gb KP316415.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20970 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCG CCCCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTT CTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTT CCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTC GCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGCCGTTAAAC ACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC
<b>KP316417</b>	>gi 753248051 gb KP316417.1  <i>Trichoderma koningii</i> isolate SZMC 20972 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACCATAACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGC CCGCCGAGGACCAACCAAACCTTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAA AAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA GTATTTAGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGG GATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCATGCG CAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAACACCCAACCTTCTGAAATG TTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
<b>KP316425</b>	>gi 753248059 gb KP316425.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20980 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGC GCCCGCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCT TCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCT TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCT CGCCGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGCCGTTAAA CACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
<b>KP316426</b>	>gi 753248060 gb KP316426.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20981 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCG CCCCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTT CTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTT CCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTC GCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGGTCCACAGCCGTTAAAC ACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
<b>KP316428</b>	>gi 753248062 gb KP316428.1  <i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate SZMC 20983 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGC CCGCCGAGGAACCAACCAAACCTTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAA AAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA GTATTTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGG GATCGGGAACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTGCGCA GTAGTTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGTCCACGTCCGTAACACCCAACCTTCTGAAATGTT

	TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATA
<b>KP316429</b>	>gi 753248063 gb KP316429.1  <i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate SZMC 20984 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACGTTACCAAACACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGC CCGCCGAGGAACCAACCAAACACTCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAA AATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAG TATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGG ATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCCATAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAG TAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAACCAACCAACTTTCTGAAATGTT GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
<b>KP316432</b>	>gi 753248066 gb KP316432.1  <i>Trichoderma citrinoviride</i> isolate SZMC 20987 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence TGTGACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTGCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATG GCGCCCGCCGAGGACCAACTCAAACACTTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCCTACGTCGCGGCTCTGTTTTA TTTTTGCTCTGACCTTTCTCGGCGACCTTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGG ATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT TTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATAC AGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGGCCA CAGCCGTAACACACCCCAAACCTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC ATATCA
<b>KP316436</b>	>gi 753248070 gb KP316436.1  <i>Trichoderma virens</i> isolate SZMC 20991 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence CTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGAGGACCA ACCAAAACTCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCTCGTGGG CGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAATAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGG GGATCGGCCCTTTACGGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCGCCTCTCCTGCGCAGTAG TTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGAC CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA
<b>KP316437</b>	>gi 753248071 gb KP316437.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20992 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence CTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGAGGACCA ACCTAAAACCTTATTGTATAACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGT AGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCCGGCGT TGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCT GCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAA TGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT
<b>KP316438</b>	>gi 753248072 gb KP316438.1  <i>Trichoderma koningiopsis</i> isolate SZMC 20993 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence CTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGAGGAACCA ACCAAACCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAAT CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAATGCGATAAGTAATG TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCA TGCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCA



	<p>CACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAAC  CGCACCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGG  TAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA</p>
<b>KP316410</b>	<p>&gt;gi 753248044 gb KP316410.1  <i>Trichoderma harzianum</i> isolate SZMC 20965 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</p> <p>TTTCACTCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGC  AGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTT  TTATAATCTGAGCCTTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTCAACAACGGA  TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT  TCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGA  AATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGC  GTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTT  AAGCATA</p>

## **Biografija autora**

Gordana Racić (rođ. Danilović) je rođena 1984.godine u Novom Sadu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu upisala je 2004.godine, a diplomirala je 2009.godine sa ocenom 8,48 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Iste godine upisala je master studije na Fakultetu zaštite životne sredine Univerziteta Edukons upisala je 2009.godine i odbranila master rad 2010.godine, čime je stekla zvanje analitičar zaštite životne sredine-master, nakon čega je upisala doktorske studije na Hemijskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu. Dobitnica je stipendije programa mobilnosti studenata Campus Europae, sa kojom je treću godinu osnovnih studija provela na Univerzitetu u Aveiru, Portugal. Tokom studija, pohađala je letnju školu biotehnologije na Tehničkom Fakultetu u Gracu, Austrija.

Od oktobra 2009. godine angažovana kao asistent na Fakultetu zaštite životne sredine i Fakultetu ekološke poljoprivrede na predmetima Osnove hemije i Hemija životne sredine, a od 2016.godine na predmetima Monitoring životne sredine, Biohemijski procesi u zaštiti životne sredine, Agrobiotehnologija i Biotehnologija u zaštiti životne sredine. Angažovana je na dva projekta Ministarstva prosvete i nauke (III43010 i III31080). U periodu od 2011-2016 bila je angažovana na jednom projektu prekogranične saradnje IPA, kao i 3 TEMPUS projekta. Takođe, pohađala je MASHAV program "Adapting To Climate Change: Biotechnology in Agriculture in a World of Global Environmental Change" na Univerzitetu u Jerusalimu (The Hebrew University of Jerusalem's Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food & Environment) u periodu Februar-April, 2012 godine.

Do sada je objavila 4 naučna rada u međunarodnim časopisima, od toga 1 u časopisu kategorije M21 i 3 u časopisima kategorije M23. Pored toga autor je i koautor tri rada u kategoriji M<sub>33</sub>, tri rada kategorije M51, kao i dva saopštenja na nacionalnom skupu štampana u celini (M<sub>63</sub>). Saopštenja na naučnim skupovima štampana u izvodu u listi referenci kandidata zastupljena su sa ukupno 15 naslova. Koautor je knjige OSNOVE HEMIJE-računanje u hemiji.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Гордана Рацић

број уписа 34/2010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Еколошко-биохемијска проучавања варијабилности аутохтоних врста гљива из рода *Trichoderma* у различитим типовима земљишта

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора \_ Гордана М. Рацић\_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_34/2010\_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_ биохемија\_\_\_\_\_

Наслов рада Еколошко-биохемијска проучавања варијабилности аутохтоних врста  
гљива из рода *Trichoderma* у различитим типовима земљишта

Ментор \_\_\_ проф. др Мирослав М. Врвић и проф. др Дејана Панковић\_

Потписана \_\_\_\_\_ Гордана М. Рацић \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Еколошко-биохемијска проучавања варијабилности аутохтоних врста гљива из рода *Trichoderma* у различитим типовима земљишта

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.