

# Najzastupljenije autohtone vrste roda *Trichoderma* iz rizosfere masline

---

Stvorić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:069231>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**NAJZASTUPLJENIJE AUTOHTONE VRSTE  
RODA *TRICHODERMA* IZ RIZOSFERE  
MASLINE**

DIPLOMSKI RAD

Martina Stvorić

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

**NAJZASTUPLJENIJE AUTOHTONE VRSTE  
RODA *TRICHODERMA* IZ RIZOSFERE  
MASLINE**

DIPLOMSKI RAD

Martina Stvorić

Mentorica: izv.prof.dr.sc. Snježana Topolovec-Pintarić

Komentorica: dr.sc. Ivana Kušan

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Martina Stvorić**, JMBAG 0125151736, rođen/a 15.01.1994. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**NAJZASTUPLJENIJE AUTOHTONE VRSTE RODA *TRICHODERMA* IZ  
RIZOSFERE MASLINE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE  
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Martina Stvorić**, JMBAG 0125151736, naslova

**NAJZASTUPLJENIJE AUTOHTONE VRSTE RODA *TRICHODERMA* IZ  
RIZOSFERE MASLINE**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

- |    |   |          |       |
|----|---|----------|-------|
| 1. | izv.prof.dr.sc. Snježana Topolovec-Pintarić | mentor   | _____ |
| 2. | dr.sc. Ivana Kušan                          | komentor | _____ |
| 3. | prof.dr.sc. Tihomir Miličević               | član     | _____ |
| 4. | izv.prof.dr.sc. Nataša Hulak                | član     | _____ |

## Zahvala

*Kad se osvrnem na kraju ovog putovanja, postajem emotivna. Postajem svjesna jednog čuda – kako se sve savršeno posložilo, ne samo vremenski, nego i u pogledu ljudi koji su ušli u moj život, baš u trenutku kad sam ih najviše trebala.*

*„Sto hiljada reči znam, al' jedna mi fali da nju kako treba opišem“ – neizmjerena hvala mojoj mentorici, nadasve cijenjenoj izv.prof.dr.sc. **Snježani Topolovec-Pintarić**. Ne mogu riječima izraziti koliko mi znači imati Vas u životu. Hvala što ste prepoznali u meni tinjajuću iskru i omogućili da se rasplamsa. Hvala što ste stvorili priliku za potaknuti strast u meni i što ste svjedočili mom rastu u stvarnom vremenu. Vaša svesrdna podrška, bez koje ništa ne bi bilo moguće, satkala je veličanstven put ispod zvijezda. Hvala što ste mi ukazali na vlastitu sposobnost pomicanja granica mogućeg. Zbog Vas nedvojbeno znam da je samo nebo granica.*

*„Ja nisam hteo da menjam svet deco, meni je ovaj bio dobar. Nisam virio u mikroskope, tragajući za virusima neotkrivenim, nisam listao enciklopedije, išao na prosek...“ – Ali, moja komentorica dr.sc. **Ivana Kušan** jest virila u mikroskope i hvala joj na tome. Velika hvala što ste mi omogućili suradnju s vodećim hrvatskim znantsvenim institutom. Hvala na velikoj pomoći prilikom izrade rada, bezrezervnoj podršci i strpljivosti. Hvala na svim savjetima i nastojanjima da me izgradite u vrsniju znanstvenicu i bolju osobu.*

*Voditelju Laboratorija za biološku raznolikost Instituta Ruđer Bošković, dr.sc. **Arminu Mešiću**, „u kostimu večnog dečaka“, velika hvala na prilici za radu u znanosti i uvijek ljubaznom gostoprimstvu. Hvala na predivnoj suradnji i mogućnosti da se stručno i znanstveno usavršavam.*

*Hvala dragom „čovjeku sa mesecom u očima“, **Nevenu Matočecu**, dipl.ing.biol., na svemu što me naučio dok smo „raspravljali mnoge stvari i kužili svijet“.*

*Hvala predivnim djevojkama, kolegicama doktorandicama s IRB-a, **Lucii Pole**, mag. ing. agr. i **Ani Pošti**, mag. ing. agr., koje su se pobrinule da se svakim svojim dolaskom osjećam kao doma. Hvala što ste mi osmijesima uljepšale dane i naučile me da „smešnih stvari se bojimo“. Iskreno cijenim sve stručne savjete, tople riječi i srdačne susrete.*

*Svim dušama uz koje me veže prijateljstvo, hvala od srca što su me podržavali i voljeli kad sama sebe nisam mogla. A svima onima koji na tom putu nisu opstali, hvala na svemu što su me naučili. Hvala Vasi Ladačkom što me naučio da „svi smo mi gospodari sveta, tu negde s dvadest i šest“.*

*Kada bih vam pričala o ljubavi ne biste mi vjerovali. Stoga, hvala mojoj obitelji na ljubavi koja nikada ne prestaje.*

*“In my life I have found two things of priceless worth – **learning** and **loving**. Nothing else – not fame, not power, not achievement for its own sake – can possibly have the same lasting value. For when your life is over, if you can say 'I have learned' and 'I have loved,' you will also be able to say 'I have been happy.’”*

*- Arthur C. Clarke (Rama II)*

*M. S.*

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
2. Pregled literature .....	3
2.1. Sistematika.....	4
2.2. Povijesni pregled .....	5
2.3. Problem identifikacije.....	9
2.3.1. Konvencionalne metode identifikacije.....	9
2.3.2. Molekularne metode identifikacije.....	10
2.4. Biologija vrsta iz roda <i>Trichoderma</i> .....	12
2.4.1. Stanište vrsta iz roda <i>Trichoderma</i> .....	12
2.4.2. Uloga i funkcija vrsta iz roda <i>Trichoderma</i> .....	13
2.4.3. Izgled micelarne kolonije .....	16
2.4.4. Opis anamorfa .....	17
2.4.5. Opis teleomorfa .....	19
3. Materijali i metode .....	20
3.1. Molekularna identifikacija.....	22
3.2. Analiza makroskopskih i mikroskopskih obilježja <i>Trichoderma</i> spp. ....	28
4. Rezultati .....	30
5. Rasprava .....	37
6. Zaključak.....	46
7. Popis literature.....	47
Životopis.....	67



## Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Martine Stvorić**, naslova

### **NAJZASTUPLJENIJE AUTOHTONE VRSTE RODA *TRICHODERMA* IZ RIZOSFERE MASLINE**

Benefitne gljive iz roda *Trichoderma* prirodno su prisutne u rizosfernom sloju tla i rasprostranjene širom svijeta. Ekonomski su važni organizmi jer se koriste kao biofertilizatori i kao bio-čimbenici u biofungicidima, čija se učinkovitost očituje u mehanizmima antagonizma: kompeticiji, mikoparazitizmu i antibiozi. Autohtone vrste iz roda *Trichoderma* imaju efikasniji antagonistički i biostimulativni učinak. U svrhu komercijalizacije autohtonih vrsta iz roda *Trichoderma* u bio-pripravke, vrste je potrebno identificirati te istražiti njihovu bioraznolikost i geografsku distribuciju. Iz deset uzoraka tla rizosfere mediteranskih maslinika izolirane su aksenične kulture gljiva. Utvrđeno je šest različitih autohtonih vrsta: *Trichoderma koningiopsis* agg., *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma paratroviride* i *Trichoderma* sp. (neidentificirana vrsta), a najzastupljenije su *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma koningiopsis* agg. Klasični opisi morfoloških značajki nedostatni su pri identifikaciji ovih askomiceta, stoga su nadopunjeni suvremenim molekularnim metodama – DNA-barkodiranjem genskih sekvenci ITS, *rpb2* i *tef1- $\alpha$* .

**Ključne riječi:** bioraznolikost, DNA-barkodiranje, Mediteranska regija, rizosfera

## Summary

Of the master's thesis - student **Martina Stvorić**, entitled

### **THE MOST COMMON INDIGENOUS SPECIES OF THE GENUS *TRICHODERMA* FROM THE OLIVE RHIZOSPHERE**

Beneficial fungi of the genus *Trichoderma* occur naturally in the rhizosphere layer of the soil and are distributed worldwide. These organisms are economically important because they are used as biofertilizers and bio-factors in biofungicides, the efficacy of which is manifested in the mechanisms of antagonism: competition, mycoparasitism and antibiotics. Indigenous species of the genus *Trichoderma* have a more effective antagonistic and biostimulating effect. To commercialize indigenous species of the genus *Trichoderma* in bioformulations, it is necessary to identify the species and to study their biodiversity and geographical distribution. Axenic fungal cultures were isolated from ten soil samples taken from the rhizosphere of Mediterranean olive trees. Six different indigenous species were identified: *Trichoderma koningiopsis* agg., *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma paratroviride* and *Trichoderma* sp. (unidentified species), and the most abundant were *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma koningiopsis* agg. Classical descriptions of morphological features are not good enough for the identification of these ascomycetes, so they are complemented by modern molecular methods – DNA-barcoding of gene sequences ITS, *rpb2* and *tef1-a*.

**Keywords:** biodiversity, DNA-barcoding, Mediterranean region, rhizosphere

## 1. Uvod

Živo je tlo osnova poljoprivredne proizvodnje. U njemu živi 95 % ukupne svjetske bioraznolikosti (Fierer, 2017.). Biološka raznolikost je okosnica života, a njen značaj je u sveukupnosti različitih vrsta koje u isto vrijeme obavljaju različite funkcije. Bioraznolikost omogućava uspješno funkcioniranje ekosustava i ima važnu ulogu u održavanju prirodne ravnoteže.

Trenutna geološka epoha Zemlje, antropocen („doba čovjeka“), obilježen je značajnim i neizostavnim utjecajem čovjeka na živi svijet. Veliki dio prirodnih tala pretvoren je u biome pod ljudskim utjecajem, koji sada predstavljaju oko 75 % svih tala na Zemlji (Ellis i Ramankutty, 2008.). Trend rapidnog smanjenja bioraznolikosti vrlo je alarmantan, a prema nekim istraživanjima dnevno izumire čak 200 vrsta (McNeely, 1992.).

Pitanje koliko vrsta gljiva postoji izazvalo je mnogo spekulacija, s brojkama koje se uglavnom kreću od 1,5 milijuna (Blackwell, 2011.) pa do 13,2 milijuna vrsta (Hyde, 2022.). Zabrinutost oko očuvanja bioraznolikosti dovela je do potpisivanja Konvencije o biološkoj raznolikosti 1992.g., stoga su bili potrebni precizniji podaci o broju vrsta svih skupina organizama. Već je 1825.g. švedski mikolog Elias Magnus Fries pretpostavio da će se gljive pokazati najbrojnijom skupinom (Petersen i Hawksworth, 2016.) – doduše u carstvu biljaka (analogno kukcima u carstvu životinja). Kasnijim spoznajama gljive su odvojene u zasebno carstvo *Fungi*, a predviđanje brojnosti pokazalo se točnim. Danas se relevantnim smatra stvarni raspon od 2,2-3,8 milijuna vrsta gljiva (Hawksworth i Lücking, 2017.). Trenutno je 148 000 identificiranih i prihvaćenih vrsta gljiva, većinom iz odjeljaka *Ascomycota* i *Basidiomycota* (Antonelli i sur., 2020.).

Gljive iz roda *Trichoderma* dominantni su članovi mikrobiote tla (Vinale i sur., 2008.). Osim njihove važne uloge u plodnosti tla, vrste iz roda *Trichoderma* poznate su kao benefitni organizmi izraženog antagonističkog djelovanja (korisni mikroorganizmi), zbog čega se često apliciraju u tlo kao bio-čimbenici. Na tržištu su prisutni kao aktivni sastojci biopesticida (fungicidi, nematocidi) i zasebno kao pojačivači rasta biljaka i biostimulatori prirodne otpornosti biljaka na bolesti, sa značajnim prednostima nad kemijskim mjerama. Gljive iz roda *Trichoderma* su mikroorganizmi koji se najčešće ispituju i primjenjuju u biološkoj zaštiti bilja (Błaszczyk i sur., 2014.).

Zbog te uske interakcije između različitih vrsta iz roda *Trichoderma* i ljudske aktivnosti postoji velika potreba za točnom identifikacijom tih vrsta. No, rod *Trichoderma* je iznimno raznolik na razini vrste (Bustamante i sur., 2021.; Japanis i sur., 2022.), što implicira otežanu identifikaciju vrsta. Što se tiče ekološke i poljoprivredne važnosti vrsta iz roda *Trichoderma*, prije svega je važno razumjeti njihovu bioraznolikost i biogeografiju, a pravilna identifikacija vrste preduvjet je za registraciju odgovarajućih bioloških pripravaka na bazi vrsta iz roda *Trichoderma*. Međutim, vrste iz roda *Trichoderma* nije moguće točno identificirati samo na temelju morfologije zbog velike sličnosti morfoloških karakteristika u blisko srodnim taksonima i sve većeg broja novoopisanih vrsta što je dovelo do brojnih pogrešnih identifikacija ili nemogućnosti identifikacije (Druzhinina i sur., 2005.; De Respini i sur., 2010.), ali i zbog sve većeg broja morfološki kriptičnih vrsta koje se mogu razlikovati samo kroz analizu njihovih DNA molekula (Atanasova i sur. 2010.; Samuels i sur. 2010.). S obzirom na sve navedeno, danas uobičajena praksa identifikacije vrsta iz roda *Trichoderma* objedinjuje podatke o molekularnim sekvencama (genske regije ITS, *rpb2* i *tef1-a*) u kombinaciji s morfološkim karakteristikama (Druzhinina i sur., 2005.; Samuels, 2006.; Kubicek i sur., 2008.; Samuels i Hebbbar, 2015.).

Bioraznolikost i geografska rasprostranjenost vrsta iz roda *Trichoderma* na području Hrvatske nedovoljno su poznate jer su bile istraživane samo sporadično (Jaklitsch i Voglmayr, 2015.). Za potrebe ovog istraživanja odabrani su višegodišnji nasadi maslina u mediteranskoj zoni Hrvatske, odnosno rizosfera tih maslinika, uz pretpostavku prisutnosti autohtonih vrsta iz roda *Trichoderma*.

## **1.1. Cilj istraživanja**

Istraživanje ima za cilj identifikaciju autohtonih vrsta iz roda *Trichoderma* prisutnih u rizosferi maslina Mediteranske regije Republike Hrvatske, suvremenim molekularnim metodama i temeljem makroskopskih i mikroskopskih obilježja, u svrhu procjene genetičke raznolikosti i zastupljenosti vrsta. Naime, u različitim agroekosustavima utvrđene su značajne razlike u sastavu vrsta iz roda *Trichoderma* na površinama pod različitim usjevima (Kredics i sur., 2014.; Jaklitsch i Voglmayr, 2015.). Također je razvijena bojazan od unosa bio-čimbenika *Trichoderma* spp. kao alohtonih vrsta zbog mogućeg negativnog utjecaja na bioraznolikost autohtonih mikroorganizama pa tako i na autohtone vrste iz roda *Trichoderma* (Brodeur, 2012.). Pretpostavka je da će se u izolatima iz rizosfere masline utvrditi autohtone vrste iz roda *Trichoderma*.

## 2. Pregled literature

Čini se da danas, više nego ikad prije, važnost istraživanja diverziteta u biologiji dobiva sve veći značaj. Alati u službi identifikacije i taksonomije svojti uvelike su napredovali od svojih početaka do danas. Cijenjeni su povijesni naponi znanstvenika i nadasve su fascinantna otkrića identifikacije i raspostranjenosti taksona uz pomoć tadašnjih skromnih i ograničenih resursa i pomagala koja su dovela do razvoja „utabanih staza“ taksonomije, kojima se većinom služimo i danas. Razumljive su i poneke krive identifikacije i nerazlikovanje vrsta zbog njihove srodnosti i sličnosti. Sustavnim propitkivanjima i ulaganjem u znanost te posljedično njenim razvojem i prosperitetnošću, kreirane su nove i preciznije metode determinacije vrsta.

Bioraznolikost je pokretač procesa ekosustava (Hillebrand i Matthiessen, 2009.), a uključuje bogatstvo vrsta, funkcionalnih skupina ili genotipova te izravno utječe na svojstva i procese ekosustava (Chapin i sur., 1997.). Fokus većine ideja o održavanju bioraznolikosti je suživot vrsta, uz nastojanja da se održi stabilnim (Chesson, 2000.; Hillebrand i sur., 2007.). Štoviše, bioraznolikost vrsta ima ulogu u pružanju dobara i usluga ljudskom društvu te stoga ima i ekonomsku vrijednost (Gamfeldt i sur., 2008.). Većina znanstvenika slaže se da je bioraznolikost općenito u opadanju na većini lokacija diljem Zemlje, posebno u područjima pod izravnim ljudskim utjecajem (Cardinale i sur., 2018.). Smatra se da će globalno smanjenje bioraznolikosti uzrokovano ljudskim djelovanjem nad ekosustavima promijeniti važne procese u njima te njihovo stanje i opstanak (Hillebrand i Matthiessen, 2009.). Ta činjenica čini biodiverzitet i njegovo očuvanje bitnom temom novijih istraživanja.

Rizosfera je biološki najaktivniji sloj tla i kao takav ima izravno djelovanje na korijen biljke, ali i biokemijske procese u tlu. „Zdravlje“ tla proizlazi iz međudjelovanja različitih procesa i svojstava, sa snažnim učinkom na aktivnost mikrobioma tla (Frąc i sur., 2018.). Mikrobna raznolikost prisutna u rizosferi temelj je održanja i očuvanja globalnih genetskih resursa (Colwell, 1997.). Iako su gljive važna skupina organizama unutar mikrobne raznolikosti, informacije o njima su ograničene, a trenutne procjene brojnosti vrsta gljiva značajno se razlikuju. Ovaj nedostatak osnovnih informacija o taksonomskoj raznolikosti ima značajne implikacije na mnoge aspekte evolucijske biologije. Iako se često koristi brojka od 1,5 milijuna procijenjenih vrsta gljiva, potrebno je istražiti njihovu biogeografsku distribuciju, razine endemizma i specifičnosti domaćina kako bi se mogla procijeniti globalna raznolikost gljiva (Mueller i Schmit, 2007.).

## 2.1. Sistematika

Rod *Trichoderma* čini veliki broj vrsta (preko 200 opisanih vrsta (Hernández-Rodríguez i sur., 2021.) filamentoznih gljiva (Brotman i sur., 2010.), karakterističnog izgleda „zelene plijesni“ (Slika 1.) (Samuels i sur., 2002.; Kredics i sur., 2021.). Pripadaju porodici *Hypocreaceae* u odjeljku *Ascomycota* (gljive mješinarke) (Index Fungorum, 2023.) – najvećem odjeljku u carstvu *Fungi* (Hill i sur., 2021.). Pregled sistematike prikazan je Tablicom 1.

Tablica 1. Klasifikacija roda *Trichoderma*.<sup>1</sup>

Carstvo	<i>Fungi</i> (gljive)
Podcarstvo	<i>Dikarya</i> (više gljive)
Odjeljak	<i>Ascomycota</i> (gljive mješinarke)
Pododjeljak	<i>Pezizomycotina</i>
Razred	<i>Sordariomycetes</i>
Podrazred	<i>Hypocreomycetidae</i>
Red	<i>Hypocreales</i>
Porodica	<i>Hypocreaceae</i>
Rod	<i>Trichoderma</i>



Slika 1. Makroskopski izgled gljive *Trichoderma* sp. u prirodi na kori.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> (Index Fungorum, 2023.)

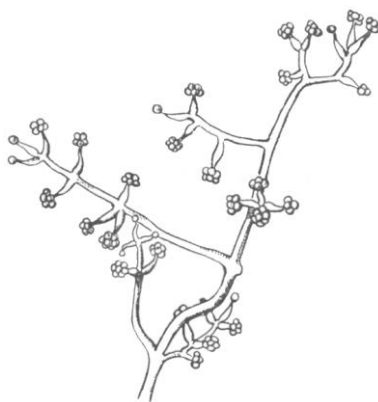
<sup>2</sup> (Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma>, pristupljeno 11.6.2023.)

## 2.2. Povijesni pregled

Naziv roda *Trichoderma* potječe od grčkih riječi: „thrix“ (kosa) i „derma“ (koža) (Pandya i sur., 2011.). Kao takvog ga je primijetio i opisao njemački mikolog Christiaan Hendrik Persoon 1794. godine na površini drveta u fazi truljenja (Topolovec-Pintarić, 2019.). Prikupljene u Njemačkoj, četiri vrste bile su *Trichoderma viride*, *Trichoderma nigrescens*, *Trichoderma aureum* i *Trichoderma roseum* (Bisby, 1939.). Izgled ovih vrsta opisuje se kao „brašnast“ i „dlakav“, a vrste se međusobno razlikuju bojama (Persoon, 1794.). Od četiri prvoopisane vrste u rodu *Trichoderma*, samo jedna (*Trichoderma viride*) danas pripada tome rodu, dok su ostale tri sinonimi od danas prihvaćenih vrsta *Xylohypha nigrescens* (= *Trichoderma nigrescens*), *Sporotrichum aureum* (= *Trichoderma aureum*) i *Trichothecium roseum* (= *Trichoderma roseum*) (Waghunde i sur., 2016.).

Vrste iz roda *Trichoderma* imaju pleomorfni životni ciklus, odnosno izmjenu anamorfnog i teleomorfog stadija (Jaklitsch i Voglmayr, 2013.). S obzirom na to da su anamorf i teleomorf samo različiti stadiji iste vrste, danas je na snazi međunarodni konzenzus „jedna gljiva – jedno ime“ (eng. „one fungus – one name“) (Gams i Jaklitsch, 2011.; Taylor, 2011.). U teleomorfnom (askogenom) stadiju ove askomicete su poznate pod nazivom roda *Hypocrea*, no naziv anamorfa (konidijalnog stadija) „*Trichoderma*“ je stariji te se smatra utilitarnijim i ima prednost pred imenom „*Hypocrea*“ (Samuels, 2006.).

Braća Tulasne su 1865. godine utvrdili povezanost anamorfa *Trichoderma* i teleomorfa *Hypocrea* (Schuster i Schmoll, 2010.; Topolovec-Pintarić, 2019.), odnosno povezanost vrsta *Trichoderma viride* i *Hypocrea rufa*, ilustrirajući konidiofore s fialidama koje vršno produciraju sferične ili jajolike konidije (Slika 2.) (Bisby, 1939.).



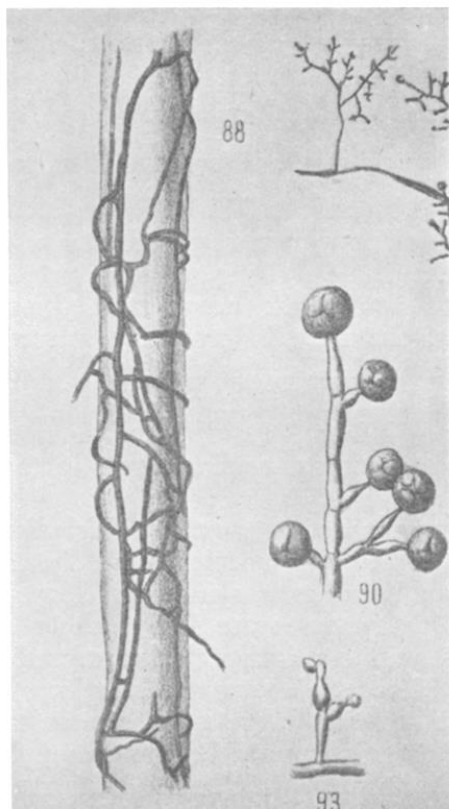
Slika 2. Ilustracija vrste *Trichoderma viride*, prema braći Tulasne iz 1865. g. <sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> (Bisby, 1939.)

Različite vrste pripisane rodu *Trichoderma/Hypocrea* bilo je toliko teško morfološki razlikovati da je čak predloženo reduciranje taksonomije na samo jednu vrstu – *Trichoderma viride* (Schuster i Schmoll, 2010.). Koliko je morfološka identifikacija, determinacija i nomenklatura vrsta *Trichoderma/Hypocrea* zahtjevna, potvrđuju mnoga povijesna istraživanja i usaglašavanja među znanstvenicima.

Dopunjeni opis roda *Trichoderma* predstavio je Harz 1871. godine. Opis je baziran na mikroskopskim karakteristikama, ali to je uključivalo samo jednu vrstu, *Trichoderma lignorum*, koja je danas sinonim od *Trichoderma viride*. Francuski mikolog Vuillemin je 1887. godine upotrijebio ime „*Acrostalagmus viridis*“ (iako to ime nije nigdje službeno objavljeno), primijetio je miris akseničnih kultura kao "prodoran, blago kamforan" i slikovito prikazao mikoparazitaciju vrste *Trichoderma viride* na hifu vrste *Mucor* sp. (Slika 3.). Unatoč toj spoznaji mikoparazitizma, rod *Trichoderma* je došao u fokus tek 47 godina kasnije, nakon članka o *Trichoderma lignorum* kao parazitu na fitopatogenoj vrsti *Rhizoctonia solani* i drugim gljivama u tlu (Weindling, 1934.).



Slika 3. Mikoparazitizam *Trichoderma* sp. na hifi *Mucor* sp., prema Vuillemin, 1887. g.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> (Izvor: Bisby, 1939.)



Osnivač moderne mikologije, Brefeld, je 1891. godine dokazao metodom akseničnih kultura da su askospore vrste *Hypocrea rufa* razvile vrstu *Trichoderma viride* kao konidijalni stadij, čime su potvrđena opažanja braće Tulasne o poveznici anamorfa i teleomorfa. Osim toga, Brefeld je također izvijestio o konidijalnom stadiju vrste *Hypocrea gelatinosa*.

Nizozemski botaničar i liječnik Oudemans je 1902. godine opisao vrstu *Trichoderma koningii* iz tla, nakon čega je vrsta pripisana rodu *Acrostalagmus* (Duche i Heim, 1931). Od 1902. godine vrsta *Trichoderma koningii* se pojavljuje u literaturi otprilike jednako kao i vrsta *Trichoderma viride*. Ipak, Lindau 1904. godine izražava sumnju u ispravnost svih naziva, osim *Trichoderma viride* i *Trichoderma koningii*. U svojim bilješkama Bainier 1906. godine također opisuje te vrste.

Također je prenio vrstu *Pachybasium hamatum* u rod *Trichoderma*, opisujući je kao *Trichoderma minutum* iz sekcije *Pachybasium*, no ti nazivi sekcija nisu danas prihvaćeni niti primjenjivani. Uslijed nemogućnosti razlikovanja vrsta na morfološkom nivou, Bisby ih 1939. godine definira kao „koncept jedne vrste” (Bisby, 1939.). Monotipski rod je bio aktualan sve dok Rifai 1969. godine nije klasificirao devet vrsta u rodu *Trichoderma* (Rifai, 1969.). Zapravo je Rifai zaslužan za prvi pravi generički opis roda *Trichoderma*, na temelju brzine rasta kolonije i mikroskopskih svojstava. Na temelju uzoraka grananja konidiofora i morfologije konidija podijelio je rod *Trichoderma* u devet agregata vrsta: *Trichoderma piluliferum*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachyatum*, *Trichoderma pseudokoningii* i *Trichoderma viride* (Waghunde i sur., 2016.).

Međutim, novu klasifikaciju je predložio Bissett 1984. godine grupiravši devet Rifaijevih vrsta u četiri sekcije: *Trichoderma* (Bissett, 1991. a), *Longibrachiatum* (Bissett, 1984.; Bissett, 1991. a; Bissett, 1991. c), *Saturnisporum* (Bissett, 1991. a), *Pachybasium* (Bissett, 1991. a; Bissett, 1991. b) i *Hypocreanum* (Bissett, 1991. a; Samuels, 2006.).

Istraživači Cook i Taubehaus su 1911. godine usporedili vrstu *Trichoderma koningii* s vrstom *Trichoderma lignorum*, pri čemu su utvrdili očigledne razlike. Nakon njih je Jensen 1912. godine ukratko opisao njihove razlike, a Dale ih je 1914. godine izolirala iz tla – čiju je bijelu formu nazvala *Trichoderma album*, za što je kasnije utvrđeno da nije bila *Trichoderma*. Znanstvenik Goddard je 1913. godine tu neutvrđenu vrstu opisao kao novu *Trichoderma nigrovirens*, za koju je rekao da je uobičajena gljiva u tlu, dok je Gilman i Abbott 1927. godine identificiraju kao *Trichoderma viride*, no sumnje nisu potvrđene. Nadalje, Waksman je 1916.

godine izolirao iz tla *Trichoderma* spp., sojeve I-V, s kratkim opisima morfoloških obilježja, pri čemu je soj I protumačen kao *Trichoderma koningii*, soj II kao *Trichoderma lignorum*, dok sojevi III, IV i V nisu bili imenovani.

Proučavajući sedam izolata *Trichoderma* spp. iz tla, Abbott ih je 1926. godine na temelju karakteristika razvrstao u zasebne četiri vrste: *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma koningii* i novoopisanu *Trichoderma glaucum*, a četvrta vrsta nije imenovana. Zaključci Abbotta su bez sumnje bili razumni u vrijeme kada je bilo manje dostupnih podataka o gljivama u tlu, no danas se zbog preciznosti i velikog broja vrsta u rodu *Trichoderma* koriste suvremene molekularne metode identifikacije.

## 2.3. Problem identifikacije

S obzirom na to da se gljive smatraju jednom od najraznolikijih skupina živih organizama na svijetu, a prema procjeni Aslam i sur. (2017.) broje 1,5 milijuna vrsta, potrebno je moći utvrditi vrste na pravilan način. Općenito su se kroz razvoj biologije paralelno razvijale klasične i molekularne metode identifikacije vrsta. Mikroskopske i makroskopske metode imaju određene nedostatke, ali i mnoge prednosti te ih se danas ne isključuje nauštrb molekularnih, već se koriste jedne i druge paralelno u integrativnoj taksonomiji. U identifikaciji vrsta iz roda *Trichoderma* vodeće su molekularne metode identifikacije.

### 2.3.1. Konvencionalne metode identifikacije

Za identifikaciju vrsta iz roda *Trichoderma* u počecima su korištene konvencionalne morfološke metode. To uključuje mikroskopsku analizu i opise anamorfnog stadija: hlamidospora i konidiogenih struktura – konidiofora, fjalida i konidija te makroskopske značajke kulture – linearni rast kolonije, boju kolonije, obrazac rasta i pigmentaciju hifa (Shah i Afiya, 2019.). Primjena takve metode rezultirala je vrlo sličnim i ponekim identičnim karakteristikama različitih vrsta *Trichoderma*. U morfološkim opisima najčešće se opisuje karakteristična zelena sporulacija, spominju se okrugle do elipsoidne konidije zelene boje i okrugle hlamidospore, a često se uspoređuju vrste međusobno uz veličinu konidija kao razlikovnu osobinu (Samuels i Hebbar, 2015.).

Također je ova metoda bila manjkava zbog problema premalog broja morfoloških obilježja (npr. kod kvasaca), zbog pojavnosti spolnog i nespornog stadija iste vrste i nemogućnosti da ih se „poveže“ koristeći samo mikroskopske analize te zbog konvergentnih morfologija (npr. dugovrati peritecij koji proizvodi ljepljive askospore odabrane za raspršivanje pomoću kukaca) (Blackwell, 2011.). Promatranje plodnih tijela gljiva prisutnih u okolišu ili kultura dobivenih izolacijom iz tla, kao načini konvencionalnih metoda imaju ozbiljna ograničenja za otkrivanje istinske bioraznolikosti u bilo kojem odabranom okruženju. Malo je vjerojatno da će se organizam koji postoji samo u obliku micelija u tlu identificirati izravnim promatranjem ako nije formirano plodno tijelo. Stoga će klasično promatranje kroz izravnu mikroskopiju dati znatno smanjenu mjeru stvarne bioraznolikosti u okolišu.

Uzgoj gljiva izoliranih iz tla rezultirat će samo otkrivanjem onih vrsta koje mogu rasti i sporulirati na korištenom mediju za izolaciju. No, ta metoda ima ograničenja jer se samo oko 17 % poznatih vrsta gljiva može uspješno uzgajati u kulturi. Izolacija gljive iz tla i njen uzgoj

također ne daje odgovor je li gljiva bila aktivni dio izvornog ekosustava ili je bila prisutna u neaktivnom stanju mirovanja (Bridge i Spooner, 2001.).

S obzirom na te probleme nepreciznosti (Druzhinina i Kubicek, 2005.) i činjenicu da ovakva elementarna metoda iziskuje mnogo utrošenog vremena i rada te poznavanje klasične taksonomije (Nilsson i sur., 2011.), a ne postiže željene rezultate, u identifikaciji gljiva počele su se komplementarno koristiti i suvremene molekularne metode (Bridge i Spooner, 2001.; Anderson i Cairney, 2004.).

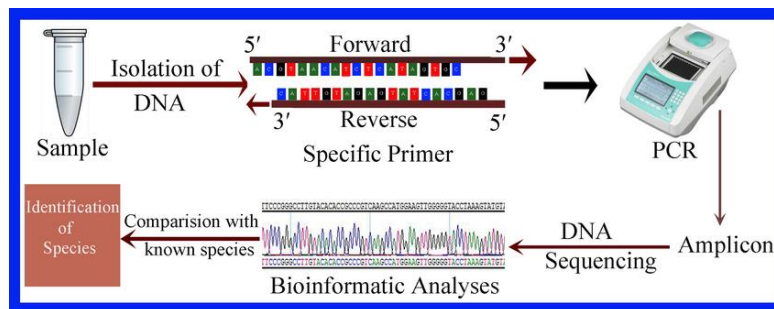
### **2.3.2. Molekularne metode identifikacije**

Razvoj molekularnih tehnika pružio je novi niz alata koji mogu pružiti jasan uvid u specifične interakcije i aktivnosti na različitim staništima pa tako i u tlu (Bridge i Spooner, 2001.). Više od 200 godina biolozi su raspravljali o tome koje organizme treba ubrojiti u gljive (Hawksworth, 1997.), a u manje od 5 godina molekularnim metodama otkriveno je mnoštvo novih markera za sekvenciranje DNA temeljem čega su opisani novi odjeljci u carstvu gljiva (Slika 4.). Upotreba molekularnih metoda dramatično je povećala znanje o bioraznolikosti gljiva u manje od 20 godina, otkrivajući monofiletsko porijeklo carstva *Fungi* i ističući razlike među svojstama (Blackwell, 2011.).

Upotreba molekularne metode PCR bila je ogroman napredak za identifikaciju vrsta (Aslam i sur., 2017.). Ova tehnika omogućuje sintetiziranje specifičnog dijela DNA u milijunima kopija kroz izmjenu ciklusa denaturacije, vezivanja i elongacije korištenjem specifičnih primera (Erlich, 1989.). Primeri su kratki oligonukleotidi, tzv. početnice, a upravo su „univerzalni primeri“, izrazito popularni ranih 1990-ih, zapravo bili dizajnirani za gljive (Innis i sur., 1990.; White i sur., 1990.).

Nakon toga slijedi DNA barkodiranje (Slika 4.). To je molekularna dijagnostička tehnika u kojoj se mali segment DNA koristi za identifikaciju vrsta svih domena života (Moritz i Cicero, 2004.). Dobivene regije „crtičnog koda“ pokazuju odgovarajuću varijaciju sekvence DNA za razlikovanje različitih vrsta (Aslam i sur., 2017.). U DNA barkodiranju standardizirane sekvence od 500-800 parova baza (Begerow i sur., 2010.; Pino-Bodas i sur., 2013.) koriste se za identifikaciju vrsta s markerima važećim za širok raspon taksonomskih skupina (Krishnamurthy i Francis, 2012). Za organizme kao što su gljive, bakterije i alge, ova metoda temeljena na PCR-u nije samo korisna za prepoznavanje uzgojenih vrsta, već se koristi i za identifikaciju divljih vrsta iz prirodnog okoliša (Aslam i sur., 2017.). Identifikacija vrsta

pomoću DNA barkoda ovisi o broju predstavnika prisutnih u bazi podataka. Pomoću DNA barkodiranja, gljive se mogu identificirati u fazama životnog ciklusa koje nisu prikladne za morfološku identifikaciju.



Slika 4. Izolacija DNA, PCR reakcija i DNA barkodiranje. <sup>5</sup>

Učinkovitost barkodiranja oslanja se na ovu pretpostavku da su genetske varijacije unutar vrste puno manje od varijacija između vrsta. Gljive koje nisu prikladne za detekciju i morfološku identifikaciju mogu se identificirati i otkriti na molekularnoj razini DNA barkodiranjem. U ovoj tehnici, učinkovit marker je od velike pomoći u identificiranju slabo poznate raznolikosti gljivljih vrsta u prirodnom okruženju (Roe i sur., 2010). Za identifikaciju gljiva DNA barkodiranjem najčešće se koriste specifični barkod lokusi odnosno genske regije: ITS (eng. Internal transcribed spacer), *rpb2* i *tef1- $\alpha$*  (Chaudhary i Dahal, 2017.). Barkod ITS je interna transkribirana razmaknica DNA (Lindhahl i sur., 2013.) smještena između male podjedinice ribosomske RNA (rRNA) i velike podjedinice rRNA gena u kromosomu (Gatehouse i Malone, 1998.). Genska regija *rpb2* je dio gena s jednom kopijom koji kodira drugu najveću podjedinicu RNA polimeraze II (Větrovský i sur., 2016.). Genska regija *tef1- $\alpha$*  je faktor produljenja (elongacije), tj. kodira za protein produljenja translacije izražen među eukariotima (Baldauf i Palmer, 1993.; Seifert, 2009.). Genska regija *rpb2* je varijabilnija od *tef1- $\alpha$*  (Matheny i sur., 2007.).

Važno je istaknuti da su mnoga nova otkrića poduprla prethodne hipoteze koje su se temeljile na morfološkim dokazima (Alexopoulos i sur., 1996.; Stajich i sur., 2009.). Korištenje molekularnih filogenetskih metoda u kombinaciji s konvencionalnim metodama bolji je pristup za provjeru izolata i identifikacija novih sojeva (Soesanto i sur., 2011.), nego same morfološke značajke (anamorf i teleomorf), koje su u svrhu definiranja vrsta dosegle svoje granice (Samuels, 2006.).

<sup>5</sup> (Izvor: Chaudhary i Dahal, 2017.)

## **2.4. Biologija vrsta iz roda *Trichoderma***

### **2.4.1. Stanište vrsta iz roda *Trichoderma***

Vrste iz roda *Trichoderma* široko su rasprostranjene u svijetu (Montalvão i sur., 2020.), smatraju se kozmopolitima (Esposito i Silva, 1998.; Grondona i sur, 2004.) i ubikvistima (Kerroum i sur., 2015.), organizmima s velikom sposobnošću prilagodbe najrazličitijim ekološkim uvjetima zahvaljujući velikoj genetskoj i ekološkoj raznolikosti (Tripathi i sur., 2013.).

Velika većina vrsta gljiva vjerojatno će se pojaviti u tlu u nekoj fazi njihovog životnog ciklusa (Bridge i Spooner, 2001.), stoga se tlo smatra izvorom bioraznolikosti gljiva (Waksman, 1922.; Gilman, 1957.; Kirk i sur., 2004.; Domsch i sur., 2007.). Iako vrste *Trichoderma* najčešće nastanjuju tlo u zoni rizosfere (Ru i Di, 2012.), gdje su izrazito rizokompetitivne u interakciji s mikrobiomom tla (Brotman i sur., 2010.), mogu biti i stanovnici podzemnih i nadzemnih dijelova biljaka (Mukherjee i sur., 2013. a), trulih stabala (Kubicek i sur., 2008.; Jaklitsch, 2009.), sedimenata, drugih gljiva i podloga (Ma i sur., 2020.). Poznati su kao razlagači organske tvari (Cox i sur., 2001.; Druzhinina i sur., 2006.), zbog čega su se dugo smatrale saprotrofima tla od male praktične važnosti (Harman i sur., 2004.; Mukherjee i sur., 2013. a). Naravno, takva generalizacija bila je pogrešna i mnoge vrste *Trichoderma* danas su prepoznate kao mikoparaziti i endofiti drvenastih biljaka (Evans i sur., 2003.; Howell, 2003.; Harman i sur., 2004.; Samuels i sur., 2006.; Bailey i Melnick, 2013.; Chaverri i Samuels, 2013.). Gljive, dakle, imaju mnogo različitih funkcija u tlu – aktivne faze, kao što je razgradnja mrtvog biljnog materijala ili neaktivne faze – propagule gljiva prisutne su tlu u stanju mirovanja (Bridge i Spooner, 2001.).

## 2.4.2. Uloga i funkcija vrsta iz roda *Trichoderma*

Premda se ubrajaju u slobodnoživuće organizme (Harman i sur., 2004.; Montalvão i sur., 2020.), zapravo mogu biti oportunistički (Topolovec-Pintarić i sur., 2011.) bezopasni biljni komenzali i avirulentni pravi biljni simbionti (Guzmán-Guzmán i sur., 2019.). Pospješuju obrambeni sustav biljke na različite načine: poticanjem otpornosti domaćina na biljne štetnike, promicanjem tolerancije na abiotske stresove, povećanjem rasta biljaka i fotosintetske sposobnosti, pridonoseći raspoloživosti hranjivih tvari za dobrobit biljke domaćina (Vinale i sur., 2008.; Lorito i sur., 2010.; Shoresh i sur., 2010.; Hermosa i sur., 2012.; Mastouri i sur., 2012.; Harman i sur., 2021.; Ikram i sur., 2019.; Kiarie i sur., 2020.). Osim toga, neke vrste iz roda *Trichoderma* koriste se kao proizvođači enzima, antibiotika i heterolognih proteina za hranu, stočnu hranu, u tekstilnoj industriji i za industriju biogoriva (celulaze, hemicelulaze) (Samuels, 1996.; Almeida i sur., 2007.; Cheng i sur., 2012.; Lopes i sur., 2012.; Mukherjee i sur., 2013. b). Osim navedenog, zabilježene su poneke vrste *Trichoderma* kao uzročnici infekcija ljudi (*Trichoderma longibrachiatum*) (Sautour i sur., 2018.) i životinja (Samuels, 1996.; Kuhls i sur., 1999.; Kredics i sur., 2003.), a neke uzročnici ekonomski značajnih gubitaka u komercijalnim uzgajalištima jestivih gljiva (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma pseudokoningii*) (Slika 5.) (Samuels i sur., 2002.; Park i sur., 2006.; Kim i sur., 2012. a; Kim i sur., 2012. b; Colavolpe i sur., 2014., Kim i sur., 2019.).



Slika 5. Vrsta *Trichoderma* sp. kao uzročnik zelene plijesni u proizvodnji šampinjona. <sup>6</sup>

<sup>6</sup> (Izvor: <https://horticulture.ahdb.org.uk/knowledge-library/trichoderma-aggressivum-in-mushrooms>, pristupljeno 23.6.2023.)

Mogući su različiti odnosi prema vrsti biljke koja je uključena u interakciju s *Trichoderma* spp., (Stewart i Hill, 2014.), tj. učinak *Trichoderma* spp. u kombinaciji s korijenom biljke može biti neutralan, patogen ili koristan (Druzhinina i sur., 2011.). Ipak, većina ovih gljiva su benefitetni oportunistički organizmi (Topolovec-Pintarić, 2019.), avirulentni biljni simbionti koje odlikuje sposobnost brzog razmnožavanja i efikasna kolonizacija supstrata (Sood i sur., 2020.). Također, mnoge vrste iz roda *Trichoderma* se koriste kao biološka sredstva za poboljšanje klijavosti sjemena i učinkovitosti korištenja hranjiva, prekidanje dormancije sjemena te kao izvor transgena i tvari herbicidnog djelovanja, a odavno je poznato da poboljšavaju rast biljaka kroz proizvodnju fitohormona i određenih sekundarnih metabolita (Harman i sur., 2004.; Shores i sur., 2010.).

S agronomskog gledišta, vrste *Trichoderma* najznačajnije su zbog parazitskog djelovanja na druge gljive (mikoparaziti) (Abdullah i sur., 2021.; Samuels, 2006.), zbog čega se smatraju korisnim mikroorganizmima u agronomiji (López-Bucio i sur., 2015.; Topolovec-Pintarić, 2019.). Neke se vrste *Trichoderma* spp. naširoko koriste kao učinkovita sredstva za biološko suzbijanje nekih biljnih patogena (Harman i sur., 2004.; Hasan i sur., 2012.; Liu i sur., 2012.), posebno u inozemstvu – Indija, Kina (Topolovec-Pintarić, 2019.).

Značajne rezultate postižu u suzbijanju: *Fusarium* spp., (Louzada i sur., 2009.; Sharma, 2011.; Topolovec-Pintarić i sur., 2013.), *Sclerotinia sclerotiorum* (Louzada i sur., 2009.; Topolovec-Pintarić i sur., 2013.; Haddad i sur., 2017.), *Botrytis cinerea* (Topolovec-Pintarić i sur., 2013.), *Rhizoctonia solani* (Hwang i Benson, 2003.; Topolovec-Pintarić i sur., 2013.), *Pythium* spp. (Harman, 1994.; Liu i sur., 2009.; Astuti i sur., 2021.), *Macrophomina phaseoli* (Aly i sur., 2007.; Mendonza i sur., 2015.), *Phytophthora cactorum* (Hajieghrari i sur., 2008.) i *Alternaria solani* (Matei i sur., 2011.; Manjunath i sur., 2017.). Biljni patogeni koji su stanovnici tla (engl. „soil-borne“) smatraju se najzahtjevnijim segmentom biološkog suzbijanja (Katan, 2000.) jer se u nedostatku biljnog domaćina održavaju na različitim organskim ostacima u tlu i uzročnici su značajnih ekonomskih gubitaka (Mihajlović i sur., 2017.) u poljoprivrednoj proizvodnji (Topolovec-Pintarić i Sušinjak, 2005.).

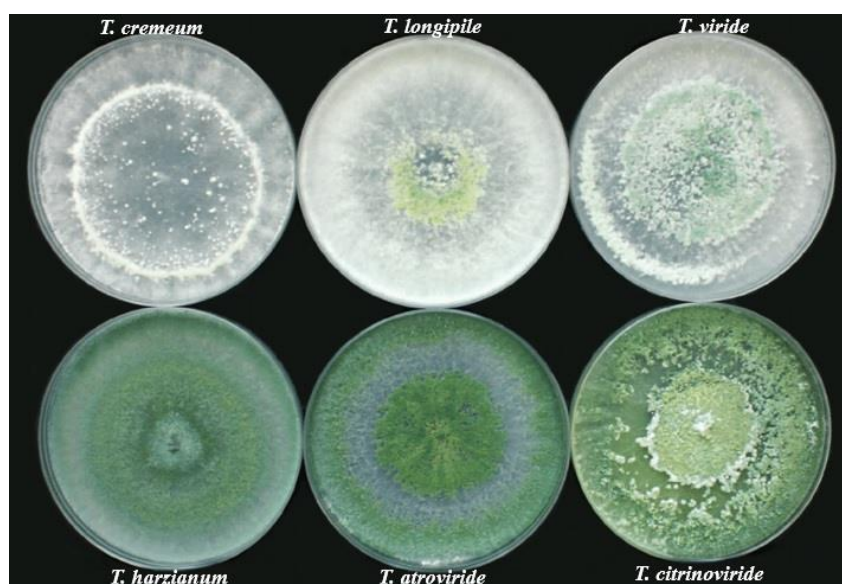


Mehanizmi antagonizma (Nusaibah i Musa, 2019.) na kojima se temelji učinkovitost vrsta *Trichoderma* u sprječavanju rasta i razvoja drugih gljivičnih vrsta su: kompeticija, parazitizam i antibioza (Sharma, 2011.; Sharma i sur., 2014.; Sood i sur, 2020.). Oni se aktiviraju zbog prisutnog kompetitivnog rizosfernog mikrobioma (Topolovec-Pintarić i Sušinjak, 2005.; Topolovec-Pintarić, 2019.). Direktna kompeticija je konkurentni odnos, nadmetanje, natjecanje dvije ili više vrsta, zbog ograničenih resursa i prostora, pri čemu antagonisti potiskuju patogene organizme. Mikoparazitizam (grč. *mykes*: gljiva; grč. *parásitos*: koji jede pokraj) podrazumijeva hranjenje gljivama (Mukherjee i sur., 2022.) Antibioza je antagonistički odnos između organizama u kojem je jedan inhibiran toksičnim metabolitima drugog organizma (Bailey i sur., 2008.).

Biološki pripravci za zaštitu bilja važan su segment alternativne zaštite bilja, a među njima se ističu biopripravci na bazi vrsta iz roda *Trichoderma* (Topolovec-Pintarić i sur., 2008.; Topolovec-Pintarić i Borovec, 2008.). Biofungicidi na bazi *Trichoderma* spp. danas su zastupljeni s više od 250 proizvoda dostupnih diljem svijeta i čine oko 60 % međunarodnog tržišta biofungicida (Topolovec-Pintarić, 2019.). Većina takvih bioloških pripravaka sadrži vrstu *Trichoderma harzianum* (83 %), od čega je 55 % kombinacija s *Trichoderma viride*, a 28 % kombinacija s *Trichoderma koningii*, a pripravci se najviše koriste u Indiji, Brazilu, Venezueli i Kubi (Woo i sur., 2014.). Naširoko korištene vrste *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma viride* (Topolovec-Pintarić i sur., 2004.; Fraceto i sur., 2018.) uglavnom se primjenjuju za tretiranje tla u oko 87 različitih vrsta usjeva protiv 70 patogena koji se prenose tлом i 18 folijarno prenosivih patogena, uglavnom gljiva (Sharma i sur., 2014.). Rezultati nekih istraživanja pokazuju 100 %-tnu učinkovitost *Trichoderma*-biofungicida u suzbijanju patogena *Fusarium* spp. (Sudantha i Suwardji, 2021.).

### 2.4.3. Izgled micelarne kolonije

Većina kultura *Trichoderma* spp. obično brzo rastu (Gams i Bissett, 2002.) na 25-30 °C (Leelavathi i sur., 2014.; Samuels i Hebbar., 2015.), a pojedine vrste (*Trichoderma reesei*) rastu na 45 °C (Tenkanen i sur., 1992.). Kolonije su isprva prozirne na mediju CMD (dekstrozni agar od kukuruznog brašna) ili bijele na bogatijim medijima poput PDA (krumpirov dekstrozni agar) (Leelavathi i sur., 2014.; Jain i sur., 2017.). U početku inkubacije kolonije obično razvijaju žuti do narančasti pigment koji se može izlučiti u agar, osobito na PDA (Jaklitsch i sur., 2012.), no ubrzo poprimaju zelenu boju karakterističnu za rod *Trichoderma* (Bissett, 1991.; Samuels i Hebbar., 2015.) (Slika 6.). Zračni micelij se opisuje kao paučinast ili izgleda poput vune (Seaby, 1996.; Gams i Bissett, 2002.). Sporulacija je kod nekih vrsta vidljiva već nakon četiri dana inkubacije (*Trichoderma stromaticum*) (Sanogo i sur., 2002.), a kod većine vrste formira se unutar jednog tjedna (Park i sur., 2006.; Cavalcante i sur., 2008.), u nijansama zelene ili žute ili rjeđe sive i bijele boje (Greenshpan i Galun, 1971.; Bissett, 1984.; Chaverri i sur., 2003.). Neke vrste iz roda *Trichoderma* proizvode karakterističan slatkasti miris kokosa (Jaklitsch i Voglmayr, 2015.; Samuels i Hebbar., 2015.), svojstven biološki aktivnom hlapivom spoju 6-pentil- $\alpha$ -pironu (Brotman i sur., 2010.; Lee i sur., 2016.), a neke kolonije mirišu na kamfor (Gams i Bissett, 2002.). Takvi volatilni sekundarni metaboliti gljiva iz roda *Trichoderma* također pokazuju antifungalno djelovanje (Santra i sur., 2023.), a kamfor je poznat i po svom insekticidnom djelovanju.

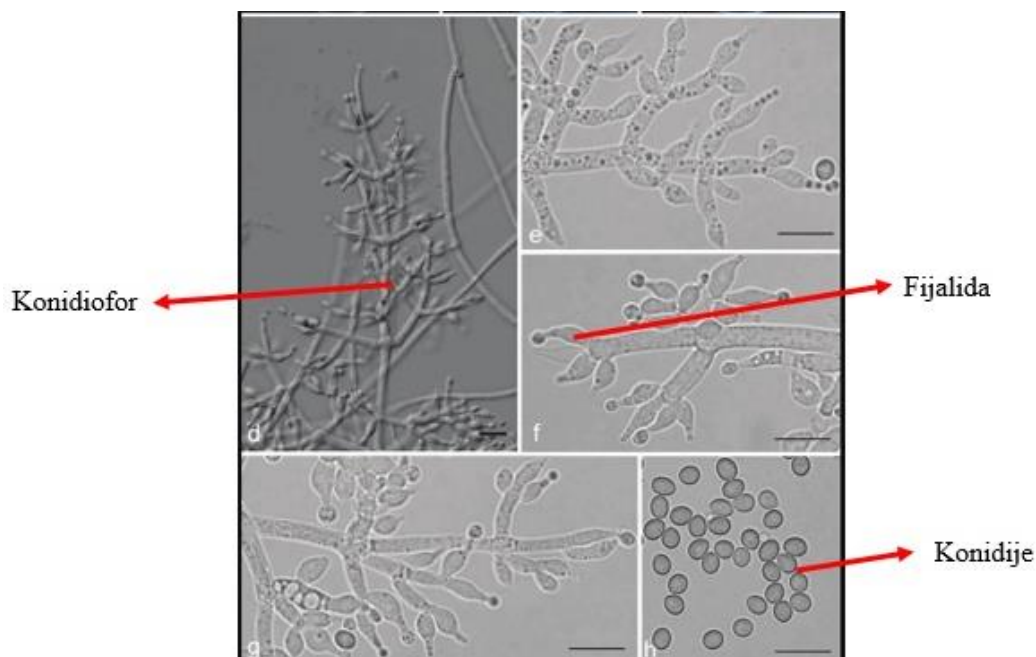


Slika 6. Izgled micelarnih kolonija različitih vrsta iz roda *Trichoderma*.<sup>7</sup>

<sup>7</sup> (Błaszczuk i sur., 2014.)

#### 2.4.4. Opis anamorfa

Vrste iz roda *Trichoderma* u anamorfnom stadiju životnog ciklusa stvaraju jako razgranate konidiofore (Chaverri i sur., 2003.; Samuels i Hebbar., 2015.). Konidiofori na vrhovima nose fialide koje produciraju konidije (Slika 7.).



Slika 7. Tipičan izgled anomorfa *Trichoderma* sp.<sup>8</sup>

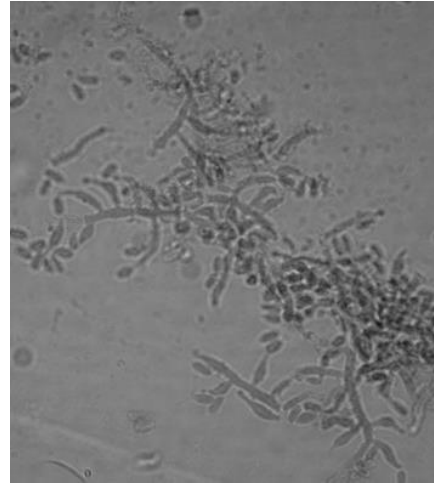
Konidiofori vrsta iz roda *Trichoderma* običnu su razgranati, a glavne grane konidiofora proizvode bočne grane koje mogu biti uparene ili ne (Gams i Bissett, 2002.). Grane se mogu ponovno granati, pri čemu su sekundarne grane često uparene, a najduže sekundarne grane su najbliže glavnoj osi (Samuels i sur., 2002.). Sve primarne i sekundarne grane nastaju pod ili blizu 90 ° u odnosu na glavnu os (Bissett, 1991., Kumar i sur., 2012.; Siddiquee, 2017.). Tipični konidiofor s uparenim granama poprima piramidalni izgled (Slika 8.) te obično završava s jednom ili nekoliko fialida (Samuels i Hebbar., 2015.).

<sup>8</sup> (Qiao i sur., 2018.)

Fijalide, konidiogene stanice vrsta iz roda *Trichoderma*, obično su proširene u sredini, ali mogu biti cilindrične, poput ampule ili gotovo subglobozne (Suryani i sur., 2012.; Samuels i Hebbar., 2015.). Fijalide mogu biti gusto skupljene na širokoj glavnoj osi (Slika 8.), poput vrsta *Trichoderma polysporum* (Zhu i sur., 2020.) i *Trichoderma hamatum* (Jaklitsch i Voglmayr, 2015.) ili mogu biti pojedinačne (Slika 9.), kao kod vrste *Trichoderma longibrachiatum* (Santillan Salas i sur., 2011.).

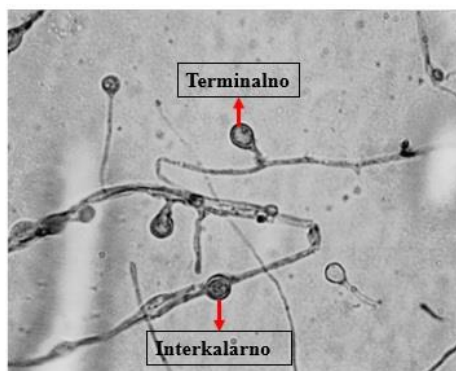


Slika 8. Grupirane fijalide vrste *Trichoderma hamatum*.<sup>9</sup>



Slika 9. Pojedinačne fijalide vrste *Trichoderma longibrachiatum*.<sup>10</sup>

Konidije su jednostanične, tipično zelene ili ponekad hijaline, a njihov oblik varira od okruglastog do elipsoidnog i cilindričnog. Hlamidospore mogu proizvoditi sve vrste, terminalno ili interkalarno (Slika 10.) (Gams i Bissett, 2002.).



Slika 10. Hlamidospore vrste *Trichoderma longibrachiatum*, terminalnog i interkalarnog položaja.<sup>11</sup>

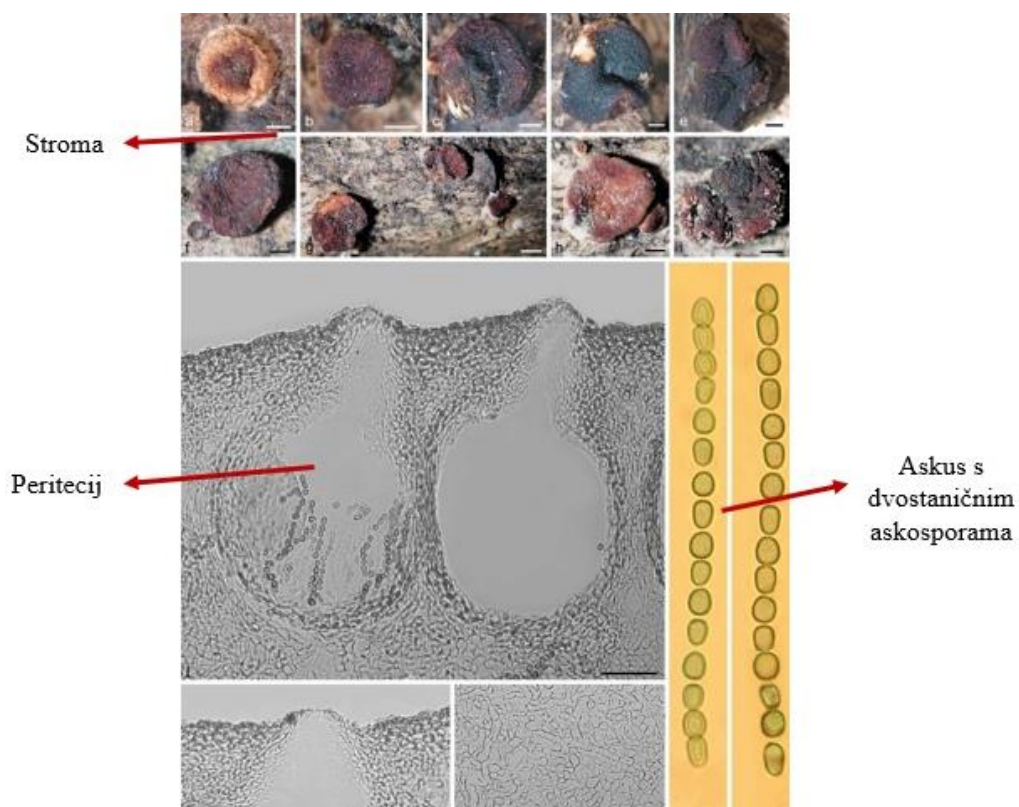
<sup>9</sup> (Jaklitsch i Voglmayr, 2015.)

<sup>10</sup> (Santillan Salas i sur., 2011.)

<sup>11</sup> (Tang i sur., 2003.)

### 2.4.5. Opis teleomorfa

Teleomorfi vrsta iz roda *Trichoderma* su poznati pod nazivom roda *Hypocrea* (Hermosa i sur., 2012.). Karakterizira ih stvaranje potpuno uronjenih peritecija (Lu i sur., 2004.) u mesnate strome (Samuels i Lodge, 1996.), svijetlo ili tamno smeđe, žute ili narančaste boje (Samuels i sur., 1994.; Jaklitsch i sur., 2013.). Tipično je stroma konveksno diskoidna (Rifai i Webster, 1966.) u suhom stanju, a planarna do jastučasta u svježem, živom stanju. Kruškoliki periteciji sadrže askuse, a u svakom askusu se nalazi 8 askospora – u ranom stadiju zbog septiranosti djeluje kao da ima 16 askospora (Samuels i sur., 1994.). Askospore su dvostanične (Webster, 1964.), hijaline (Zhu i Zhuang, 2015. a) ili zelene (Chaverri i sur., 2003.; Zhu i Zhuang, 2015. b). Askogeni teleomorfni stadij *Trichoderma* sp. prikazan je Slikom 11.



Slika 11. Izgled teleomorfa *Trichoderma* sp.<sup>12</sup>

<sup>12</sup> (Zhu i Zhuang, 2015. b)

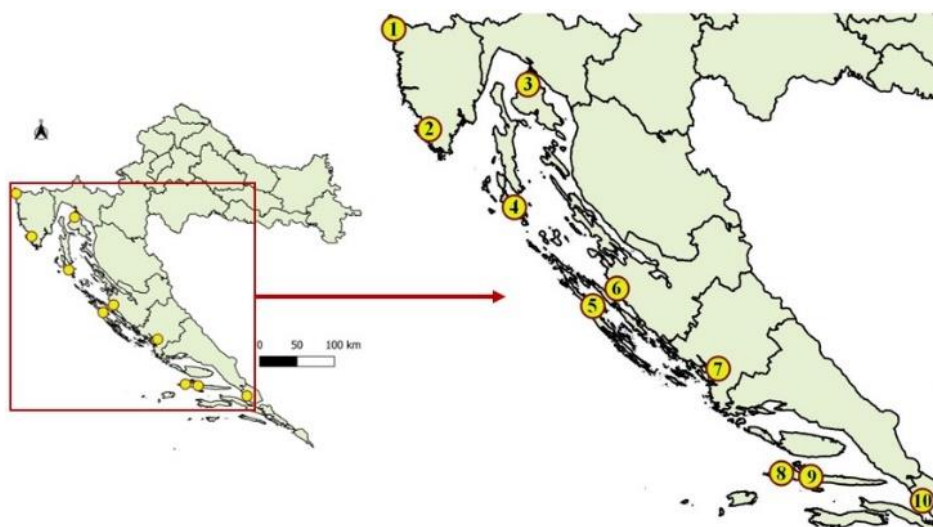
### 3. Materijali i metode

Istraživanje zastupljenosti vrsta iz roda *Trichoderma* u rizosferi masline s različitih lokacija Mediteranske regije Hrvatske provedeno je u laboratoriju Zavoda za fitopatologiju Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta i u Laboratoriju za biološku raznolikost Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković.

Za potrebe ovog istraživanja u vrijeme vegetacije je prikupljeno 10 uzoraka tla iz rizosfere masline (0-25 cm dubine) na 10 različitih lokaliteta u Mediteranskoj regiji Republike Hrvatske, prema metodi uzorkovanja Friedl i Druzhinina (2012.). Točne lokacije prikupljanja uzoraka odnosno geografske koordinate određene su pomoću GPS uređaja i prikazane Tablicom 3. i na karti Hrvatske Slikom 12.

Tablica 3. Lokacije uzorkovanja tla u Mediteranskoj regiji RH s pripadajućim koordinatama.

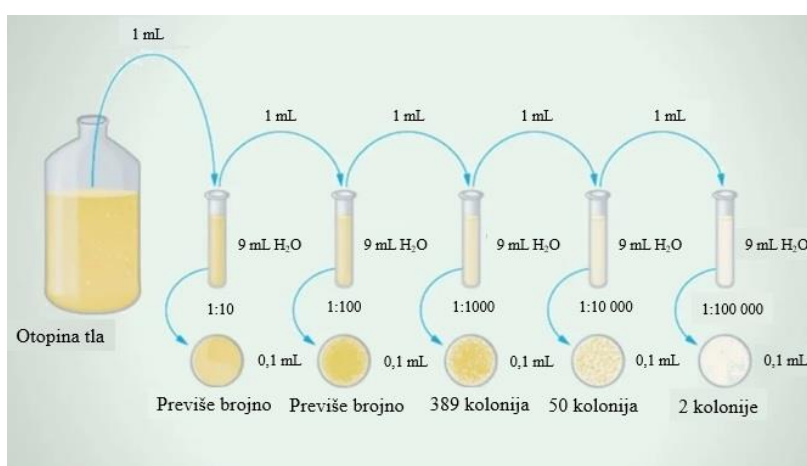
Lokacija	Županija	Koordinate	Kultura
1. Umag	Istarska	45°26'01.6"N 13°32'15.6"E	Maslina
2. Fažana	Istarska	44°55'18.4"N 13°49'40.7"E	Maslina
3. Njivice	Primorsko-goranska	45°10'04.6"N 14°33'00.0"E	Maslina
4. Mali Lošinj	Primorsko-goranska	44°31'53.7"N 14°28'19.3"E	Maslina
5. otok Rava	Zadarska	44°01'44.6"N 15°03'46.5"E	Maslina
6. Zadar	Zadarska	44°07'17.7"N 15°14'15.1"E	Maslina
7. Primošten ind. zona	Šibensko-kninska	43°42'45.9"N 15°58'50.9"E	Maslina
8. Hvar	Splitsko- dalmatinska	43°10'22.6"N 16°26'28.0"E	Maslina
9. Hvar	Splitsko- dalmatinska	43°09'15.1"N 16°39'09.7"E	Maslina
10. Neretva	Dubrovačko- neretvanska	43°01'33.0"N 17°27'17.5"E	Maslina



Slika 12. Lokacije uzorkovanja tla u Mediteranskoj regiji RH: 1. Umag, 2. Fažana, 3. Njivice, 4. Mali Lošinj, 5. otok Rava, 6. Zadar., 7. Primošten industrijska zona, 8. Hvar, 9. Hvar, 10. Neretva (Izrađeno u programu QGIS 3.22.5-Białowieża).<sup>13</sup>

<sup>13</sup> (Foto: I. Kušan)

Prikupljeni uzorci tla su pakirani u plastične vrećice radi zadržavanja vlage i transportirani u laboratorij. Uzorci su obrađeni sljedeći dan ili pohranjeni u hladnjaku na 4 °C za buduću izolaciju. U laboratoriju Zavoda za fitopatologiju tlo je podvrgnuto serijskom razrjeđivanju (Slika 13., Slika 14.) sterilnom destiliranom vodom u skladu s postupkom izolacije *Trichoderma* spp., nakon čega su suspenzije tla (Slika 15.) različitih koncentracija izlivenne na PDA hranjivu podlogu (eng. Potato Dextrose Agar), uz dodatak antibiotika kloramfenikola 0,5 g/L, u petrijevke promjera 9 cm i postavljene su na inkubaciju u klima-komoru na 21 °C. Iz izraslih kolonija (Slika 16.) provedena je monosporna izolacija vrsta iz roda *Trichoderma* metodom prema protokolu Samuels i Hebbar (2015.).



Slika 13. Serijsko razrjeđenje otopine tla (koncentracije:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ).<sup>14</sup>



Slika 14. Provedba serijskog razrjeđenja otopine tla.



Slika 15. Izlijevanje otopine tla na hranjivu podlogu.



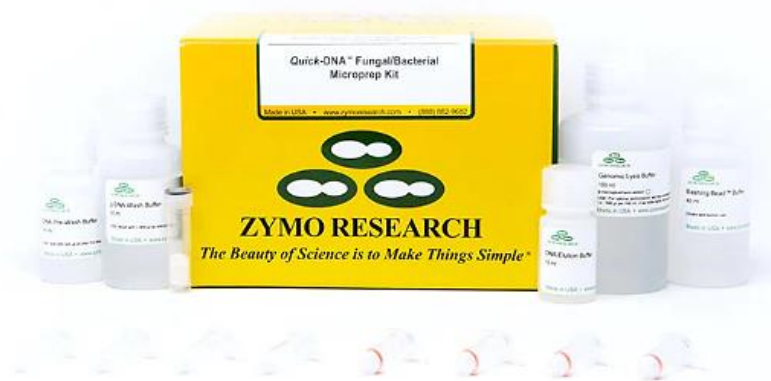
Slika 16. Mikroorganizmi izrasli iz uzoraka tla.

<sup>14</sup> (Izvor: <https://microbiologynote.com/bs/metoda-serijskog-razrje%C4%91ivanja/>, pristupljeno 22.6.2023.)

### 3.1. Molekularna identifikacija

Iz izraslih kolonija mikroorganizama iz uzoraka tla (Slika 16.), izolati koji potječu iz konidija precijepljeni su na PDA (Biolife, Italija) medij u Petrijeve zdjelice u svrhu dobivanja čistih (akseničnih) kultura. Serijom monosporne izolacije na PDA uzgojene su čiste monokulture koje su pripremljene za izolaciju DNA.

Na Institutu Ruđer Bošković provedena je izolacija DNA iz razvijenih čistih kultura *Trichoderma* spp. korištenjem ZYMO Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep komercijalnog kita (Slika 17.), prema uputama proizvođača.

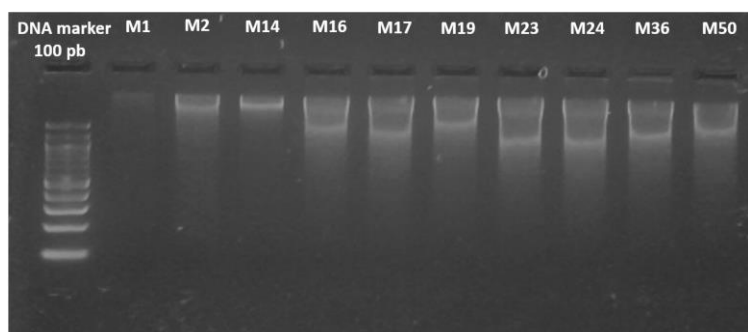


Slika 17. ZYMO Quick-DNA Fungal/Bacterial Microprep komercijalni kit.<sup>15</sup>

Integritet i kvaliteta izolirane DNA provjerena je gel elektroforezom (90 V/35 min) na 1 %-tnom agaroznom gelu (Slika 18.). Agarozni gel (1 %) pripremljen je otapanjem 0,5 g agaroze (Sigma, Njemačka) do tališta u 50 mL 1 x TAE puferu (Invitrogen, SAD). Otopljena agarozna je ohlađena na 50-60 °C i dodano je 0,5 µL GelStar (Lonza, SAD) boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina. Tijekom izolacije DNA korištene su različite otopine i puferi. Priprema 1x Tris-acetatnog EDTA pufera (1x TAE) provedena je na način da je u 980 mL destilirane vode dodano je 20 mL 50x TAE komercijalnog pufera.

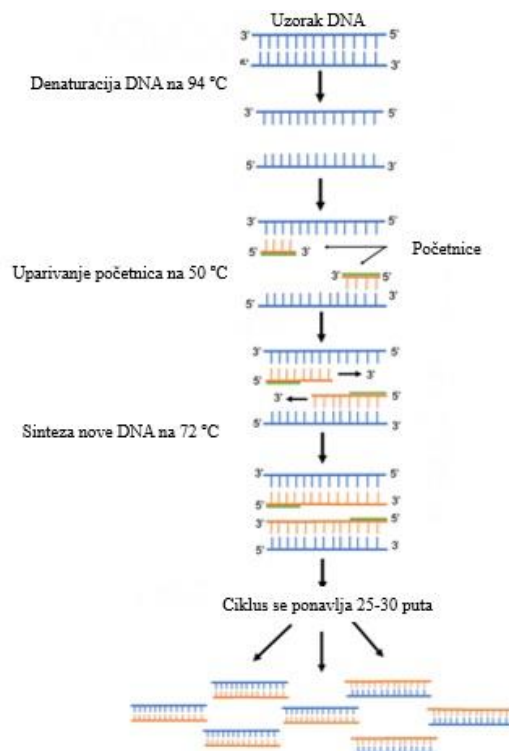
<sup>15</sup> (Izvor: <https://zymoresearch.eu/products/quick-dna-fungal-bacterial-microprep-kit>, pristupljeno: 11.6.2023.)





Slika 18. Integritet i kvaliteta izolirane DNA iz *Trichoderma* vrsta prikazani na agaroznom gelu nakon elektroforeze. <sup>16</sup>

Nakon izolacije DNA, sukladno protokolu provedena je PCR reakcija umnažanja željenih odsječaka DNA (Slika 19.). Za izvođenje PCR reakcije potrebna je izolirana DNA i niz reagensa, tzv. PCR mješavina (eng. PCR master mix). Željeni fragmenti DNA (genske regije) najprije su amplificirani PCR reakcijom (eng. polymerase chain reaction) te je nakon toga provedeno sekvenciranje PCR produkata metodom po Sangeru. Genske regije koje su amplificirane i sekvencirane specifične su za gljivlje organizme: ITS (eng. internal transcribed spacer), *rpb2* (eng. RNA polymerase II) i *tef1- $\alpha$*  (eng. translation elongation factor 1-alpha) (Cai i Druzhinina, 2021.).



Slika 19. Protokol PCR reakcije. <sup>17</sup>

<sup>16</sup> (Foto: L. Pole)

<sup>17</sup> (Izvor: <https://www.addgene.org/protocols/pcr/>, pristupljeno 23.6.2023.)

Izolirana DNA iz kultura poslužila je kao kalup za PCR reakcije koje su provedene u termobloku PCRMax (PCRMax, Ujedinjeno Kraljevstvo) u ukupnom volumenu od 25 µL. Svaka PCR reakcija sadržavala je 12,5 µL GoTaq G2 Green Master Mix (Promega, SAD), 1 µL svake početnice (5 µM) specifične za određenu gensku regiju (Tablica 4.), 9,5 µL vode te 1 µL DNA kalupa. U svakoj PCR reakciji korištena je DNA prethodno identificirane *Trichoderma* vrste kao pozitivna kontrola te voda umjesto DNA kalupa kao negativna kontrola. Uvjeti svake PCR reakcije za amplifikaciju određene genske regije, navedeni su u Tablici 5.

Tablica 4. Početnice korištene za amplifikaciju genskih regija kod *Trichoderma* vrsta.

GENSKA REGIJA	POČETNICA	SEKVENCA POČETNICE	VELIČINA PCR PRODUKTA	REFERENCA
ITS	ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	~ 760 pb	White i sur., 1990.
	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'		
<i>rpb2</i>	fRPB2-5f	5' GAYGAYMGWGATCAYTTYGG 3'	~ 820 pb	Liu i sur., 1999.
	fRPB2-7cr	5' CCCATRGCTTGTYRCCCAT 3'		
<i>tef1-a</i>	EF1	5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3'	~ 920 pb	O'Donnell i sur., 1998.
	EF2	5' GGARGTACCAGTSATCATGTT 3'		

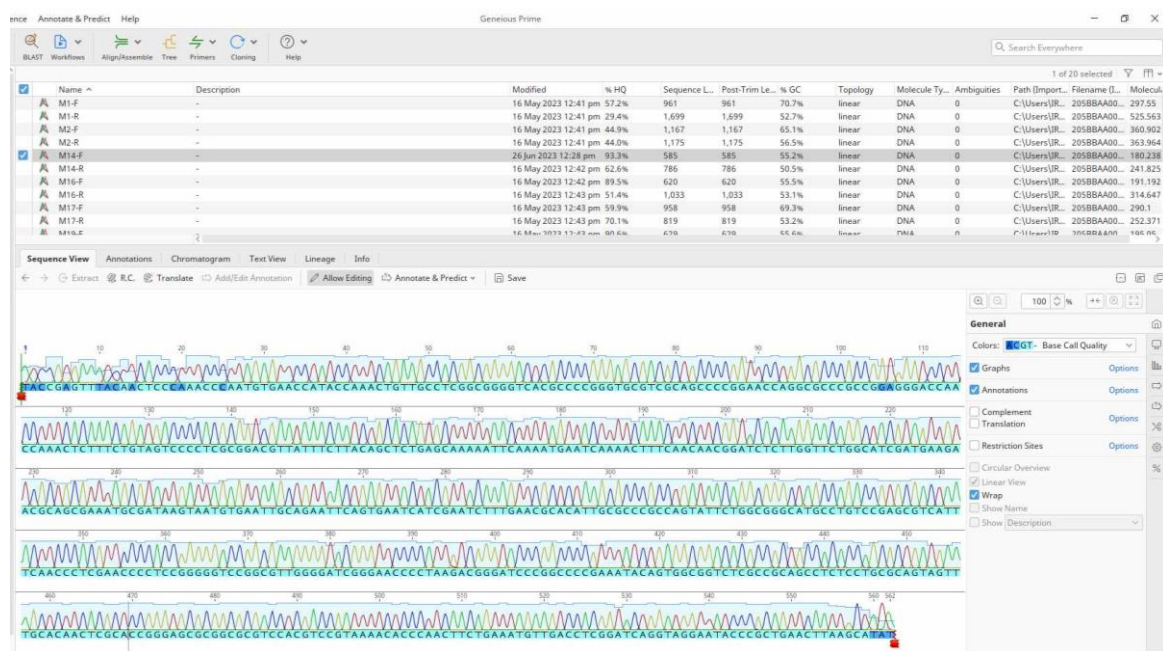
Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju genskih regija kod *Trichoderma* spp.

GENSKA REGIJA	UVJETI PCR REAKCIJE	REFERENCA	
ITS	95 °C -> 2 min	32 x	Cai i Druzhinina, 2021.
	95 °C -> 15 s		
	53 °C -> 15 s		
	72 °C -> 1 min		
	72 °C -> 5 min		
<i>rpb2</i>	95 °C -> 2 min	32 x	Cai i Druzhinina, 2021.
	95 °C -> 15 s		
	58 °C -> 15 s		
	72 °C -> 1 min		
	72 °C -> 5 min		
<i>tef1-a</i>	95 °C -> 2 min	32 x	Cai i Druzhinina, 2021.
	95 °C -> 30 s *		
	53 °C -> 30 s *		
	72 °C -> 1 min		
	72 °C -> 8 min *		

\*modificirano vrijeme denaturacije DNA, sparivanja početnica i završne elongacije

Dobiveni PCR produkti razdvojeni su gel elektroforezom u 1 %-tnom agaroznom gelu u trajanju od 35 min pri 90 V. Za provjeru veličine fragmenta dobivenih PCR produkata, korišten je DNA marker 100 pb (New England Biolabs, SAD) i PCR produkti su vizualizirani na transiluminatoru pod plavim svjetlom.

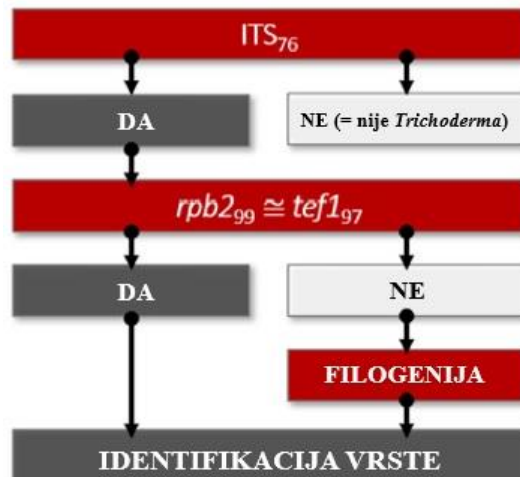
Produkti PCR-a su pročišćeni korištenjem ExoSap-IT reagensa (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema uputama proizvođača te poslani na sekvenciranje u oba smjera u Macrogen servis (Nizozemska). Dobivene sekvence ITS, *rpb2* i *tef1-α* obrađene su u programskom softveru Geneious Prime 2023.1.1 (<https://www.geneious.com>, Biomatters, Novi Zeland) (Slika 20.) te uspoređene sa sekvencama u NCBI bazi podataka (eng. National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) putem BLAST servisa (eng. Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Slika 20. Prikaz elektroferograma sekvence ITS (forward) za izolat M-14 u programu Geneious Prime (2023.).<sup>18</sup>

Korištenjem alata TrichoBLAST sekvence su uspoređene s referentnim izolatima iz NCBI baze podataka i online dostupnim alatima na [www.trichokey.info](http://www.trichokey.info) stranici. Pomoću sekvence ITS određen je rod *Trichoderma* (ITS > 76 %), a sekvencama *rpb2* ( $rpb2 \geq 99$  %) i *tef1-α* ( $tef1-α \geq 99$  %) određena je vrsta (Slika 21.) (Cai i Druzhinina, 2021.). Primjer podudaranja nukleotida sve tri sekvence (ITS, *rpb2* i *tef1-α*) izolata M2 s referentnim/tipskim izolatom prikazan je Slikom 22., Slikom 23. i Slikom 24.

<sup>18</sup> (Foto: I. Kušan)



Slika 21. Protokol određivanja roda i vrste pomoću genskih markera ITS, *rpb2* i *tef1-α*.<sup>19</sup>

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
959 bits(519)	0.0	519/519 (100%)	0/519(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCGAGTTTACAACCTCCAAACCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTC			68
Sbjct 12	CCGAGTTTACAACCTCCAAACCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTC			71
Query 61	ACGCCCGGGTGCCTCGAGCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAACTC			128
Sbjct 72	ACGCCCGGGTGCCTCGAGCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAACTC			131
Query 121	TTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTCTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGA			180
Sbjct 132	TTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTCTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGA			191
Query 181	ATCAAACTTTCAACAACGGATCTTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCAAAATG			248
Sbjct 192	ATCAAACTTTCAACAACGGATCTTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCAAAATG			251
Query 241	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG			308
Sbjct 252	CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG			311
Query 301	CCCGCCAGTATTTGGCGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCC			368
Sbjct 312	CCCGCCAGTATTTGGCGGGCATGCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCC			371
Query 361	GGGGGGTCCGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCCAAGACGGGATCCCGCCCCGAAATACA			428
Sbjct 372	GGGGGGTCCGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCCAAGACGGGATCCCGCCCCGAAATACA			431
Query 421	GTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCCGGGAGCGC			488
Sbjct 432	GTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCCGGGAGCGC			491
Query 481	GGCGCGTCCACGTCCGTAACACCCAACTTCTGAAATG		519	
Sbjct 492	GGCGCGTCCACGTCCGTAACACCCAACTTCTGAAATG		538	

Slika 22. Primjer 100 %-tnog podudaranja nukleotida sekvence ITS vrste *Trichoderma atroviride*.<sup>20</sup>

<sup>19</sup> (Cai i Druzhinina, 2021.)

<sup>20</sup> (Izvor: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_1845926104](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1845926104), pristupljeno 22.6.2023.)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1496 bits(810)	0.0	812/812 (99%)	0/813(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGGGGTGAACAGAGAAGGCAATGAGCTCGACCGCAGGTGCTCCACAGGTGCTTAACCGT	60		
Sbjct 22	TGGGGTGAACAGAGAAGGCAATGAGCTCGACCGCAGGTGCTCCACAGGTGCTTAACCGT	81		
Query 61	TACACTTTTGCTTCTACACTTTCCCAATTTGCGTGTACCAATAGACCCATCGGAAGAGAT	120		
Sbjct 82	TACACTTTTGCTTCTACACTTTCCCAATTTGCGTGTACCAATAGACCCATCGGAAGAGAT	141		
Query 121	GGTAAGCTGGCGAAGCCTCGACAGCTCCACAACACACACTGGGGTTTGGTGTGCCCGCT	180		
Sbjct 142	GGTAAGCTGGCGAAGCCTCGACAGCTCCACAACACACACTGGGGTTTGGTGTGCCCGCT	201		
Query 181	GAGACCCCTGAAGGTCAAGCTTTGTGGTCTGGTCAAGAAATTTGTCTCTCATGTGCTACGTC	240		
Sbjct 202	GAGACCCCTGAAGGTCAAGCTTTGTGGTCTGGTCAAGAAATTTGTCTCTCATGTGCTACGTC	261		
Query 241	AGTGTGGATCTCCTTCTGAGCCTTTGATCGAGTTTATGATCAGCAGAGATGGAAGTC	300		
Sbjct 262	AGTGTGGATCTCCTTCTGAGCCTTTGATCGAGTTTATGATCAGCAGAGATGGAAGTC	321		
Query 301	GTTGAGGAGTATGAGCCACTGAGGATCCCAATGCTACAAAGATCTTTGTGAATGGTGTCT	360		
Sbjct 322	GTTGAGGAGTATGAGCCACTGAGGATCCCAATGCTACAAAGATCTTTGTGAATGGTGTCT	381		
Query 361	TGGGTTGGAATCCACCAAGACCCCAAGCATCTGGTAAACCAAGTTTGGATACTCGTCGC	420		
Sbjct 382	TGGGTTGGAATCCACCAAGACCCCAAGCATCTGGTAAACCAAGTTTGGATACTCGTCGC	441		
Query 421	AAATCCTATCTGCAAGTACGAGGCTCTCTGATCAGAGAAATTCGAGACCAAGAAATTCAAA	480		
Sbjct 442	AAATCCTATCTGCAAGTACGAGGCTCTCTGATCAGAGAAATTCGAGACCAAGAAATTCAAA	501		
Query 481	ATCTTCTCTGACGCCGGCCGTGTCTGCTCCCGTCTTCACTGTACAGCAGGAAATGAC	540		
Sbjct 502	ATCTTCTCTGACGCCGGCCGTGTCTGCTCCCGTCTTCACTGTACAGCAGGAAATGAC	561		
Query 541	CCGGAACCGGATCAACAAGGGCCACTGGTTTTGACCAAGGACCTTGTCAATAGACTG	600		
Sbjct 562	CCGGAACCGGATCAACAAGGGCCACTGGTTTTGACCAAGGACCTTGTCAATAGACTG	621		
Query 601	GCCAAAGAGCAGGCAGGCTCCAGAGACCCCAAGCATGAAGCTCGGATGGGAAGGGCTG	660		
Sbjct 622	GCCAAAGAGCAGGCAGGCTCCAGAGACCCCAAGCATGAAGCTCGGATGGGAAGGGCTG	681		
Query 661	ATTAAGACTGGTCCGGTGAATATCTCGACGCCGAGGAAGGAAACGTCAATGATTTGC	720		
Sbjct 682	ATTAAGACTGGTCCGGTGAATATCTCGACGCCGAGGAAGGAAACGTCAATGATTTGC	741		
Query 721	ATGACACCGGATGATCTGGAGCTCTATCGTCTTCAAAAGGCCGGCATTTGCCAGGATGAA	780		
Sbjct 742	ATGACACCGGATGATCTGGAGCTCTATCGTCTTCAAAAGGCCGGCATTTGCCAGGATGAA	801		
Query 781	GACATAGGAGACGATCCAAATAGCGTCTCAAAG	813		
Sbjct 802	GACATAGGAGACGATCCAAATAGCGTCTCAAAG	834		

Slika 23. Primjer 99 %-tnog podudaranja nukleotida sekvence *rpb2* vrste *Trichoderma atroviride*.<sup>21</sup>

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
963 bits(521)	0.0	521/521 (100%)	0/521(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAGAAGGTGAGCTCATTTCTGCTTTTTCACTCCGCTCCCTGAGCACAATCGTCCCGACA	60		
Sbjct 14	GAGAAGGTGAGCTCATTTCTGCTTTTTCACTCCGCTCCCTGAGCACAATCGTCCCGACA	73		
Query 61	ATTCGTCTCAGTCTTTGTCAATTTTTTCTCGCAGCATCACACCCTGTTTACCTGTCT	120		
Sbjct 74	ATTCGTCTCAGTCTTTGTCAATTTTTTCTCGCAGCATCACACCCTGTTTACCTGTCT	133		
Query 121	TACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAATTTCTGGCTGCCTTGCTTGGCTTTTAGTGGGGTGC	180		
Sbjct 134	TACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAATTTCTGGCTGCCTTGCTTGGCTTTTAGTGGGGTGC	193		
Query 181	CAACTTTTTTTGTTGGCTGCAACCCCGCTATCGCGACTGTCCCGTCCCAACGAATGTGA	240		
Sbjct 194	CAACTTTTTTTGTTGGCTGCAACCCCGCTATCGCGACTGTCCCGTCCCAACGAATGTGA	253		
Query 241	CTCAATTGCATCGTCTTCTCCATCTCTGTGGTTCATTTGTGCTAATCATGCTTCAATCA	300		
Sbjct 254	CTCAATTGCATCGTCTTCTCCATCTCTGTGGTTCATTTGTGCTAATCATGCTTCAATCA	313		
Query 301	ATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCTTCTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCT	360		
Sbjct 314	ATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCTTCTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCT	373		
Query 361	CAAGGCCGAGCTGAGCGTGGTATCACCATCGACATGCCCCTCGGAAGTTCGAGACTCC	420		
Sbjct 374	CAAGGCCGAGCTGAGCGTGGTATCACCATCGACATGCCCCTCGGAAGTTCGAGACTCC	433		
Query 421	CAAGTACTATGTCAACCGTCAATGGTATGTTTTGCGTTTTTCTCATTTGATACTGGAGACC	480		
Sbjct 434	CAAGTACTATGTCAACCGTCAATGGTATGTTTTGCGTTTTTCTCATTTGATACTGGAGACC	493		
Query 481	AAGATTCTAACGTGCCGCTCTGTAGACGCTCCCGGTCAACC	521		
Sbjct 494	AAGATTCTAACGTGCCGCTCTGTAGACGCTCCCGGTCAACC	534		

Slika 24. Primjer 99 %-tnog podudaranja nukleotida sekvence *tef1-a* izolata *Trichoderma atroviride*.<sup>22</sup>

<sup>21</sup> (Izvor: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_164611712](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_164611712), pristupljeno 22.6.2023.)

<sup>22</sup> (Izvor: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr\\_33317542](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_33317542), pristupljeno 22.6.2023.)

### 3.2. Analiza makroskopskih i mikroskopskih obilježja *Trichoderma* spp.

Osim molekularne identifikacije vrsta, za potrebe ovog istraživanja proučavana su i morfološka obilježja akseničnih monosporijalnih kultura izoliranih *Trichoderma* spp. Mikroskopska studija provedena je na kulturama različite starosti kako bi se promatrao razvoj i varijacije u konidiogenim strukturama i produkcija hlamidospora. U mikroskopsku analizu uključen je samo po jedan izolat od svake vrste, prethodno identificirane molekularnim metodama.

Za morfološku identifikaciju vrsta obično se spominju razlikovne osobine: micelarni izgled kolonije i njihov miris, izgled konidiofora i način grananja, proizvodnja različitih pigmenata, oblik fialida i oblik konidija (Gams i Bissett, 2002.).

Za potrebe istraživanja, kulture gljiva su umnožene u laboratoriju Zavoda za fitopatologiju na PDA i MA supstratu (eng. Malt Agar). Korištene su hranjive podloge vlastite izrade, PDA (domaći krumpir; agar i dekstroza – Biolife, Italija)<sup>23</sup> i MA instant agar (Biolife, Italija). Svaki izolat je nacijepljen na hranjive podloge (PDA i MA) u tri repeticije. Svakog dana je mjerena linearni porast kolonija svake izolirane vrste ( $min_1$ ,  $min_2$ ,  $max$ ), a petrijevke su čuvane na 21 °C.

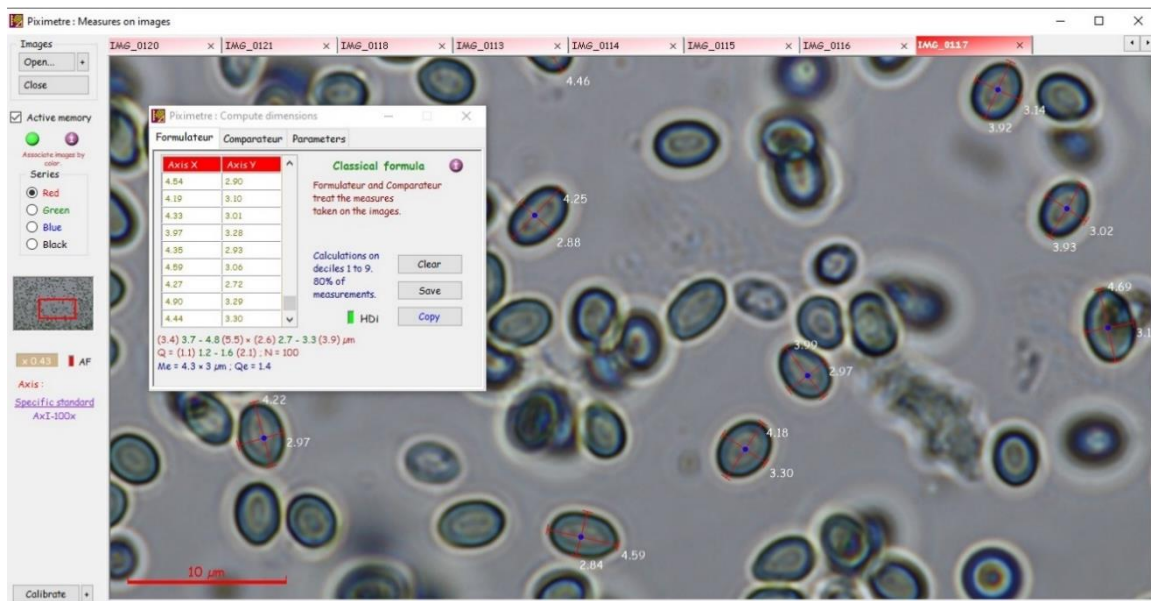
Aksenične kulture mikroskopirane su na Zeiss Axio Imager A2 mikroskopu na Institutu Ruđer Bošković (Slika 25). Prilikom mikroskopiranja svake vrste zabilježene su fotografije konidiofora, konidiogenih struktura – fialida, spora – konidija i hlamidospora, pri povećanjima objektiva: 2,5x; 40x i 100x (imerzijski objektiv). Pomoću programa Piximètre 5.10 (<https://www.free.fr/freebox/vos-applications/>), koji je prethodno kalibriran za sva korištena povećanja, na tim mikrofotografijama je izmjerena veličina (duljina i širina) fialida, konidija i hlamidospora (Slika 26.). U mjerenjima je korišteno 100 konidija, 20 fialida i 10 hlamidospora svake vrste.

---

<sup>23</sup> Recept izrade PDA hranjive podloge: 1L destilirane vode, 200 g krumpira (skuhanog i oguljenog), 20 g dekstroze, 15 g agara.



Slika 25. Svjetlosni istraživački mikroskop Zeiss (Zeiss Axio Imager A2).



Slika 26. Prikaz mjerenja veličine konidija na mikrofotografijama u programu Piximètre 5.10 - primjer: *Trichoderma longibrachiatum* (izolat M19).

## 4. Rezultati

U provedenom istraživanju zastupljenosti vrsta iz roda *Trichoderma* u rizosferi masline s različitih lokacija Mediteranske regije Hrvatske dobiveni su sljedeći rezultati.

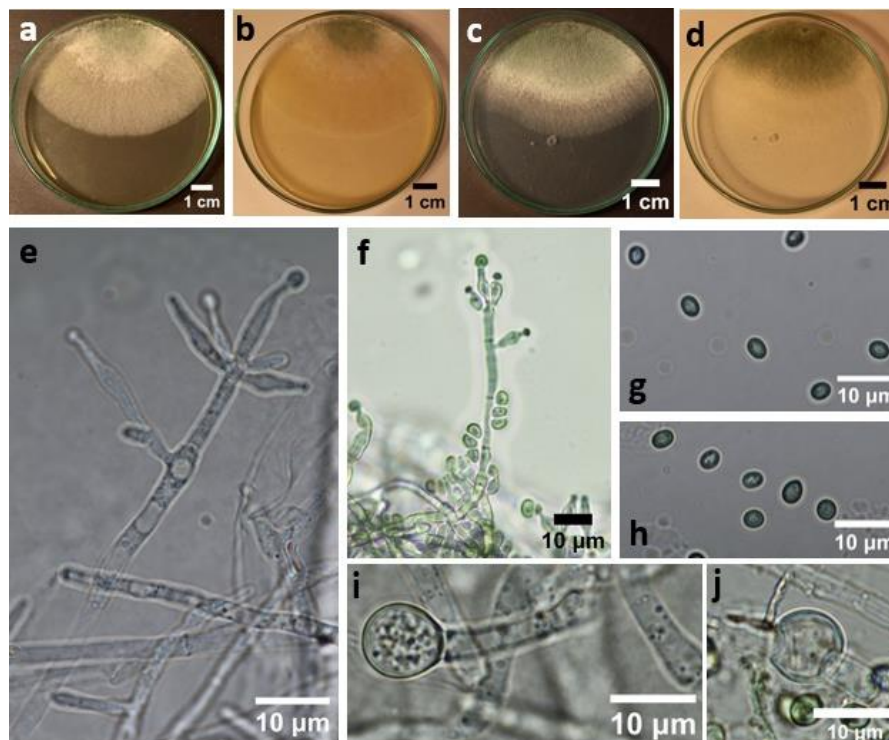
Molekularnim metodama (DNA barkodiranje), u svih 10 izoliranih uzoraka tla maslinika utvrđene su vrste iz roda *Trichoderma*. Identificirano je šest različitih vrsta iz roda *Trichoderma*: (1) izolati M1, M14, M24 – *Trichoderma koningiopsis* agg., (2) izolat M2 – *Trichoderma atroviride*, (3) izolati M16, M17, M23 – *Trichoderma harzianum*, (4) izolat M19 – *Trichoderma longibrachiatum*, (5) izolat M36 – *Trichoderma paratroviride* i (6) izolat M50 – *Trichoderma* sp. (ovaj izolat nije bilo moguće identificirati do razine vrste). Najzastupljenije vrste u ovom istraživanju su *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma koningiopsis* agg., svaka s tri izolata. Rezultati su prikazani Tablicom 6., a morfološki prikazi vrsta dani su na Slikama 27.-32.

Tablica 6. Rezultati identificiranja vrsta *Trichoderma* izoliranih iz uzoraka tla rizosfere masline na različitim lokacijama Mediteranske regije RH.

Izolat	Županija	Lokalitet	VRSTA
M1	Istarska	Fažana	<i>Trichoderma koningiopsis</i> agg.
M2	Šibensko-kninska	Primošten Industrijska zona	<i>Trichoderma atroviride</i>
M14	Zadarska	Zadar	<i>Trichoderma koningiopsis</i> agg.
M16	Splitsko- dalmatinska	Hvar	<i>Trichoderma harzianum</i>
M17	Splitsko- dalmatinska	Hvar	<i>Trichoderma harzianum</i>
M19	Primorsko-goranska	Mali Lošinj	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
M23	Primorsko-goranska	Njivice	<i>Trichoderma harzianum</i>
M24	Istarska	Umag	<i>Trichoderma koningiopsis</i> agg.
M36	Dubrovačko- neretvanska	Neretva	<i>Trichoderma paratroviride</i>
M50	Zadarska	otok Rava	<i>Trichoderma</i> sp.



#### 4.1. Vrsta *Trichoderma koningiopsis* agg. (izolati M1, M14, M24)

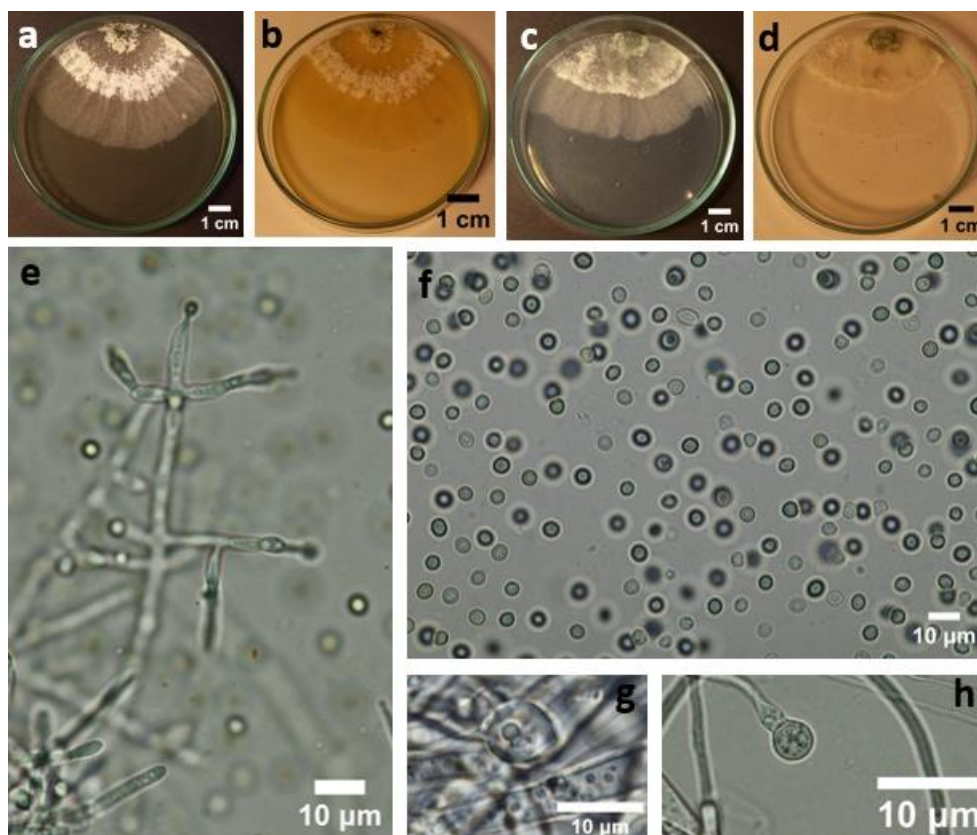


Slika 27. Vrsta *Trichoderma koningiopsis* agg.: a-b) Tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) Tri dana stare aksenične kulture na PDA, e-f) Konidiofori, g-h) Konidije, i) Terminalna hlamidospora, j) Interkalarna hlamidospora. <sup>24</sup>

Kolonija uzgajana na MA supstratu na 21 °C dosiže radijus 1,4-2,0 cm u vremenu od 24 h, a za 4 dana uzgoja micelij proraste cijelu petrijevku (9 cm). Kolonija uzgajana na PDA supstratu na 25 °C dosiže radijus 1,5-1,8 cm za 24 h, a za 5 dana uzgoja promjer iznosi 10,0 cm. Površinski izgled kolonije je paučinast, a u koloniji se formiraju karakteristični koncentrični krugovi/zone zelene boje oko izvornog inokuluma. Kolonije imaju miris kokosa. Vrsta počinje sporulirati 3. dana uzgoja i pojavljuje se karakteristična zelena boja. Konidiofori su oblika stabla s izraženo glavnom osi, razgranati su, a prema vrhu konidiofora se stvaraju fialide. Fialide su zelene boje, krušolikog do izduženog oblika, veličine (8,8) 9,3 - 15,5 (16,1) × (2,1) 2,11 - 3,2 (4,8) µm (N = 20). Fialide obilno stvaraju konidije, koje su elipsoidnog oblika, zelene boje, veličine (3,3) 3,5 - 4,2 (4,8) × (2,4) 2,8 - 3,2 (3,5) µm (N = 100). Vrsta stvara hijaline hlamidospore nakon mjesec dana inkubacije, okruglog oblika, a pojavljuju se terminalno i interkalarno, veličine su (8,3) 8,4 - 9,1 (9,7) × (7,4) 7,43 - 8,8 (8,9) µm (N = 10).

<sup>24</sup> (Foto: a-d) M. Stvorić, e-j) N. Matočec)

#### 4.2. Vrsta *Trichoderma atroviride* (izolat M2)

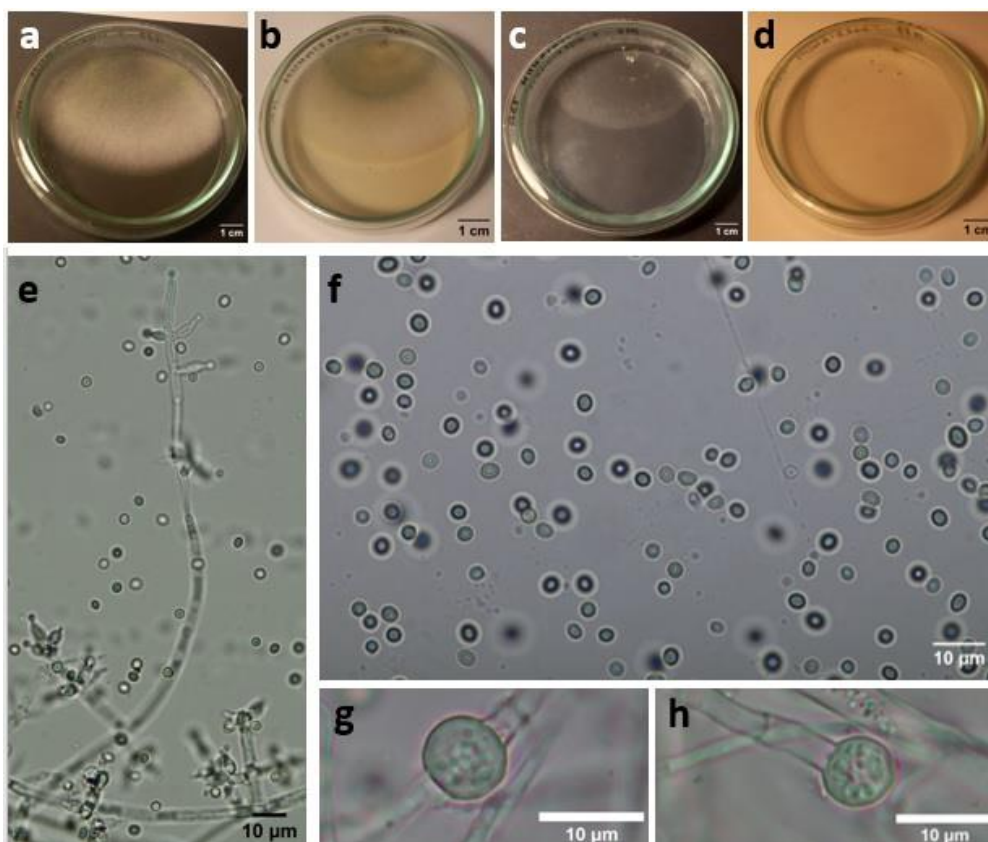


Slika 28. Vrsta *Trichoderma atroviride*: a-b) Tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) Tri dana stare aksenične kulture na PDA, e) Konidiofor, f) Konidije, g) Interkalarna hlamidospora, h) Terminalna hlamidospora. <sup>25</sup>

Kolonija uzgajana na MA supstratu na 21 °C dosiže radijus 1,5-1,9 cm u vremenu od 24 h, a za 4 dana uzgoja micelij proraste cijelu petrijevku (9 cm). Kolonija uzgajana na PDA supstratu na 25 °C dosiže radijus 1,4-1,5 cm za 24 h, a za 5 dana uzgoja promjer iznosi 10,0 cm. Površinski izgled kolonije je paučinst. U koloniji se formiraju karakteristični koncentrični krugovi oko izvornog inokuluma. Kolonija ima miris kokosa. Vrsta počinje sporulirati 3. dana uzgoja i pojavljuje se karakteristična zelena boja. Konidiofori su piramidalnog izgleda, Konidije su zelene boje, okruglaste do jajolike, veličine (3,1) 3,3 - 3,9 (4,3) × (2,7) 3,1 - 3,5 (3,8) µm (N = 100). Fijalide su kruškolike do izdužene (tzv. „oblik ampule“), zelene boje, veličine (8) 8,7 - 12,1 (14) × (2,4) 3,4 - 4,3 (4,6) µm (N = 20). Vrsta stvara hijaline hlamidospore već nakon tri dana inkubacije, okruglog do izduženog oblika, pojavljuju se terminalno i interkalarno, veličine su (7,7) 8 - 11,2 (11,9) × (6,7) 7,5 - 10,2 (10,5) µm (N = 10).

<sup>25</sup> (Foto: a-d) M. Stvorić, e-h) N. Matočec)

### 4.3. Vrsta *Trichoderma harzianum* (izolati M16, M17, M23)

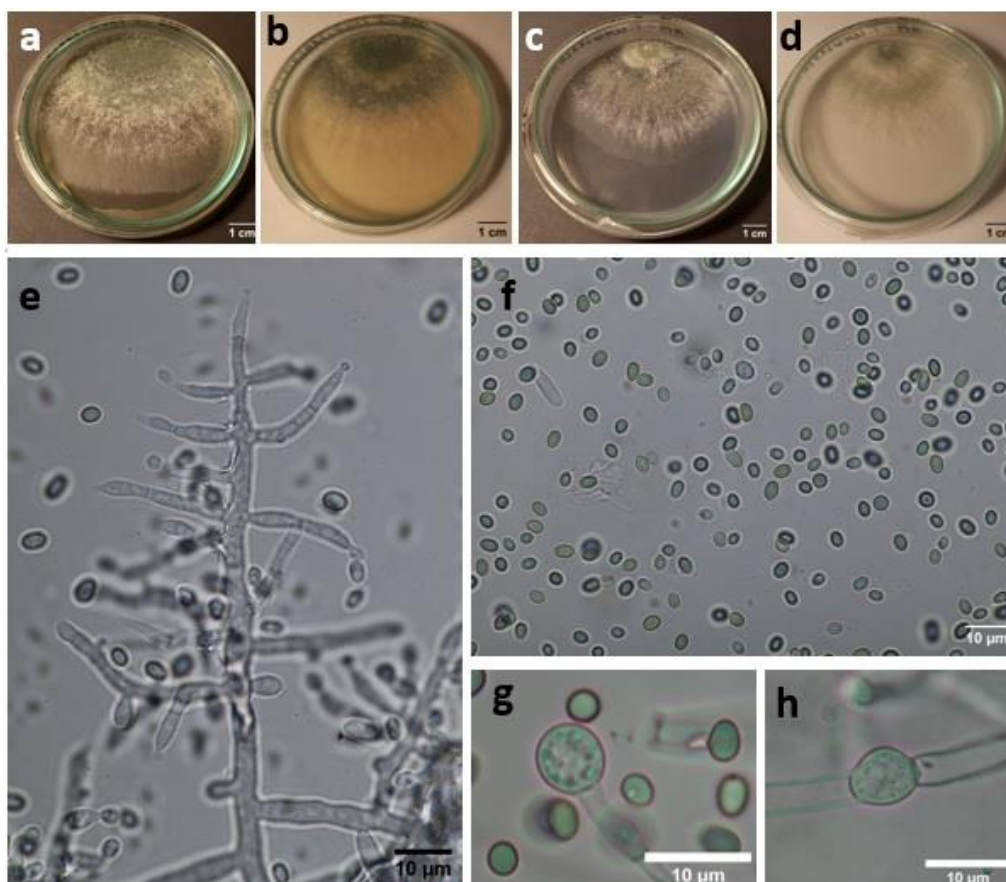


Slika 29. Vrsta *Trichoderma harzianum*: a-b) Tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) Tri dana stare aksenične kulture na PDA, e) Konidiofor, f) Konidije, g) Interkalarna hlamidospora, h) Terminalna hlamidospora. <sup>26</sup>

Kolonija uzgajana na MA supstratu na 21 °C dosiže radijus 1,6-1,7 cm u vremenu od 24 h, a za 4 dana uzgoja micelij proraste cijelu petrijevku (9 cm). Kolonija uzgajana na PDA supstratu raste znatno sporije, na 25 °C dosiže radijus 1,0-1,3 cm za 24 h, a petrijevku preraste tek nakon mjesec dana. Kolonije na PDA supstratu su bijele boje, paučinastog izgleda. Kolonije na MA supstratu stvaraju karakteristične koncentrične krugove zelene i bijele boje oko izvornog inokuluma. Konidiofori su izduženi, prvi vrhu se stvaraju fijalide. Fijalide su zelene boje, kruškolikog do izduženog oblika, veličine (7) 8,6 - 11,9 (13,3) × (2,6) 2,7 - 4,2 (4,4) µm (N = 20). Fijalide stvaraju konidije koje su zelene boje, okrugle do jajolike, veličine (2,9) 3,2 - 3,9 (5,1) × (2,4) 2,7 - 3,2 (3,6) µm (N = 100). Vrsta stvara subhijaline hlamidospore nakon mjesec dana inkubacije, okruglog do blago spljoštenog oblika, pojavljuju se terminalno i interkalarno, veličine su (5,2) 5,9 - 7,7 (8,2) × (5,1) 5,6 - 7,2 (7,3) µm (N = 10).

<sup>26</sup> (Foto: a-d) M. Stvorić, e-h) I. Kušan)

#### 4.4. Vrsta *Trichoderma longibrachiatum* (izolat M19)

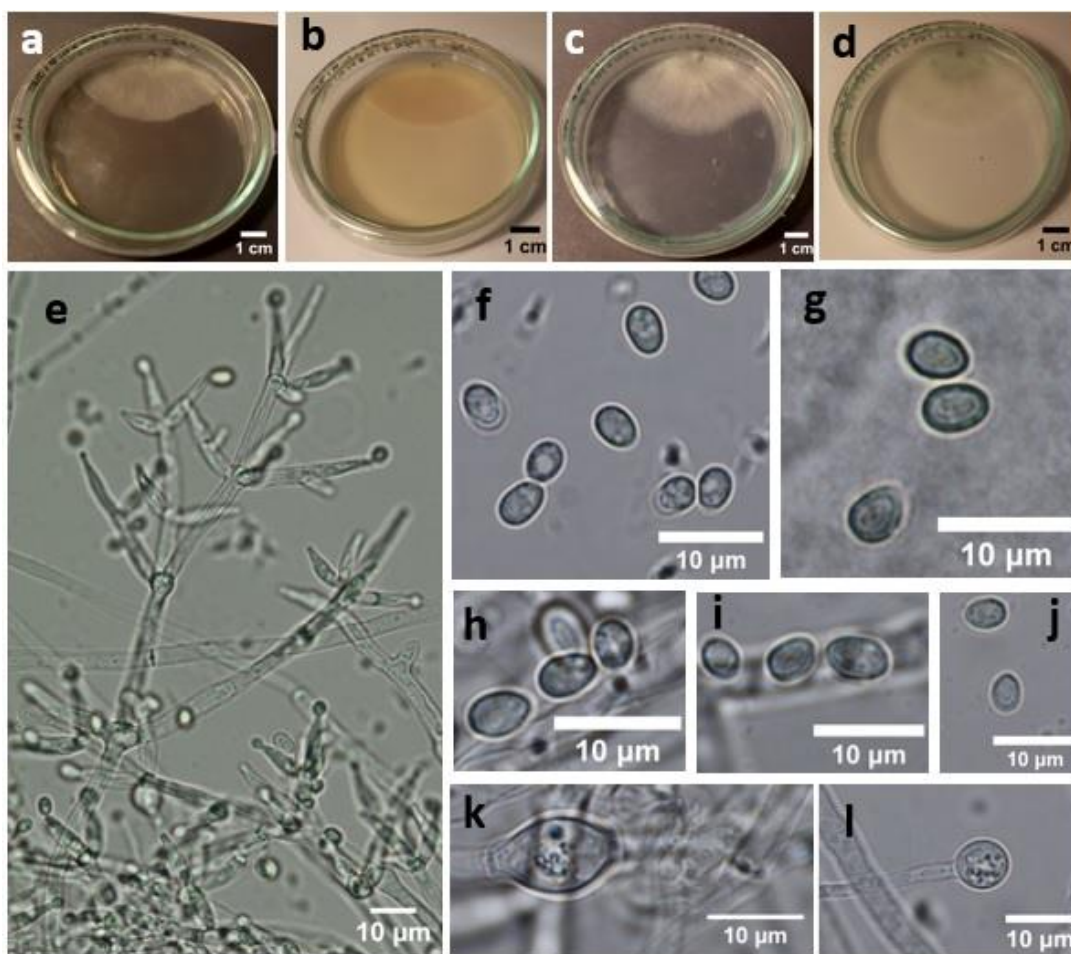


Slika 30. Vrsta *Trichoderma longibrachiatum*: a-b) Tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) Tri dana stare aksenične kulture na PDA, e) Konidiofor, f) Konidije, g) Terminalna hlamidospora, h) Interkalarna hlamidospora. <sup>27</sup>

Kolonija uzgajana na MA supstratu na 21 °C dosiže radijus 1,4-1,7 cm u vremenu od 24 h, a za 4 dana uzgoja micelij proraste cijelu petrijevku (9 cm). Kolonija uzgajana na PDA supstratu na 25 °C dosiže radijus 0,9-1,1 cm za 24 h, a za 5 dana uzgoja promjer iznosi 10,0 cm. Kolonije su tamnozeleno boje. Vrsta počinje sporulirati 3. dana uzgoja i pojavljuje se karakteristična zelena boja. Konidiofori su piramidalnog tipa, a fialide se stvaraju cijelom duljinom konidiofora. Fialide su zelene boje i jako izdužene, veličine  $(10,3) 10,6 - 14 (16,3) \times (2,2) 2,6 - 3,7 (3,9) \mu\text{m}$  (N = 20). Fialide obilno stvaraju konidije koje su zelene boje, veličine  $(3,4) 3,7 - 4,8 (5,5) \times (2,6) 2,7 - 3,3 (3,9) \mu\text{m}$  (N = 100). Vrsta stvara subhijaline hlamidospore nakon mjesec dana inkubacije, okruglog do izduženog oblika, pojavljuju se terminalno i interkalarno, veličine su  $(6,7) 7,4 - 9,1 (9,5) \times (6,5) 6,7 - 7,9 (9,1) \mu\text{m}$  (N = 10).

<sup>27</sup> (Foto: a-d) M. Stvorić, e-h) I. Kušan)

#### 4.5. Vrsta *Trichoderma paratroviride* (izolat M36)

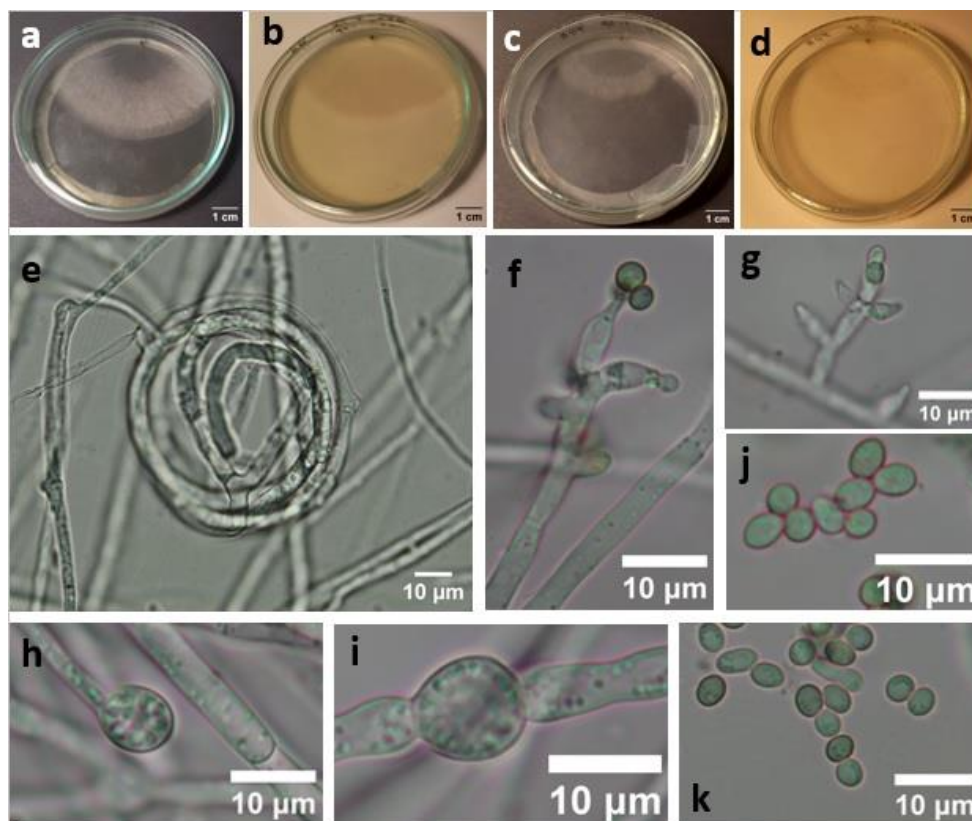


Slika 31. Vrsta *Trichoderma paratroviride*: a-b) Tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) Tri dana stare aksenične kulture na PDA, e) Konidiofori s fijalidama, f-j) Konidije, k) Interkalarna hlamidospora, l) Terminalna hlamidospora. <sup>28</sup>

Kolonija uzgajana na PDA supstratu na 21 °C dosiže radijus 1,0-1,3 cm u vremenu od 24 h, a za 6 dana uzgoja micelij proraste cijelu petrijevku (9 cm). Kolonija uzgajana na MA supstratu raste znatno sporije, na 25 °C dosiže radijus 1,0 cm, a petrijevku preraste tek nakon mjesec dana. Kolonije na MA supstratu su bijele boje, površinskog paučinastog izgleda. Konidiofori su u obliku stabla i jako razgranati. Pri vrhu se stvaraju hijaline fijalide, izduženog oblika, veličine (11,7) 12,7 - 18,1 (19,7) × (2,6) 2,9 - 4,1 (4,7) µm (N = 20). Fijalide produciraju hijaline konidije elipsoidnog oblika, veličine (3,5) 4 - 5,1 (5,9) × (2,9) 3,1 - 3,7 (4,1) µm (N = 100). Vrsta stvara hijaline hlamidospore, okruglog do izduženog oblika, pojavljuju se terminalno i interkalarno, veličine su (7,6) 7,7 - 10,2 (12,3) × (7,4) 7,6 - 9,2 (9,5) µm (N = 10).

<sup>28</sup> (Foto: a-d) M. Stvorić, e-l) I. Kušan)

#### 4.6. Vrsta *Trichoderma* sp. (izolat M50)



Slika 32. Vrsta *Trichoderma* sp.: a-b) Tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) Tri dana stare aksenične kulture na PDA, e) Hifalna petlja, f-g) Konidiofori, h) Terminalna hlamidospora, i) Interkalarna hlamidospora, j-k) Konidije.<sup>29</sup>

Kolonija uzgajana na MA supstratu na 21 °C dosiže radijus 0,8-0,9 cm u vremenu od 24 h, a za 5 dana uzgoja micelij proraste cijelu petrijevku (9 cm). Kolonija uzgajana na PDA supstratu raste znatno sporije, na 25 °C dosiže radijus 0,5-0,9 cm za 24 h, a petrijevku preraste tek nakon mjesec dana. Kolonije na PDA supstratu su bijele boje. Površinski izgled kolonije je paučinst. Konidiofori su kratki i zadebljali, pri vrhu se stvaraju fijalide. Fijalide su zelene boje, kratkog kruškolikog oblika, veličine (9,1) 9,7 - 13,2 (14) × (3) 3,1 - 4,5 (5,3) μm (N = 20). Fijalide stvaraju konidije koje su zelene boje, elipsoidnog oblika, veličine (3,4) 3,8 - 4,6 (5,4) × (2,6) 2,9 - 3,5 (3,7) μm (N = 100). Vrsta stvara hijaline hlamidospore nakon mjesec dana inkubacije, kuglastog su oblika, pojavljuju se terminalno i interkalarno, veličine su (6,9) 7,1 - 9,1 (9,2) × (6,4) 6,8 - 8,4 (8,9) μm (N = 10). Poneke hife ove vrste formiraju se u tzv. „hifalne petlje“ ili „omče“.

<sup>29</sup> (Foto: a-d) M. Stvorić, e-k) I. Kušan)

## 5. Rasprava

Bioraznolikost i geografska rasprostranjenost „soil-borne“ vrsta iz roda *Trichoderma* na području Hrvatske nedovoljno su poznate jer uglavnom službeno nisu bile istraživane (Topolovec-Pintarić, 2019). Samo jedno istraživanje proveli su Jaklitsch i Voglmayr (2015.) u mezo-mediteranskom obalnom području poluotoka Istre, između gradova Vrsara i Pule, te u nekim submediteranskim dijelovima poluotoka Istre te otoka Cresa i Lošinja. Tijekom svojeg istraživanja na području južne Europe i Makaronezije, sakupili su više od 650 uzoraka gljiva iz roda *Trichoderma*, među kojima je identificirano i opisano 17 novih vrsta za znanost: *Trichoderma balearicum*, *Trichoderma ceciliae*, *Trichoderma christiani*, *Trichoderma cremeoides*, *Trichoderma europaeum*, *Trichoderma euskadiense*, *Trichoderma gliocladium*, *Trichoderma hausknechtii*, *Trichoderma helicelixii*, *Trichoderma istrianum*, *Trichoderma italicum*, *Trichoderma leguminosarum*, *Trichoderma mediterraneum*, *Trichoderma pararogersonii*, *Trichoderma paratroviride*, *Trichoderma priscilae* i *Trichoderma rubi*. Neke od vrsta koje su zabilježili Jaklitsch i Voglmayr (2015.) utvrđene su i ovim istraživanjem odnosno u ovom Diplomskom radu: *Trichoderma atroviride* – smatra se relativno čestom, *Trichoderma koningiopsis* – prethodno poznata samo u Njemačkoj i na Sardiniji (Migheli i sur., 2009.; Samuels i sur., 2006.), *Trichoderma longibrachiatum* (učestala rizosferna vrsta) i *Trichoderma paratroviride* (prethodno poznata u mediteranskoj regiji Španjolske). U mediteranskoj zoni Hrvatske uglavnom većinom su pronađeni anamorfi vrsta iz roda *Trichoderma*, što je u skladu s očekivanjima zbog nižih uvjeta vlage u tom području, posebice u ljetnim mjesecima (Jaklitsch i Voglmayr, 2015.).

Autori Sadfi-Zouaoui i sur. (2009.) uzorkovali su u četiri različite bioklimatske zone Tunisa, mediteranske sjevernoafričke zemlje s velikom klimatskom i edafskom varijabilnošću od sjevera prema jugu, kako bi se procijenila genetska raznolikost autohtonih vrsta *Trichoderma* spp. i njihov odnos s bioklimatskim zonama. Uočene su najmanje dvije različite vrste u svakom ekosustavu. Vrste *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma longibrachiatum* bile su prisutne u šumskim tlima u sjevernom Tunisu, *Trichoderma atroviride* i *Trichoderma hamatum* pronađene su u kultiviranim poljima u sjeveroistočnom Tunisu, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma saturnisporum* izolirane su iz šumskog tla u središnjem Tunisu, a u oazama južnog Tunisa bile su prisutne vrste *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma hamatum*. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s Diplomskim radom, u kojem su također utvrđene vrste: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma longibrachiatum*.

Međutim, utvrđivanje samo lokalnog broja vrsta nije dobar pokazatelj promjene bioraznolikosti (Wilsey i sur., 2005.). To je ponajviše uzrokovano antropogenim djelovanjem, jer ljudske aktivnosti nad ekosustavima i biogeokemijskim ciklusima često rezultiraju promjenama u brojnosti vrsta, pozitivno ili negativno (Hillebrand i sur., 2008.). Ali, lokalno bogatstvo vrsta proizlazi iz šireg, regionalnog bogatstva vrsta i može se iz njega predviđati, a raspon regionalne bioraznolikosti je limitiran djelovanjima na lokalnoj razini, poput utjecaja na stanište i izmjene mikroklimatskih uvjeta (Cornell, 1993.). Ljudska trgovina i putovanja rezultiraju transportom vrsta, što dovodi do regionalne homogenizacije sastava vrsta (McKinney i Lockwood, 1999.).

U istraživanju Migheli i sur. (2009.) na području Mediterana (otok Sardinija), dobiveni su zapanjujući rezultati o bioraznolikosti vrsta iz roda *Trichoderma*. Podaci upućuju na snažno smanjenje izvorne raznolikosti *Hypocrea* spp./*Trichoderma* spp. vrsta (autohtonih vrsta), koja je zamijenjena opsežnom invazijom vrsta iz Euroazije, Afrike i Pacifičkog bazena. Među pronađenim vrstama su: *Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma spirale*, *Trichoderma velutinum*, *Trichoderma hamatum*, *Hypocrea koningii/Trichoderma koningii*, *Hypocrea virens/Trichoderma virens*, *Trichoderma tomentosum*, *Hypocrea semiorbis*, *Hypocrea viridescens/Trichoderma viridescens*, *Hypocrea atroviridis/Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Hypocrea koningiopsis/Trichoderma koningiopsis* i *Trichoderma* sp. Većina vrsta pokazivale su genotipove koji su već bili pronađeni u Euroaziji ili na drugim kontinentima. Tri vrste koje su zabilježene na otoku Sardiniji, dio su i rezultata ovog Diplomskog rada: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma koningiopsis*.

Slično istraživanje bioraznolikosti vrsta iz roda *Trichoderma*, provedeno je u neotropskoj regiji (Meksiko, Gvatemala, Panama, Ekvador, Peru, Brazil i Kolumbija) (Hoyos-Carvajal i sur., 2009.). U 183 izolata utvrđena je relativno velika raznolikost vrsta koja se sastoji od 29 taksona: *Trichoderma asperellum* (60 izolata), *Trichoderma atroviride* (3), *Trichoderma brevicompactum* (5), *Trichoderma crassum* (3), *Trichoderma erinaceum* (3), *Trichoderma gamsii* (2), *Trichoderma hamatum* (2), *Trichoderma harzianum* (49), *Trichoderma koningiopsis* (6), *Trichoderma longibrachiatum* (3), *Trichoderma ovalisporum* (1), *Trichoderma pubescens* (2), *Trichoderma rossicum* (4), *Trichoderma spirale* (1), *Trichoderma tomentosum* (3), *Trichoderma virens* (8), *Trichoderma viridescens* (7) i *Hypocrea jecorina* (3) (anamorf: *Trichoderma reesei*), uz 11 neopisanih vrsta (*Trichoderma* sp.). Vrsta *Trichoderma asperellum* bila je prevladavajuća vrsta, zajedno s vrstom *Trichoderma harzianum*. Vrsta



*Trichoderma harzanium* također je najzastupljenija u ovom Diplomskom radu, a ostale utvrđene vrste ovog istraživanja koje se podudaraju su: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningiopsis* i *Trichoderma longibrachiatum*. Identifikacija tih vrsta je također provedena kombiniranim proučavanjem genetskih i morfoloških svojstava svake vrste te je uspješnost takve metode posebno istaknuta. Drugim riječima, metaboličke karakteristike vrsta mogu potvrditi genetičke razlike među vrstama, pokazujući značajne varijacije u ekspresiji fenotipskih karakteristika.

Područje Rusije, Sibira i Himalaja također je podvrgnuto proučavanju bioraznolikosti vrsta iz roda *Trichoderma* (Kulling i sur., 2000.). Molekularnim i morfološkim metodama identificirane su vrste: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma oblongisporum*, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma inhamatum* i ostale vrste koje nije bilo moguće identificirati. Vrste *Trichoderma atroviride* i *Trichoderma harzianum* također su zabilježene u rezultatima ovog Diplomskog rada, a općenito se smatraju učestalima.

Autori Kubicek i sur. (2003.), procjenjivali su genetičku i morfološku raznolikost autohtonih vrsta *Trichoderma* spp. u područja jugoistočne Azije (Tajvan, zapadna Indonezija). Identificirane su vrste: *Trichoderma harzianum/Trichoderma inhamatum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma spirale*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma asperellum*, *Hypocrea jecorina* (anamorf: *Trichoderma reesei*), *Trichoderma viride*, *Trichoderma hamatum* i *Trichoderma ghanense*. Pronađene vrste *Trichoderma atroviride* i *Trichoderma harzianum* zabilježene su i u okviru ovog Diplomskog rada.

Nekoliko istraživanja bioraznolikosti i rasprostranjenosti *Trichoderma* spp. provedeno je u Kini. Prema Sun i sur. (2012.), istraživanje biološke raznolikosti vrsta iz roda *Trichoderma* u Kini, rezultiralo je identifikacijom 23 vrste: *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma brevicompactum*, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma erinaceum*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma intricatum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma pleuroticola*, *Trichoderma reeseii* (*Hypocrea jecorina*), *Trichoderma sinensis*, *Trichoderma spirale*, *Trichoderma stromaticum*, *Trichoderma tomentosum*, *Trichoderma velutinum*, *Trichoderma vermipilum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*. Vrsta *Trichoderma harzianum* bila je najrasprostranjenija vrsta u Kini, što je u skladu s dobivenim rezultatima ovog Diplomskog rada. Osim najučestalije vrste

*Trichoderma harzianum*, s rezultatima ovog Diplomskog rada također se podudara pronalazak vrsta: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningiopsis* i *Trichoderma longibrachiatum*.

Također u Kini, prema istraživanju Jiang i sur. (2016.), u poljoprivrednim tlima utvrđena je znatna biološka raznolikost *Trichoderma* vrsta. Izolirano je 2078 sojeva koji su identificirani u 17 poznatih vrsta: *Trichoderma harzianum* (429 izolata), *Trichoderma asperellum* (425), *Trichoderma hamatum* (397), *Trichoderma virens* (340), *Trichoderma koningiopsis* (248), *Trichoderma brevicompactum* (73), *Trichoderma atroviride* (73), *Trichoderma fertile* (26), *Trichoderma longibrachiatum* (22), *Trichoderma pleuroticola* (16), *Trichoderma erinaceum* (16), *Trichoderma oblongisporum* (2), *Trichoderma polysporum* (2), *Trichoderma spirale* (2), *Trichoderma capillare* (2), *Trichoderma velutinum* (2) i *Trichoderma saturnisporum* (1). Utvrđeno je da bioraznolikost vrsta iz roda *Trichoderma* na poljoprivrednim poljima varira ovisno o regiji, usjevu i sezoni, pri čemu je ljeto pokazalo najveću biološku raznolikost od proučavanih godišnjih doba. Identificirane vrste *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma longibrachiatum* zabilježene su u ovom Diplomskom radu.

U još jednom istraživanju u Kini, Saravanakumar i sur. (2016.) istraživali su biološku raznolikost vrsta iz roda *Trichoderma* i njihov odnos s fizičkim i kemijskim svojstvima sedimenta močvarnih područja. Za identifikaciju *Trichoderma* vrsta primijenjene su dvije vrste molekularnih pristupa, metode ovisne o kulturi i neovisne metode. Od 491 uzoraka sedimenta dobiveno je ukupno 254 izolata koji su identificirani u 13 vrsta: *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma tawa*, *Trichoderma viridescens*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma viride* i *Trichoderma velutinum*. Nakon toga, metoda 454 pirosekvencijske analize neovisne o kulturi otkrila je ukupno šest vrsta kao što su *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* i dvije nepoznate vrste. Zanimljivo je da u prvoj metodi (ovisnoj o kulturi), vrste *Trichoderma citrinoviride* i *Trichoderma polysporum* nisu pronađene. Stoga, ovaj rad potvrđuje da bi kombinacija ovih dviju metoda mogla pokazati veću biološku raznolikost vrsta iz roda *Trichoderma*, nego bilo koja od ovih metoda zasebno. Također je utvrđeno da svojstva sedimenta, poput temperature, redoks potencijal (Eh) i pH vrijednosti značajno utječu na bioraznolikost vrsta iz roda *Trichoderma*. Vrste zabilježene u oba istraživanja, u Saravanakumar i sur. (2016.) i u ovom

Diplomskom radu su: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningiopsis* i *Trichoderma longibrachiatum*.

Znanstvenici Dou i sur. (2019.), provedeli su istraživanje bioraznolikosti i rasprostranjenosti vrsta iz roda *Trichoderma* u Kini. Ukupno je izolirano 3999 izolata iz šumskih, travnjačkih, močvarnih i poljoprivrednih ekosustava, a 50 vrsta identificirano je na temelju morfoloških karakteristika i analize sekvenci genskih markera. Identificirane vrste su: *Hypocrea semiorbis*, *Trichoderma epimyces*, *Trichoderma konilangbra*, *Trichoderma piluliferum*, *Trichoderma pleurotum*, *Trichoderma pubescens*, *Trichoderma strictipilis*, *Trichoderma hunua*, *Trichoderma oblongisporum* i neidentificirana vrsta, *Trichoderma* sp. Vrsta *Trichoderma harzianum* najzastupljenija je i najšire rasprostranjena. Ovim istraživanjem je utvrđeno da šumski ekosustavi i niske nadmorske visine imaju najveći biodiverzitet vrsta iz roda *Trichoderma*. Od vrsta utvrđenih ovim istraživanjem, samo je vrsta *Trichoderma harzianum* zajednička s rezultatima ovog Diplomskog rada, uz činjenicu da je najučestalija.

Kiselost tla je također uzeta u obzir u proučavanju bioraznolikost *Trichoderma* vrsta u alkaličnom tlu (pH 7,3-8,4) u sjevernom dijelu doline Nila u Egiptu. Prema Gherbawy i sur. (2004.), pronađene su samo dvije vrste, *Trichoderma harzianum* i anamorf od *Hypocrea orientalis* od izoliranih 20 sojeva s 9 različitih lokaliteta (19 različitih staništa). Međutim, za razliku od istraživanja Saravanakumar i sur. (2016.), čini se da je prisutnost ovih vrsta zapravo neovisna o staništu (pH, biljka, tip tla) te da su te dvije svojte autohtone u dolini Nila, a na njihovu prisutnost nije utjecala poljoprivredna povijest tla. Vrsta *Trichoderma harzianum* također je utvrđena ovim Diplomskim radom.

Osim najpoznatijih i najučestalijih vrsta iz roda *Trichoderma*, razlike u molekularnim sekvencama određenih genskih regija dovele su do opisivanja novih vrsta. U istraživanju Bissett i sur. (2003.) ustanovljeno je sedam novih vrsta za znanost iz roda *Trichoderma*, izoliranih iz tla ili kore drveća iz Sibira, Nepala, sjeverne Indije, Tajvana, Tajlanda, Kambodže i Malezije. Novootkrivene vrste su: *Trichoderma sinensis*, *Trichoderma effusum*, *Trichoderma helicum*, *Trichoderma rossicum*, *Trichoderma velutinum*, *Trichoderma cerinum* i *Trichoderma erinaceum*. U ovom radu posebno je naglašen doprinos molekularnih metoda identifikacije, odnosno podataka o sekvencama u određivanju vrsta. Naime, vrsta *Trichoderma helicum* se morfološki ne razlikuje od vrste *Trichoderma tomentosum*, iako te dvije vrste nisu filogenetski blisko povezane. Dakle, vrsta *Trichoderma helicum* nije mogla biti identificirana klasičnim

morfološkim metodama, već isključivo molekularnim analizama DNA sekvenci. Ove vrste nisu utvrđene u ovom Diplomskom radu.

Kolika je važnost prisutnost vrsta iz roda *Trichoderma* u rizosferi masline ukazuju istraživanja biostimulacije masline tim korisnim mikroorganizmima. U istraživanju Dini i sur. (2020.), procijenjeni su učinci biostimulacije vrstama *Trichoderma*, odnosno njihovim sekundarnim metabolitima (6-pentil- $\alpha$ -piron i harcijanska kiselina) na fenolni profil i antioksidativni potencijal ekstra djevičanskog maslinovog ulja i na listove masline, kako bi ih učinili komercijalno privlačnijim kao izvor fitokemikalija korisnih za farmaceutsku, kozmetičku i prehrambenu industriju. Rezultati tog istraživanja ukazuju na to da je djelovanje vrsta iz roda *Trichoderma* pozitivno na fenole i antioksidase u maslinovom ulju, ali isto tako povećava i ekonomsku vrijednost listova masline (koji se inače tretira kao otpad) kao izvora fitokemikalija (flavonoida, lignana i oleuropeina), korisnih za prehrambenu, farmaceutsku i kozmetičku industriju.

U sličnom istraživanju, autori Dini i sur. (2021.) sugeriraju da bi korištenje odabranih sojeva *Trichoderma* spp. i njihovih metabolita moglo pridonijeti nutricionističkim svojstvima maslinove koštunice (ploda), a to bi donijelo dodatne prednosti u skladištenju. Navedeno potvrđuju rezultatima, primjena (na korijen masline i metodom natapanja tla) odabranih sojeva *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma virens* i *Trichoderma harzianum* i njihovih metabolita (harcijanska kiselina i 6-pentil- $\alpha$ -piron) na koštunicama mladih maslina (starost 4 godine) rezultirala je povećanjem sekoiridoid oleuropeina i flavonoida luteolina. Biostimulacijski učinak vrste *Trichoderma harzianum* također je potvrđen istraživanjem Topolovec-Pintarić (2010.), u kojem je ta vrsta potaknula klijanje i rast sjemenki lana. Također, vrsta *Trichoderma viride* pokazala je dobar biotimulacijski učinak kao sastavni dio mikrokapsula u biognojivima (Topolovec-Pintarić i sur., 2017.).

Osim biostimulacijskog učinka, vrste gljiva iz roda *Trichoderma* poznate su i po antifungalnom i antagonističnom djelovanju. U ovom istraživanju mikroskopskim pregledom pronađene su tzv. hifalne petlje izolata M50, neidentificirane vrste *Trichoderma* sp. Naime, vrste iz roda *Trichoderma* poznati su paraziti nematoda (Sharon i sur., 2011.), a stvorenim hifalnim „omčama“ ili „petljama“ doslovno ih aktivno hvataju i parazitiraju. Osim vrsta iz roda *Trichoderma*, askomiceta *Arthrobotrys oligospora* također je gljiva poznata po aktivnom hvatanju nematoda (Tunlid i sur., 1994.).

U sjevernom Iranu, autori Naeimi i sur. (2011.) istraživali su bioraznolikost vrsta iz roda *Trichoderma* u poljima riže. Istraživanje je provedeno s ciljem utvrđivanja potencijalnih antagonističnih bio-čimbenika *Trichoderma* spp. u suzbijanju fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*, uzročnika paleži osja riže. Među šest dobivenih vrsta, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma virens* pokazale su se kao najčešće vrste. Istraživanjem je također otkriveno da je vrsta *Trichoderma harzianum* složena vrsta koja sadrži više ili manje različite ITS genotipove, a vrsta *Trichoderma virens* nije toliko raznolika.

U istraživanju Aleandri i sur. (2015.), izolirane su *Trichoderma* spp. iz rizosfere hrasta crnike, masline i lavande u rasadniku kako bi se odabrali učinkoviti antagonisti i agensi za poticanje rasta i njihova upotreba za izmjenu supstrata za rast rasadnika. Antagonističke sposobnosti izoliranih vrsta: *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, testirane su *in vitro* protiv čestih biljnih patogena, gljiva – *Sclerotinia sclerotiorum* (Ascomycota, Helotiales), *Verticillium dahliae* (Ascomycota, Glomerellales), *Rhizoctonia solani* (Basidiomycota, Cantharellales), ali i pseudogljiva – *Phytophthora nicotianae* (Chromista, Oomycota, Peronosporales) i *Phytophthora cinnamomi* (Chromista, Oomycota, Peronosporales). Na rast micelija svake ciljane fitopatogene vrste izravnim je, ali različitim intenzitetom utjecao svaki izolat *Trichoderma*, ali isto takav učinak su imali njegovi volatilni i nevolatilni metaboliti, što ukazuje na različite mehanizme antagonizma ovih oportunističkih gljiva. Primjenom mješavine *Trichoderma* izolata smanjena je trulež korijena uzrokovana patogenima *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum*, ali u manjoj mjeri. Najveću antibiotsku učinkovitost protiv oomicete *Phytophthora nicotianae* pokazala je vrsta *Trichoderma harzianum*. Konačan zaključak ovog rada je da primjena kombinacije lokalnih antagonista putem supstrata može imati zadovoljavajuću zaštitnu ulogu u održivoj proizvodnji sadnica.

Prema Amira i sur. (2017.), primjena sojeva *Trichoderma harzianum* može biti prikladna alternativa fungicidima u zaštiti nasada maslina od fitopatogene gljive *Fusarium solani*, uzročnika fuzarijske truleži i odumiranja maslinovih stabala. Inhibitorno djelovanje antagonističke vrste *Trichoderma harzianum* nad patogenom *Fusarium solani* na maslini potvrđena je *in vitro* i *in vivo*. Navedeno potvrđuje i studija Mulatu i sur. (2022.), u kojoj su istraživani distribucija i bioraznolikost vrsta iz roda *Trichoderma* iz uzoraka tla rizosfere biljke kave (*Coffea arabica*) iz Etiopije i njihov potencijal za suzbijanje biljnog patogena *Fusarium xylarioides*, koji uzrokuje bolest venuće biljke kave. Uočena je relativno velika raznolikost vrsta, uključujući 16 taksona i 11 neopisanih izolata, među kojima su najzastupljenije bile vrste

*Trichoderma asperellum*, *Trichoderma asperelloides* i *Trichoderma longibrachiatum*. Antagonistički potencijal odabranih izolata *Trichoderma* nad fitopatogenom gljivom *Fusarium xylarioides* ispitan je metodom dvojnih kultura i biološkim testovima difuzije u agaru. Rezultati sučeljavanja *in vitro* otkrili su da *Trichoderma asperellum* i *Trichoderma longibrachiatum* smanjuju rast micelija vrste *Fusarium xylarioides* za više od 80 %, što se smatra značajnim.

Na maslini je česta pojava i verticilijsko venuće (uzročnik *Verticillium dahliae*), a posebno su ugrožene masline u Španjolskoj i drugim mediteranskim zemljama. Prema Carrero-Carrón i sur. (2016.), sojevi gljive *Trichoderma asperellum* pokazuju visok potencijal za suzbijanje patogena *Verticillium dahliae*. U njihovom istraživanju, dva soja *Trichoderma asperellum* značajno su smanjila ozbiljnost simptoma ove bolesti i standardizirano područje ispod krivulje napredovanja bolesti uzrokovane visoko virulentnim *Verticillium dahliae*, ali ne konačnu učestalost bolesti. Treći korišteni soj gljive *Trichoderma asperellum* značajno je povećao rast stabala masline i pokazao veću sposobnost kolonizacije rizosfere masline i uspostavljanja endofitskog rasta u korijenu masline.

U istraživanju Reghmit i sur. (2021.), autohtoni sojevi *Trichoderma* spp. izolirani su iz tla rizosfere masline u sjevernom Alžiru te je ispitan njihov potencijal u suzbijanju „soil-borne“ patogena *Verticillium dahliae*, koji uzrokuje značajne gubitke u usjevima maslina u sjeverozapadnoj Argentini. Rezultatima je utvrđeno da su izolati *Trichoderma* učinkoviti u smanjenju rasta micelija vrste *Verticillium dahliae in vitro*. Također su utvrđeni važni sekundarni volatilni metaboliti antifungalnog djelovanja, poput undekana, oktadekana, ikozana, 13-dokozenamida, heksadekanamida, 9-oktadecenamida, ciklopentanona, 2-metila, tetradekanske kiseline, propil estera, oleinske kiseline i n-heksadekanske kiseline.

U studiji Carrasco i sur. (2023.), izolirano je 39 sojeva *Trichoderma* spp. iz tla maslinika i prirodnih staništa sjeverozapadne Argentine koji su morfološki i molekularno karakterizirani. Identificirano je 13 vrsta iz roda *Trichoderma*. Fiziološka karakterizacija otkrila je da 14 sojeva proizvodi IAA (indol octenu kiselinu) dok 10 pokazuje endofitsku sposobnost rasta. Kvantificirani antagonistički parametri bili su vrlo varijabilni: osam sojeva *Trichoderma* sp. pokazalo je visoke vrijednosti inhibicije rasta patogena *Verticillium dahliae*, dok je šest sojeva postiglo vrijednosti mikoparazitizma >90 %. Tri endofitska soja *Trichoderma* sp. pokazala su produkciju IAA i antagonističko djelovanje nad vrstom *Verticillium dahliae*, čime se pokazao idealnim bio-čimbenikom za biološku zaštitu maslina. Ovim radom su također naglašeni benefitetni učinci odabranih sojeva *Trichoderma* spp. kao ublaživači uvjeta abiotičkog stresa koji

prevladavaju u sušnim područjima sjeverozapadne Argentine (tlo niskog sadržaja organske tvari i zadržavanje vode). S time se može povući paralela okolišnih predispozicija mediteranskih maslinika obuhvaćenih istraživanjem ovog diplomskog rada. U uvjetima krških kamenjara i suše u kojima rastu masline, autohtone vrste iz roda *Trichoderma* prisutne u rizosferi potencijalni su im „partneri“ u savladavanju abiotičkih stresova, ali isto tako i biostimulatori te zaštitini bio-čimbenici u stalnoj izloženosti štetnim organizmima.

## 6. Zaključak

Na temelju rezultata provedenog istraživanja zastupljenosti vrsta iz roda *Trichoderma* u rizosferi masline s različitih lokacija Mediteranske regije Hrvatske proizlaze sljedeći zaključci.

- Na području Mediteranske regije Hrvatske, u svih 10 uzoraka tla utvrđene su autohtone vrste iz roda *Trichoderma*.
- Izolirane vrste su identificirane molekularnim metodama, sekvenciranjem DNA genskih regija ITS, čime su svojste determinirane do razine roda te *rpb2* i *tef1-a*, pomoću kojih su utvrđene vrste. Identifikacija je dodatno potvrđena mikroskopskom analizom morfoloških svojstava svake vrste.
- Utvrđena je relativno velika biološka raznolikost vrsta iz roda *Trichoderma* u istraživanom mediteranskom području (šest vrsta).
- Identificirane vrste iz 10 uzoraka tla iz mediteranskih maslinika su: *Trichoderma koningiopsis* agg., *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma paratroviride* i *Trichoderma* sp. (neidentificirana vrsta).
- Najučestalije vrste u istraživanom tlu rizosfere masline su *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma koningiopsis* agg..

S obzirom na to da su kroz mnogobrojna istraživanja ove tematike prikazani benefitni učinci i krucijalne (biostimulirajuće, antagonističke, antifungalne) uloge benefitnih gljiva *Trichoderma* spp., važno ih je nastaviti sustavno proučavati. To se odnosi na molekularna, morfološka i fiziološka svojstva, ali isto tako i na utvrđivanje bioraznolikosti i rasprostranjenosti. U svrhu uspješne komercijalizacije bioloških pripravaka na bazi vrsta iz roda *Trichoderma*, potrebno je provesti dodatna taksonomska istraživanja nepoznatih autohtonih vrsta, za koje je utvrđena veća efikasnost u biološkoj zaštiti bilja.



## 7. Popis literature

1. Abdullah N. S., Doni F., Mispan M. S., Saiman M. Z., Yusuf Y. M., Oke M. A., Suhaimi N. S. M. (2021). Harnessing *Trichoderma* in agriculture for productivity and sustainability. *Agronomy*, 11(12), 2559.
2. Aleandri M. P., Chilosi G., Bruni N., Tomassini A., Vettraino A. M., Vannini A. (2015). Use of nursery potting mixes amended with local *Trichoderma* strains with multiple complementary mechanisms to control soil-borne diseases. *Crop Protection*, 67, 269-278.
3. Alexopoulos C. J., Mims C. W., Blackwell M. (1996). *Introductory mycology* (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.
4. Almeida F. B., Cerqueira F. M., Silva R. N., Ulhoa C. J., Lima A. L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology letters*, 29: 1189–1193.
5. Aly A. A., Abdel-Sattar M. A., Omar M. R., Abd-Elsalam K. A. (2007). Differential antagonism of *Trichoderma* sp. against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*, 47(2).
6. Amira M. B., Lopez D., Mohamed A. T., Khouaja A., Chaar H., Fumanal B., Gousset-Dupont A., Bonhomme L., Label P., Goupil P., Ribeiro S., Pujade-Renaud V., Julien J.-L., Auguin D., Venisse J. S. (2017). Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control*, 110, 70-78.
7. Anderson I. C., Cairney J. W. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental microbiology*, 6(8), 769-779.
8. Antonelli A., Fry C., Smith, R. J., Simmonds M. S. J., Kersey P. J., Pritchard H. W., Abbo M. S., Acedo C., Adams J., Ainsworth A. M., Allkin B., Annecke W., Bachman S. P., Bacon K., Bárrios S., Barstow C., Battison A., Bell E., Bensusan K., Bidartondo M. I., Blackhall-Miles R. J., Borrell J. S., Brearley F. Q., Breman E., Brewer R. F. A., Brodie J., Cámara-Leret R., Campostrini Forzza R., Cannon P., Carine M., Carretero J., Cavagnaro T. R., Cazar M.-E., Chapman T., Cheek M., Clubbe C., Cockel C., Collemare J., Cooper A., Copeland A. I., Corcoran M., Couch C., Cowell C., Crous P.,

da Silva M., Dalle G., Das D., David J. C., Davies, L., Davies N., De Canha M. N., de Lirio E. J., Demissew S., Diazgranados M., Dickie J., Dines T., Douglas B., Dröge G., Dulloo M. E., Fang R., Farlow A., Farrar K., Fay M. F., Felix J., Forest F., Forrest L. L., Fulcher T., Gafforov Y., Gardiner L. M., Gâteblé G., Gaya E., Geslin B., Gonçalves S. C., Gore C. J. N., Govaerts R., Gowda B., Grace O. M., Grall A., Haelewaters D., Halley J. M., Hamilton M. A., Hazra A., Heller T., Hollingsworth P. M., Holstein N., Howes M.-J. R., Hughes M., Hunter D., Hutchinson N., Hyde K., Iganci J., Jones M., Kelly L. J., Kirk P., Koch H., Krisai-Greilhuber I., Lall N., Langat M. K., Leaman D. J., Leão T. C., Lee M. A., Leitch I. J., Leon C., Lettice E., Lewis G. P., Li L., Lindon H., Liu J. S., Liu U., Llewellyn T., Looney B., Lovett J. C., Łuczaj Ł., Lulekal E., Maggassouba S., Malécot V., Martin C., Masera O. R., Mattana E., Maxted N., Mba C., McGinn K. J., Metheringham C., Miles S., Miller J., Milliken W., Moat J., Moore P. G. P., Morim M. P., Mueller G. M., Muminjanov H., Negrão R., Nic Lughadha E., Nicolson N., Niskanen T., Nono Womdim R., Noorani A., Obreza M., O'Donnell K., O'Hanlon R., Onana J.-M., Ondo I., Padulosi S., Paton A., Pearce T., Pérez Escobar O. A., Pieroni A., Pironon S., Prescott T. A. K., Qi Y. D., Qin H., Quave C. L., Rajaovelona L., Razanajatovo H., Reich P. B., Rianawati E., Rich T. C. G., Richards S. L., Rivers M. C., Ross A., Rumsey F., Ryan M., Ryan P., Sagala S., Sanchez M. D., Sharrock S., Shrestha K. K., Sim J., Sirakaya A., Sjöman H., Smidt E. C., Smith D., Smith P., Smith S. R., Sofu A., Spence N., Stanworth A., Stara K., Stevenson P. C., Stroh P., Suz L. M., Tambam B. B., Tatsis E. C., Taylor I., Thiers B., Thormann I., Trivedi C., Twilley D., Twyford A. D., Ulian T., Utteridge T., Vaglica V., Vásquez-Londoño C., Victor J., Viruel J., Walker B. E., Walker K., Walsh A., Way M., Wilbraham J., Wilkin P., Wilkinson T., Williams, C., Winterton D., Wong K. M., Woodfield-Pascoe N., Woodman J., Wyatt L., Wynberg R., Zhang B. G. (2020). State of the World's Plants and Fungi 2020. Royal Botanic Gardens, Kew.

9. Aslam S., Tahir A., Aslam M. F., Alam M. W., Shedayi A. A., Sadia S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi—a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493-504.
10. Astuti A., Muftiyatunnisa S., Trisnawati D. W. (2021). Evaluation of Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* Against Various Pathogenic Fungi Infecting Dragon Fruit Stem. In 4th International Conference on Sustainable Innovation 2020—Technology, Engineering and Agriculture (ICoSITEA 2020) (pp. 218-221). Atlantis Press.

11. Atanasova L., Jaklitsch W. M., Komoń-Zelazowska M., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2010). Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorinal/T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7259-7267.
12. Bailey B. A., Bae H., Strem M. D., Crozier J., Thomas S. E., Samuels G. J., Vinyard B. T., Holmes K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological control*, 46(1), 24-35.
13. Bailey B. A., Melnick R. L. (2013). The endophytic *Trichoderma*. In *Trichoderma: Biology and Applications* 1st edn (eds Mukherjee, P. K. et al.) 152–172 (CAB International, Wallingford).
14. Baldauf S. L, Palmer J. D. (1993). Animals and fungi are each others closest relatives—congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90:11558-11562.
15. Begerow D., Nilsson H., Unterseher M., Maier W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 99-108.
16. Bisby G. R. (1939). *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Transactions of the British Mycological Society*, 23(2), 149-168.
17. Bissett J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian journal of botany*, 62(5), 924-931.
18. Bissett J. (1991 a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian journal of botany*, 69(11), 2357-2372.
19. Bissett J. (1991 b). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian journal of botany*, 69(11), 2373-2417.
20. Bissett J. (1991 c). A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2418-2420.
21. Bissett J., Szakacs G., Nolan C. A., Druzhinina I., Gradinger C., Kubicek C. P. (2003). New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*, 81(6), 570-586.
22. Blackwell M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
23. Blaszczyk L. M. S. K. S., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jedryczka M. (2014). *Trichoderma* spp.—application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of plant protection research*, 54(4).

24. Bridge P., Spooner B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and soil*, 232, 147-154.
25. Brodeur J. (2012). Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary applications*, 5(5), 470-480.
26. Brotman Y., Kapuganti J. G., Viterbo A. (2010). *Trichoderma*. *Current Biology*, 20(9), R390-R391.
27. Bustamante D. E., Calderon M. S., Leiva S., Mendoza J. E., Arce M., Oliva M. (2021). Three new species of *Trichoderma* in the *Harzianum* and *Longibrachiatum* lineages from Peruvian cacao crop soils based on an integrative approach. *Mycologia*, 113(5), 1056-1072.
28. Cai F., Druzhinina I. S. (2021). In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity*, 107(1), 1-69.
29. Cardinale B. J., Gonzalez A., Allington G. R., Loreau M. (2018). Is local biodiversity declining or not? A summary of the debate over analysis of species richness time trends. *Biological Conservation*, 219, 175-183.
30. Carrasco F., Miranda V., Sede S. M., Bustos S., González V., Otero L., Fracchia S. (2023). Screening for native *Trichoderma* strains as potential biocontrollers of the olive pathogen *Verticillium dahliae*. *Arid Land Research and Management*, 1-22.
31. Carrero-Carrón I., Trapero-Casas J. L., Olivares-García C., Monte E., Hermosa R., Jiménez-Díaz R. M. (2016). *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop protection*, 88, 45-52.
32. Cavalcante R. S., Lima H. L., Pinto G. A., Gava C. A., Rodrigues S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 100-104.
33. Chapin F. S. III, Walker B. H., Hobbs R. J., Hooper D. U., Lawton J. H., Sala O. E., Tilman D. (1997). Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science* 277: 500–504.
34. Chaudhary D. K., Dahal R. H. (2017). DNA bar-code for identification of microbial communities: A mini-review. *EC Microbiology*, 6, 219-224.
35. Chaverri P., Castlebury L. A., Overton B. E., Samuels G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95(6), 1100-1140.

36. Chaverri P., Samuels G. J. (2013). Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. *Evolution* 7, 2823–2837.
37. Cheng C. H., Yang C. A., Peng K. C. (2012). Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology*, 102: 1054–1063.
38. Chesson P. (2000). Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 343–366.
39. Colavolpe M. B., Mejía S. J., Albertó E. (2014). Efficiency of treatments for controlling *Trichoderma* spp. during spawning in cultivation of lignicolous mushrooms. *Brazilian journal of Microbiology*, 45, 1263-1270.
40. Colwell R. R. (1997). Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 302-307.
41. Cornell H. V. (1993). Unsaturated patterns in species assemblages: the role of regional processes in setting local species richness. *Species diversity in ecological communities*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, 243-252.
42. Cox P., Wilkinson S. P., Anderson J. M. (2001). Effects of fungal inocula on the decomposition of lignin and structural polysaccharides in *Pinus sylvestris* litter. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 246–251.
43. De Respini S., Vogel G., Benagli C., Tonolla M., Petrini O., Samuels G. J. (2010). MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9, 79-100.
44. Dini I., Graziani G., Fedele F. L., Sicari A., Vinale F., Castaldo L., Ritieni A. (2020). Effects of *Trichoderma* biostimulation on the phenolic profile of extra-virgin olive oil and olive oil by-products. *Antioxidants*, 9(4), 284.
45. Dini I., Pascale M., Staropoli A., Marra R., Vinale F. (2021). Effect of Selected *Trichoderma* Strains and Metabolites on Olive Drupes. *Applied Sciences*, 11(18), 8710.
46. Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. (2007). *Compendium of soil fungi*, 2nd ed. IHW-Verlag and Verlagsbuchhandlung, Eching, Germany.
47. Dou K., Gao J., Zhang C., Yang H., Jiang X., Li J., Li Y., Wang W., Xian H., Li S., Liu Y., Hu J., Chen J. (2019). *Trichoderma* biodiversity in major ecological systems of China. *Journal of Microbiology*, 57, 668-675.

48. 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.
49. Druzhinina I., Kubicek C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 6(2), 100-112.
50. Druzhinina I. S., Kopchinskiy A. L. G., Kubicek C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47, 55–64.
51. Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., Mukherjee P. K., Zeilinger S., Grigoriev I. V., Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 749-759.
52. Duche, J., Heim R. (1931). "Recherches sur la flore mycologiques des sols sableux, I." *Trav. Crypt. didiis a Louis Mangin. Lab. Crypt., Mus. Nat. Paris*, pp. 431-58, I pl., 5 figs.
53. Ellis E. C., Ramankutty N. (2008). Putting people in the map: anthropogenic biomes of the world. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(8), 439-447.
54. Erlich H. A. (1989). Polymerase chain reaction. *Journal of clinical immunology*, 9, 437-447.
55. Esposito E., Silva M. D. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critical reviews in microbiology*, 24(2), 89-98.
56. Evans H. C., Holmes K. A. Thomas S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2, 149–160.
57. Fierer N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579-590.
58. Frąc M., Hannula S. E., Bełka M., Jędryczka M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in microbiology*, 9, 707.
59. Fraceto L. F., Maruyama C. R., Guilger M., Mishra S., Keswani C., Singh H. B., de Lima R. (2018). *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(8), 2056-2063.

60. 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, 69–83.
61. Gamfeldt L., Hillebrand H., Jonsson P. R. (2008). Multiple functions increase the importance of biodiversity for overall ecosystem functioning. *Ecology*, 89(5), 1223-1231.
62. Gams W., Bissett J. (2002). Morphology and identification of *Trichoderma* and *Gliocladium*, 3-31.
63. Gams W., Jaklitsch W. (2011). Fungal nomenclature 3. A critical response to the 'Amsterdam Declaration'. *Mycotaxon*, 116(1), 501-512.
64. Gatehouse H. S., Malone L. A. (1998). The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of invertebrate pathology*, 71(2), 97-105.
65. Gherbawy Y., Druzhinina I., Shaban G. M., Wuczkowsky M., Yaser M., El-Naghy M. A., Prillinger H.-J., Kubicek C. P. (2004). *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycological progress*, 3, 211-218.
66. Gilman J. C. (1957). *A manual of soil fungi*, 2nd ed. Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA.
67. Greenspan D., Galun E. (1971). Morphogenesis in *Trichoderma*: autonomous and nonautonomous pigmentation in heterokaryons of color mutants in *Trichoderma viride*. *American Journal of Botany*, 58(4), 287-291.
68. Grondona I., Rodríguez A., Gómez M. I., Camacho R., Llobell A., Monte E. (2004). TUSAL®, a commercial biocontrol formulation based on *Trichoderma*. *Bulletin OILB/SROP*, 285-288.
69. Guzmán-Guzmán P., Porras-Troncoso M. D., Olmedo-Monfil V., Herrera-Estrella A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*, 109(1), 6-16.
70. Haddad P. E., Leite L. G., Lucon C. M. M., Harakava R. (2017). Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 52, 1140-1148.
71. Hajieghrari B., Torabi-Giglou M., Mohammadi M. R., Davari M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7(8):967-972.

72. Harman G. E. (1994). Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot caused by *Phytophthora* spp. *Phytopathology*, 74, 107-111.
73. Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *National Review*, 2(1), 43–56.
74. Harman G. E., Doni F., Khadka R. B., Uphoff N. (2021). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of applied microbiology*, 130(2), 529-546.
75. Hasan M. M., Rahman S. M., Kim G. H., Abdallah E., Oh D. H. (2012). Antagonistic potentiality of *Trichoderma harzianum* towards seed-borne fungal pathogens of winter wheat cv. Protiva *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 585–591.
76. Hawksworth D. L. (1997). The fascination of fungi: exploring fungal diversity. *Mycologist*, 11(1), 18-22.
77. Hawksworth D. L., Lücking R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 10-1128.
78. Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.
79. Hernández-Rodríguez M. del C., Evans H. C., de Abreu L. M., de Macedo D. M., Ndacnou M. K., Bekele K. B., Barreto R. W. (2021). New species and records of *Trichoderma* isolated as mycoparasites and endophytes from cultivated and wild coffee in Africa. *Scientific reports*, 11(1), 5671.
80. Hill R., Leitch I. J., Gaya E. (2021). Targeting *Ascomycota* genomes: what and how big?. *Fungal Biology Reviews*, 36, 52-59.
81. Hillebrand H., Gruner D. S., Borer E. T., Bracken M. E. S., Cleland E. E., Elser J. J., Harpole W. S., Ngai J. T., Seabloom E. W., Shurin J. B., Smith J. E. (2007). Consumer versus resource control of producer diversity depends on ecosystem type and producer community structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 10904–10909.
82. Hillebrand H., Bennett D. M., Cadotte M. W. (2008). Consequences of dominance: a review of evenness effects on local and regional ecosystem processes. *Ecology*, 89, 1510–1520.
83. Hillebrand H., Matthiessen B. (2009). Biodiversity in a complex world: consolidation and progress in functional biodiversity research. *Ecology letters*, 12(12), 1405-1419.



84. Howell C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87, 4–10.
85. Hoyos-Carvajal L., Orduz S., Bissett J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615-631.
86. Hwang J., Benson D. M. (2003). Expression of induced systemic resistance in poinsettia cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleate *Rhizoctonia*. *Biological control*, 27(1), 73-80.
87. Hyde K. D. (2022). The numbers of fungi. *Fungal Diversity*, 114(1), 1-1.
88. Ikram M., Ali N., Jan G., Iqbal A., Hamayun M., Jan F. G., Hussain A., Lee I. J. (2019). *Trichoderma reesei* improved the nutrition status of wheat crop under salt stress. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 590-602.
89. Index Fungorum (2023).  
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp?strGenus=Trichoderma>,  
pristupljeno: 11.6.2023.
90. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (1990). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, USA.
91. Jain A. K., Kumar A., Chouhan S. S., Tripathi S. K. (2017). Cultural characteristics and evaluation of *Trichoderma* isolates against *Rhizoctonia solani* Kühn causing banded leaf and sheath blight of Little Millet. *Annals of Plant Protection Sciences*, 25(1), 140-143.
92. Jaklitsch W. M. (2009). European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology*, 63:1–91.
93. Jaklitsch W. M., Stadler M., Voglmayr H. (2012). Blue pigment in *Hypocrea caerulea* sp. nov. and two additional new species in sect. *Trichoderma*. *Mycologia*, 104(4), 925-941.
94. Jaklitsch W. M., Samuels G. J., Ismaiel A., Voglmayr H. (2013). Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31(1), 112-146.
95. Jaklitsch W. M., Voglmayr H. (2013). New combinations in *Trichoderma* (*Hypocreaceae*, *Hypocreales*). *Mycotaxon*, 126, 143.
96. Jaklitsch W. M., Voglmayr H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, 80, 1-87.

97. Japanis F. G., Vetaryan S., Raja N. K. K., Mokhtar M. A. A., Fishal E. M. M. (2022). The Impact of *Trichoderma* spp. on Agriculture and Their Identification. *Malaysian Applied Biology*, 51(6), 1-15.
98. Jiang Y., Wang J. L., Chen J., Mao L. J., Feng X. X., Zhang C. L., Lin F. C. (2016). *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. *PLoS One*, 11(8), e0160613.
99. Katan J. (2000). Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Protection*, 19(8-10), 725-731.
100. Kerroum F., Noureddine K., Eddine H. J., Mebrouk K. (2015). Biological control of *Fusarium crown* and root rot disease of tomato by *Trichoderma harzianum* in the west of Algeria. *International Journal of Natural Sciences*, 6, 141-146.
101. Kiarie S., Nyasani J. O., Gohole L. S., Maniania N. K., Subramanian S. (2020). Impact of fungal endophyte colonization of maize (*Zea mays* L.) on induced resistance to thrips-and aphid-transmitted viruses. *Plants*, 9(4), 416.
102. Kim C. S., Shirouzu T., Nakagiri A., Sotome K., Nagasawa E., Maekawa N. (2012 a). *Trichoderma mienum* sp nov. isolated from mushroom farms in Japan. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102: 629–641.
103. Kim C. S., Yu S. H., Nakagiri A., Shirouzu T., Sotome K., Kim S. C., Maekawa N. (2012 b). Re-evaluation of *Hypocrea pseudogelatinosa* and *H. pseudostraminea* isolated from shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) cultivation in Korea and Japan. *The Plant Pathology Journal*, 28: 341–356.
104. Kim J. Y., Kwon H. W., Lee D. H., Ko H. K., Kim S. H. (2019). Isolation and characterization of airborne mushroom damaging *Trichoderma* spp. from indoor air of cultivation houses used for oak wood mushroom production using sawdust media. *The plant pathology journal*, 35(6), 674.
105. Kirk J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169–188.
106. Kredics L., Antal Z., Dóczi I., Manczinger L., Kevei F., Nagy E. (2003). Clinical importance of the genus *Trichoderma*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 50: 105–117.
107. 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 *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Elsevier (pp. 3-24).

108. Kredics L., Naeimi S., Hatvani L., Vágvölgyi C., Cai F., Druzhinina I. S., Manczinger, L. (2021). 'The Good, the Bad and the Ugly' in the shades of green: the genus *Trichoderma* in the spotlight. *Indian Phytopathology*, 74(2), 403-411.
109. Krishnamurthy P. K., Francis R. A. (2012). A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*, 21(8):1901–1919.
110. 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 and biology*, 38(3), 310-319.
111. Kubicek C. P., Komon-Zelazowska M., Druzhinina I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 9:753–763.
112. Kuhls K., Lieckfeldt E., Börner T., Guého E. (1999). Molecular re-identification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical Mycology*, 37: 25–33.
113. Kullnig C., Szakacs G., Kubicek C. (2000). Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycological Research*, 104, 1117–1125.
114. Kumar K., Amaresan N., Bhagat S., Madhuri K., Srivastava R. C. (2012). Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 137-144.
115. Lee S., Yap M., Behringer G., Hung R., Bennett J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 1-14.
116. Leelavathi M. S., Vani L., Reena P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 3(1), 96-103.
117. Lindahl B. D., Nilsson R. H., Tedersoo L., Abarenkov K., Carlsen T., Kjøller R., Kõljalg U., Pennanen T., Rosendahl S., Stenlid J., Kauserud H. (2013). Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers—a user's guide. *New phytologist*, 199(1), 288-299.
118. Liu J. B., Gilardi G., Gullino M. L., Garibaldi A. (2009). Effectiveness of *Trichoderma* spp. Obtained from re-used soilless substrates against *Phytophthora ultimum* on cucumber seedlings. *Journal of plant Diseases and Protection*, 116(4), 156-163.

119. Liu M., Liu J., Wang W. M. (2012) Isolation and functional analysis of Thmfs1, the first major facilitator superfamily transporter from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*, 34: 1857–1862.
120. Liu Y. J., Whelen S., Hall B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799–1808.
121. Lopes F. A. C., Steindorff A. S., Geraldine A. M., Brandao R. S., Monteiro V. N., Lobo M., Coelho A. S. G., Ulhoa C. J. (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology*, 116: 815–824.
122. López-Bucio J., Pelagio-Flores R., Herrera-Estrella A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia horticultrae*, 196, 109-123.
123. 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.
124. Louzada G. A. D. S., Carvalho D. D. C., Mello S. C. M., Lobo Júnior M., Martins I., Braúna L. M. (2009). Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, 9(3), 145-149.
125. Lu B., Druzhinina I. S., Fallah P., Chaverri P., Gradinger C., Kubicek C. P., Samuels G. J. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum* and their newly discovered relatives. *Mycologia*, 96(2), 310-342.
126. Ma J., Tsegaye E., Li M., Wu B., Jiang X. (2020). Biodiversity of *Trichoderma* from grassland and forest ecosystems in Northern Xinjiang, China. *3 Biotech*, 10(8), 1-13.
127. Manjunath M., Singh A., Tripathi A. N., Prasanna R., Rai A. B., Singh B. (2017). Bioprospecting the fungicides compatible *Trichoderma asperellum* isolate effective against multiple plant pathogens in vitro. *Journal of Environmental Biology*, 38(4), 553-560.
128. Mastouri F., Björkman T., Harman G. E. (2012). *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(9), 1264-1271.

129. Matei S., Matei G. M., Cornea P., Popa G. (2011). Characterization of soil *Trichoderma* isolates for potential biocontrol of plant pathogens. *Factori și procese pedogenetice din zona temperată*, 10(1), 29-37.
130. Matheny P. B., Wang Z., Binder M., Curtis J. M., Lim Y. W., Nilsson R. H., Hughes K. W., Hofstetter V., Ammirati J. F., Schoch C. L., Langer E., Langer G., McLaughlin D. J., Wilson A. W., Frøslev T., Ge Z.-W., Kerrigan R. W., Slot J. C., Yang Z.-L., Baroni T. J., Hibbett D. S. (2007). Contributions of *rpb2* and *tefl* to the phylogeny of mushrooms and allies (*Basidiomycota*, *Fungi*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 43(2), 430-451.
131. McKinney M. L., Lockwood J. L. (1999). Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 450–453.
132. McNeely J. A. (1992). The sinking ark: pollution and the worldwide loss of biodiversity. *Biodiversity & Conservation*, 1, 2-18.
133. Mendoza J. L. H., Pérez M. I. S., Prieto J. M. G., Velásquez J. D. Q., Olivares J. G. G., Langarica H. R. G. (2015). Antibiosis of *Trichoderma* spp. strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 1093-1101.
134. Migheli Q., Balmas V., Komoň-Zelazowska M., Scherm B., Fiori S., Kopchinskiy A. G., Kubicek C. P., 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 *Hypocreales/Trichoderma*. *Environmental microbiology*, 11(1), 35-46.
135. Mihajlović M., Rekanović E., Hrustić J., Grahovac M., Tanović B. (2017). Methods for management of soilborne plant pathogens. *Pesticidi i fitomedicina*, 32(1), 9-24.
136. Moritz C., Cicero C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS biology*, 2(10), e354.
137. Montalvão S. C. L., Marques E., Silva J. B. T., Silva J. P., Mello S. C. M. (2020). *Trichoderma* Activity in seed germination, promoting seedling growth and rhizocompetence in tomato plants. *Journal of Agricultural Science*, 12(10), 252.
138. Mueller G. M., Schmit J. P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and conservation*, 16, 1-5.
139. Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Singh U. S., Mukherjee M., Schmoll M. (2013 a) *Trichoderma: Biology and Applications*. CABI, 327 pp.

140. Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Herrera-Estrella A., Schmoll M., Kenerley C. M. (2013 b). *Trichoderma* research in the genome era. Annual Review of Phytopathology, 51, 105–129.
141. Mukherjee P. K., Mendoza-Mendoza A., Zeilinger S., Horwitz B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. Fungal Biology Reviews, 39, 15-33.
142. Mulatu A., Megersa N., Abena T., Kanagarajan S., Liu Q., Tenkegna T. A., Vetukuri R. R. (2022). Biodiversity of the genus *Trichoderma* in the rhizosphere of coffee (*Coffea arabica*) plants in Ethiopia and their potential use in biocontrol of coffee wilt disease. Crops, 2(2), 120-141.
143. 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.
144. Nilsson R. H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Larsson K. H., Kõljalg U. (2006). Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. PloS one, 1(1), e59.
145. Nilsson R. H., Abarenkov K., Larsson K. H., Kõljalg U. (2011). Molecular identification of fungi: rationale, philosophical concerns, and the UNITE database. The Open Applied Informatics Journal, 5(1):81–86.
146. Nusaibah S. A., Musa H. A. (2019). Review report on the mechanism of *Trichoderma* spp. as biological control agent of the Basal Stem Rot (BSR) disease of *Elaeis guineensis*. *Trichoderma—The Most Widely Used Fungicide*, 1st ed.; Mohammad, MS, Sharif, U., Buhari, TR, Eds, 79-90.
147. O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E., Ploetz R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(5): 2044–2049.
148. Oxelman B., Bremer B. (2000). Discovery of paralogous nuclear gene sequences coding for the second-largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) and their phylogenetic utility in Gentianales of the asterids. Molecular Biology and Evolution, 17(8), 1131-1145.
149. Pandya J. R., Sabalpara A. N., Chawda S. K. (2011). *Trichoderma*: a particular weapon for biological control of phytopathogens. Journal of Agricultural Technology, 7(5), 1187-1191.

150. Park M. S., Bae K. S., Yu S. H. (2006). Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology*, 34(3), 111-113.
151. Persoon C. H. (1794). Neuer Versuch einer systematischen Einteilung der Schwämme. *Racodium Römer's Neues Magazin der Botanik*, 1:123.
152. Petersen R. H., Hawksworth D. L. (2016). Notable historical databases of fungal names. *IMA Fungus*, 7(1), A28-A41.
153. Pino-Bodas R., Martin M. P., Burgaz A. R., Lumbsch H. T. (2013). Species delimitation in *Cladonia* (*Ascomycota*): a challenge to the DNA barcoding philosophy. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1058-1068.
154. Qiao M., Du X., Zhang Z., Xu J., Yu Z. (2018). Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. *Mycology*, (44), 63.
155. Reghmit A., Benzina-Tihar F., López Escudero F. J., Halouane-Sahir F., Oukali Z., Bensmail S., Ghazali N. (2021). *Trichoderma* spp. isolates from the rhizosphere of healthy olive trees in northern Algeria and their biocontrol potentials against the olive wilt pathogen, *Verticillium dahliae*. *Organic Agriculture*, 11, 639-657.
156. Rifai M. A., Webster J. (1966). Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*: II. *H. Aureo-viridis* and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. *Transactions of the British Mycological Society*, 49(2), 289-IN11.
157. Rifai M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Paper*, 116:1–56.
158. Roe A. D., Rice A. V., Bromilow S. E., Cooke J. E., Sperling F. A. (2010). Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle. *Molecular Ecology Resources*, 10(6):946–959.
159. Ru Z., Di W. (2012). *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *African Journal of Biotechnology*, 11(18), 4180-4186.
160. Sadfi-Zouaoui N., Hannachi I., Rouaissi M., Hajlaoui M. R., Rubio M. Á., Monte E., Boudabous A., Hermosa M. R. (2009). Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Canadian journal of microbiology*, 55(2), 154-162.
161. Samuels G. J., Petrini O., Manguin S. (1994). Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86(3), 421-435.
162. Samuels G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100: 923–935.

163. Samuels G. J., Lodge D. J. (1996). Three species of *Hypocrea* with stipitate stromata and *Trichoderma anamorphs*. *Mycologia*, 88(2), 302-315.
164. Samuels G. J., Dodd S. L., Gams W., Castlebury L. A., Petrini O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94(1), 146-170.
165. Samuels G. J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. The Nature and Application of Biocontrol Microbes II: *Trichoderma* spp., 96(2):1-12
166. Samuels G. J., Suarez C., Solis K., Holmes K. A., Thomas S. E., Ismaiel A., Evans H. C. (2006). *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. *Mycological research*, 110(4), 381-392.
167. Samuels G. J., Ismaiel A., Bon M. C., De Respinis S., Petrini O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944-966.
168. Samuels G. J., Hebbar P. K. (2015). *Trichoderma*: Identification and Agricultural Applications. 1st ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 196 pp.
169. Sanogo S., Pomella A., Hebbar P. K., Bailey B., Costa J. C. B., Samuels G. J., Lumsden R. D. (2002). Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. *Phytopathology*, 92(10), 1032-1037.
170. Santillan Salas C. F., Joshi A. Y., Dhiman N., Banerjee R., Huskins W. C., Wengenack N. L., Henry N. K. (2011). Fatal post-operative *Trichoderma longibrachiatum* mediastinitis and peritonitis in a paediatric patient with complex congenital cardiac disease on peritoneal dialysis. *Journal of medical microbiology*, 60(12), 1869-1871.
171. Santra H. K., Banerjee D. (2023). Antifungal activity of volatile and non-volatile metabolites of endophytes of *Chloranthus elatior* Sw. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1156323.
172. Saravanakumar K., Yu C., Dou K., Wang M., Li Y., Chen J. (2016). Biodiversity of *Trichoderma* community in the tidal flats and wetland of southeastern China. *PLoS One*, 11(12), e0168020.
173. Sautour M., Chrétien M. L., Valot S., Lafon I., Basmaciyan L., Legouge C., Verrier T., Gonsaud B., Abou-Hanna H., Dalle F., Caillot D. (2018). First case of proven invasive pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* in a neutropenic patient with acute leukemia. *Journal de mycologie medicale*, 28(4), 659-662.
174. Schuster A., Schmoll M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 787-799.



175. Seaby D. A. (1996). Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant pathology*, 45(5), 905-912.
176. Seifert K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular ecology resources*, 9, 83-89.
177. Shah M. M., Afiya H. (2019). Introductory chapter: identification and isolation of *Trichoderma* spp.-Their significance in agriculture, human health, industrial and environmental application. In *Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide*. IntechOpen. 3-14.
178. Sharma P. (2011). Complexity of '*Trichoderma-fusarium*' interaction and manifestation of biological control. *Australian Journal of Crop Science*, 5(8), 1027-1038.
179. Sharma P., Sharma M., Raja M., Shanmugam V. (2014). Status of *Trichoderma* research in India: A review. *Indian Phytopathology*, 67:1-119.
180. Sharon E., Chet I., Spiegel Y. (2011). *Trichoderma* as a biological control agent. *Biological control of plant-parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms*, 183-201.
181. Shores M., Harman G. E., Mastouri F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 21–43.
182. Shoukouhi P., Hicks C., Menzies J. G., Popovic Z., Chen W., Seifert K. A., Assabgui R., Liu M. (2019). Phylogeny of Canadian ergot fungi and a detection assay by real-time polymerase chain reaction. *Mycologia*, 111(3), 493-505.
183. Siddiquee S. (2017). *Practical handbook of the biology and molecular diversity of Trichoderma species from tropical regions (Vol. 431)*. Cham: Springer International Publishing.
184. Soesanto L., Sri-Utami D., Rahayuniati R. F. (2011). Morphological characteristics of four *Trichoderma* isolates and two endophytic *Fusarium* isolates. *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research*, 2(8): 294-306.
185. Sood M., Kapoor D., Kumar V., Sheteiwy M. S., Ramakrishnan M., Landi M., Araniti F., Sharma A. (2020). *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, 9: 1-25.
186. Stajich J. E., Berbee M. L., Blackwell M., Hibbett D. S., James T. Y., Spatafora J. W., Taylor J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*, 19: R840– R845.
187. Stewart A., Hill R. (2014). Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Elsevier: New Zealand. pp. 415-428.

188. Sudantha I. M., Suwardji S. (2021). *Trichoderma* biofungicides formulations on shallot growth, yield and fusarium wilt disease resistance. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 824, No. 1, p. 012032. IOP Publishing.
189. Sun R. Y., Liu Z. C., Fu K., Fan L., Chen J. (2012). *Trichoderma* biodiversity in China. Journal of applied genetics, 53, 343-354.
190. Suryani Y., Andayaningsih P., Hernaman I., Muharromi U. F. (2012). Effort of Increasing Production of Livestock Feed out of Cassava Waste by Identifying the more Suitable Cellulotic Degrading Fungi. Asian Journal of Agriculture and Rural Development, 2(3), 329-336.
191. Tang P., Mohan S., Sigler L., Witterick I., Summerbell R., Campbell I., Mazzulli T. (2003). Allergic fungal sinusitis associated with *Trichoderma longibrachiatum*. Journal of clinical microbiology, 41(11), 5333-5336.
192. Taylor J. W. (2011). One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. IMA fungus, 2(2), 113-120.
193. Tenkanen M., Puls J., Poutanen K. (1992). Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. Enzyme and microbial technology, 14(7), 566-574.
194. Topolovec-Pintarić S., Cvjetković B., Miličević T. (2004). Biofungicidi temeljeni na *Trichoderma* vrstama. Glasilo biljne zaštite. 4: 239-241.
195. Topolovec-Pintarić S., Sušinjak I. (2005). Prva iskustva primjene pripravka na osnovu *Trichoderma harzianum* proizvedenog na Zavodu za fitopatologiju. Glasilo biljne zaštite, 6: 368-370.
196. Topolovec-Pintarić S., Borovec M. (2008). Znamo li dovoljno o biofungicidima?, Gospodarski list 23/24, str. 58.
197. Topolovec-Pintarić S., Jakšić I., Đermić E., Garašić I. (2008). Biofungicidi su korisne gljive i bakterije. Zemlja i znanje. 4:14-16.
198. Topolovec-Pintarić S. (2010). Influence of *Trichoderma harzianum* Rifai on the fiber flax germination and growth. Növénytermelés, 59 (Supplement), 421-424.
199. Topolovec-Pintarić S., Žutić I., Lončarić I. (2011). Enhancing plant growth with *Trichoderma viride* based pellets. Növénytermelés, 60 (Supplement), 177-180.
200. Topolovec-Pintarić S., Žutić I., Đermić E. (2013). Enhanced growth of cabbage and red beet by *Trichoderma viride*. Pospesena rast zelja in rdece pese z dodatkom glive *Trichoderma viride*. Acta Agriculturae Slovenica, 101(1), 87.

201. Topolovec-Pintarić S., Vinceković M., Jalšenjak N., Martinko K., Žutić I., Đermić E. (2017). Prototip biognojiva: mikrokapsule na osnovu *Trichoderma viride* i kalcija. 52. hrvatski i 12. međunarodni simpozij agronoma. Dubrovnik, 100-104.
202. Topolovec-Pintarić S. (2019). *Trichoderma*: invisible partner for visible impact on agriculture. *Trichoderma-the most widely used fungicide*, str. 15.
203. Tripathi P., Singh P. C., Mishra A., Chauhan P. S., Dwivedi S., Bais R. T., Tripathi R. D. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15, 541-550.
204. Tunlid A., Rosén S., Ek B. O., Rask L. (1994). Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology*, 140(7), 1687-1695.
205. Větrovský T., Kolařík M., Žifčáková L., Zelenka T., Baldrian P. (2016). The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16(2):388-401.
206. Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
207. Waghunde R. R., Shelake R. M., Sabalpara A. N. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African journal of agricultural research*, 11(22), 1952-1965.
208. Waksman S. A. (1922). A method for counting the number of fungi in the soil. *Journal of Bacteriology*, 7: 339–341.
209. Webster J. (1964). Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* I. Comparison of perfect and imperfect states of *H. gelatinosa*, *H. rufa* and *Hypocrea* sp. 1. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(1), 75-IN3.
210. Weindling R. (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lingorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi, *Phytopathology*, 24: 1153.
211. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White [eds.], *PCR protocols and applications—A laboratory manual*, 315– 322. Academic Press, New York, New York, USA.

212. Wilsey B. J., Chalcraft D. R., Bowles C. M., Willig M. R. (2005). Relationships among indices suggest that richness is an incomplete surrogate for grassland biodiversity. *Ecology*, 86, 1178–1184.
213. Woo S. L., Ruocco M., Vinale F., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Lanzuise S., Manganiello G., Lorito M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8:71-126.
214. Zhu Z. X., Zhuang W. Y. (2015 a). Three new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from China. *Mycologia*, 107(2), 328-345.
215. Zhu Z. X., Zhuang W. Y. (2015 b) *Trichoderma* (*Hypocrea*) species with green ascospores from China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 113-129.
216. Zhu H., Ma Y., Guo Q., Xu B. (2020). Biological weed control using *Trichoderma polysporum* strain HZ-31. *Crop protection*, 134, 105161.

## Životopis

**Martina Stvorić** rođena je 15. siječnja 1994. u Zagrebu. Nakon završene Ženske opće gimnazije Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti u Zagrebu i završenog informatičkog ECDL tečaja upisuje Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet 2018. godine, prijediplomski studij Zaštita bilja. Godine 2021. nastavlja diplomski studij Fitomedicina, gdje trenutno studira. Tijekom studija razvija znanstvene interese u području zaštite bilja koje njeguje kroz nekoliko izvannastavnih grupa: Art u fitomikologiji, Entomološka grupa i Čudesni svijet korova. Aktivna je u sustavu tutorstva kolegama brucosiima, piše članke za Gospodarski list, sudjeluje u promotivnim danima Fakulteta (Dan očaranosti biljkama, Smotra Sveučilišta, (Tje)dan brucosa, Dani karijera), surađuje s Agronomskom školom u Zagrebu (izlaganje nastave, promocija Fakulteta).

Koautorica je dva znanstvena rada u obliku postera iz područja fitopatologije:

- Topolovec-Pintarić S., Stvorić M., Kovaček A-M., Grubišić B., Pošta A., Pole L., Mešić A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma atroviride* in lettuce, izložen na konferenciji *7th International Scientific Meeting: „Mycology, Mycotoxicology and Mycoses“*. (2.-4.6.2022. Matica Srpska, Novi Sad, Serbia)
- Topolovec-Pintarić S., Pošta A., Kušan I., Matočec N., Pole L., Stvorić M., Mešić A. Biodiversity of the genus *Trichoderma* (Ascomycota, Fungi) in the Mediterranean region of Croatia, izložen na konferenciji *International Conference on DNA Barcoding and Biodiversity*. (25.-27.5.2022. Sofia, Bulgaria)

Dobitnica je Rektorove nagrade 2023.g. za timski znanstveni rad iz područja herbologije, čiji je glavni autor:

- Stvorić M., Šušnjar L. S., Bulić T., Kovač M., Pišonić M., Tot K., Keran L., Oreški A., Bubalo E., Martinčić S., Pavić L., Višić D., Petriško I. Alelopatski utjecaj invazivnih drvenastih vrsta *Reynoutria japonica* Houtt. i *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle na klijanje i početni rast korovnih vrsta *Ambrosia artemisiifolia* L. i *Echinochloa crus-galli* L. (P. Beauv.) (pod mentorstvom dr. sc. Valentine Šoštarčić).

Članica je Hrvatskog društva biljne zaštite (HBDZ) i udruge Penkala (znanstvena spajalica). Slobodno vrijeme posvećuje životinjama, čita knjige te volontira u radionicama za nadarenu djecu putem udruge Bioteka. Sudjeluje u utrci *Wings for Life World Run*.