

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Igor D. Vukelić

**Molekularno - fiziološki mehanizmi interakcije
paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) i
odabranih izolata gljiva roda *Trichoderma***

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Igor D. Vukelić

**Molecular and physiological mechanisms of
interaction between tomato (*Solanum
lycopersicum* L.) and selected isolates of the
genus *Trichoderma***

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

MENTORI:

dr Dejana Panković, redovni profesor,

Univerzitet Educons - Fakultet ekološke poljoprivrede

dr Svetlana Radović, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Jelena Lozo, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Ljiljana Prokić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu - Institut za multidisciplinarna istraživanja

DATUM ODBRANE: _____

Koristim ovu priliku da se zahvalim svima koji su dali doprinos u izradi ove doktorske disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Dejana Panković. Zahvaljujem joj se na nesebično prenetom znanju, posvećenosti i na pregršt smernica tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije kao i na nekoliko puta pregledanom rukopisu koji je svaki put oplemenila korisnim savetima i sugestijama.

Mentoru prof. dr Svetlani Radović se posebno zahvaljujem što je omogućila da se ova disertacija realizuje na studijskom programu Molekularna biologija Univerziteta u Beogradu kao i na pokazanom interesovanju tokom mojih doktorskih studija i na velikoj pomoći prilikom uobličavanja konačnog izgleda rada.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Ljiljani Prokić na svesrdnoj pomoći vezanoj za fiziološka istraživanja koja su sprovedena tokom izrade ove disertacije kao i na zapažanjima i zalaganju koja su doprinela kvalitetu ove disertacije.

Najlepše se zahvaljujem prof. dr Kseniji Radotić na velikoj i stručnoj pomoći oko obrade podataka FTIR spektara i sugestijama koje su pomogle u izradi ove doktorske disertacije.

Veliko hvala prof. dr Jeleni Lozo na profesionalnosti, brzini i pristupačnosti prilikom rešavanja svih pitanja vezanih za izradu doktorske disertacije kao i na stručnim i tehničkim savetima prilikom pisanja disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Marianu Brestiču i njegovom timu sa Slovačkog poljoprivrednog Univerziteta u Nitri što su mi omogućili da istraživanja sprovedem na platformi za fenotipizaciju biljaka.

Prof. dr Ljubinku Jovanoviću hvala na rečima podrške i ohrabrenja koje su bila vetar u leđa tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliko hvala dragim kolegama, prijateljima dr Gordani Racić, dr Danki Radić i dr Mirjani Bojović na pomoći i podršci u eksperimentalnom radu. Takođe se zahvaljujem i ostalim kolegama sa Educons Univerziteta i AbioTech laboratorije na iskrenoj podršci i pozitivnoj energiji.

Svojim roditeljima i supruzi sam zahvalan na iskazanom strpljenju, razumevanju, motivaciji i bezrezervnoj podršci tokom svih ovih godina.

Svojoj Miji.

Molekularno - fiziološki mehanizmi interakcije paradajza (*Solanum lycopersicum* L.) i odabranih izolata gljiva roda *Trichoderma*

SAŽETAK

Poznato je da efekti interakcije biljka - *Trichoderma* zavise od genotipa biljke i soja *Trichoderma*, međutim molekularni mehanizmi ovog fenomena jos uvek nisu razjašnjeni. Glavni cilj ove doktorske disertacije je definisanje molekularno-fizioloških pokazatelja pozitivnog odgovora biljaka na primenu gljiva roda *Trichoderma*. U cilju pronalaženja ovih odgovora vršene su analize ekspresije gena, biohemijske i morfo-fiziološke analize.

Gljive roda *Trichoderma* stimulišu klijanje semena paradajza, pri čemu značajno utiču na promene koje se odigravaju na nivou proteina kao i pektina i/ili ksiloglukana u radikulama semena. U okviru brzih reakcija biljaka na prisustvo *T. brevicompactum* najznačajnije su bolje adaptivne osobine na prestanak zalivanja, odnosno veća provodljivost stoma i manji porast ABA, što pozitivno utiče na brzinu fotosinteze, a samim tim i na rast biljaka.

Dugoročni efekti primene *T. harzianum* i *T. brevicompactum* su različiti kod ispitivanih sorti paradajza. *T. harzianum* stimuliše provodljivost stoma i intracelularnu koncentraciju CO₂ optimalno zalivanih biljaka paradajza, dok *T. brevicompactum* stimuliše nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila i trenutnu efikasnost korišćenja vode. *T. harzianum* kod biljaka ublažava efekte suše smanjenjem temperature lista i inhibicije fotosinteze. Utvrđeno je da *T. harzianum* značajno ubrzava formiranje plodova, dok ujedno povećava sadržaj flavonoida u plodu čime doprinosi njegovom kvalitetu. Analize ekspresije gena (*TPX1*, *PINII*, *PR1b1*, *SIJAF13*, *FLS*, *NCED1* i *C3H*) i kvalitativne analize fenolnih jedinjenja ukazuju na međuzavisnost i kompleksnost signalnih puteva i sekundarnih metabolita. Utvrđeno je da je povišena ekspresija svolenina povezana sa uspešnijom kolonizacijom korena paradajza od strane gljiva roda *Trichoderma*.

Ključne reči: ekspresija gena; biohemijski parametri; morfo-fiziološki parametri; mehanizmi signalizacije, fenotipizacija, signalni molekuli, suša.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biotehnologija

UDK broj:

Molecular and physiological mechanisms of interaction between tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and selected isolates of the genus *Trichoderma*

ABSTRACT

The effects of plant - *Trichoderma* interactions are depended on the plant genotype and the *Trichoderma* strain. However, the molecular mechanisms of this phenomenon have not yet been elucidated. The main aim of this PhD dissertation is to define molecular-physiological indicators of the plants positive response to the application of fungi of the genus *Trichoderma*. In order to find these answers, gene expression analyses, biochemical and morpho-physiological analyses were performed.

The fungi of the genus *Trichoderma* stimulate the germination of tomato seeds, significantly influencing the changes that take place at the level of proteins as well as pectin and/or xyloglucan in the seed radicals. Within the fast responses of plants to the application of *T. brevicompactum*, the most important effects were better adaptive characteristics to the cessation of watering, i.e., higher stomatal conductance and a lower level of ABA, which positively affect the rate of photosynthesis as well as plant growth.

The long-term effects of *T. harzianum* and *T. brevicompactum* showed different plant answers for the examined tomato varieties. *T. harzianum* stimulates stomatal conductance and intracellular CO₂ concentration of optimally watered tomato plants, while *T. brevicompactum* stimulates nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching and water use efficiency. *T. harzianum* in plants mitigates the impacts of drought by reducing leaf temperature and inhibiting photosynthesis. The results showed that *T. harzianum* significantly stimulates fruit formation, while also increasing the content of flavonoids in the fruit, which contributes to its quality. Gene expression analyses (*TPX1*, *PINII*, *PR1b1*, *SIJAF13*, *FLS*, *NCED1* and *C3H*) and qualitative analyses of phenolic compounds indicate the interdependence and complexity of signaling pathways and secondary metabolites. Better colonization of plant roots by *Trichoderma* is determined by higher expression of the swollenin gene in tomato roots.

Key words: gene expression; biochemical parameters; morpho-physiological parameters; signaling mechanisms, phenotyping, signaling molecules, drought.

Scientific field: Biology

Scientific discipline: Biotechnology

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Klasifikacija i biologija gljive roda <i>Trichoderma</i>	1
1.2. Primena gljiva roda <i>Trichoderma</i>	2
1.3. Mehanizmi promocije biljnog rasta.....	3
1.3.1. Kolonizacija i molekularni mehanizmi uspostavljanja interakcije <i>Trichoderma</i> – biljka..	3
1.3.2. Stimulacija biljnog rasta fitohormonima	5
1.3.2.1. Auksini	6
1.3.2.2. Etilen	7
1.3.2.3. Citokinini	7
1.3.2.4. Giberelini	7
1.3.2.5. Apscisinska kiselina.....	7
1.3.3. Uticaj na dostupnost i usvajanja nutrijenata	9
1.3.4. Stimulacija biljnog rasta sekundarnim metabolitima gljiva roda <i>Trichoderma</i>	10
1.3.5. Stimulacija otpornosti biljaka na abiotički i biotički stres	11
1.3.5.1. Stimulacija otpornosti na abiotički stres	11
1.3.5.2. Stimulacija otpornosti na biotički stres - <i>Trichoderma</i> kao biopesticid u biokontroli biljnih bolesti.....	12
1.4. Paradajz (<i>Solanum lycopersicum L.</i>) kao model organizam - opšte karakteristike.....	13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJAL I METODE.....	19
3.1. Biljni materijal.....	19
3.2. Metode primenjene u ispitivanje uticaja gljiva iz roda <i>Trichoderma</i> na klijanje semena paradajza.....	19
3.2.1. Uslovi gajenja	19
3.2.2. FTIR spektroskopija za određivanje biohemijskih promena i promena funkcionalnih grupa jedinjenja u ćelijskom zidu	20
3.2.3. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) za mikroanalizu poprečnog preseku radikula semena paradajza	22
3.2.4. Statistička obrada podataka	23
3.3. Metode primenjene u ispitivanju ranih reakcija biljaka na interakciju sa gljivama roda <i>Trichoderma</i> u uslovima smanjene snabdevenosti vodom.....	23
3.3.1. Uslovi gajenja	23
3.3.2. Priprema suspenzije gljiva.....	23
3.3.3. Određivanje sadržaja vode u zemljištu	24

3.3.4. <i>In vivo</i> merenje sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeksa balansa azota.....	24
3.3.5. Merenje provodljivosti stoma (Gs).....	25
3.3.6. Merenje vodnog potencijal listova (ψ_{H_2O}).....	26
3.3.7. Određivanje koncentracije abscisinske kiseline (ABA) u listu i korenu.....	26
3.3.8. Statistička obrada rezultata.....	26
3.4. Ispitivanje uticaja gljiva roda <i>Trichoderma</i> na biohemijske i morfo-fiziološke parametre paradajza u uslovima smanjene snabdevenosti vodom primenom platforme za fenotipizaciju.....	27
3.4.1. Uslovi gajenja.....	27
3.4.2. Priprema suspenzije gljiva.....	29
3.4.3. Mikrobiološka analiza zemljišta.....	30
3.4.4. Merenje fotosintetičke razmene gasova i fluorescencije hlorofila pomoću Li-6400XT ..	30
3.4.5. Merenje fotosintetičkih parametara primenom MultispeQ V2.0.....	32
3.4.6. Merenje sadržaja hlorofila u listu i polifenola u epidermisu lista	33
3.4.7. Ekstrakcija i određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenta	33
3.4.8. Parametri koji su dobijeni na platformi za fenotipizaciju biljaka.....	34
3.4.8.1. Snimanja RGB kamerom	36
3.4.8.2. Snimanje kamerom za detekciju signala fluorescencije hlorofila.....	36
3.4.8.3. Hiperspektralne analize.....	36
3.4.9. Snimanje termalnom kamerom.....	38
3.4.10. Sveža i suva masa listova, stabla i korena	39
3.4.11. Statistička obrada rezultata	40
3.5. Metode za ispitivanje molekularnih mehanizama odgovora paradajza na sušu i dodatak suspenzije gljiva roda <i>Trichoderma</i>	40
3.5.1. Uslovi gajenja	40
3.5.2. Određivanje ekspresije gena paradajza kao odgovor na sušu i dodatak suspenzije gljiva <i>T. harzianum</i> i <i>T. brevicompactum</i>	40
3.5.3. Kvantitativno određivanje sadržaja ABA i fenolnih jedinjenja primenom LC-MS-MS tehnike	44
3.5.4. Statistička obrada rezultata	46
3.6. Metode za ispitivanje uticaja gljiva roda <i>Trichoderma</i> na biohemijske, morfo-fiziološke i agronomске parametre paradajza gajenog u plasteniku	47
3.6.1. Uslovi gajenja	47
3.6.2. Priprema suspenzije gljiva.....	47
3.6.3. Enzimska karakterizacija izolata	48
3.6.4. Ekstrakcija RNK i analiza ekspresije svolenin gena primenom qRT-PCR.....	48
3.6.5. Hemijske analiza zemljišta	50
3.6.6. Parametri rasta i razvića biljaka.....	50

3.6.7. Merenje sadržaja vode u zemljištu i relativnog sadržaja vode u listovima paradajza	50
3.6.8. Merenje sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeksa balansa azota u listovima paradajza	51
3.6.9. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola, rastvorljivih šećera i ukupnih flavonoida u plodovima paradajza	51
3.6.10. Određivanje sadržaja skroba u plodovima paradajza	52
3.6.11. Određivanje sadržaja makroelemenata u plodovima paradajza	52
3.6.12. Određivanje sadržaja mikroelemenata i teških metala u plodovima paradajza i zemljištu	53
3.6.13. Određivanje indeksa bioakumulacije	53
3.6.14. Statistička obrada podataka	54
4. REZULTATI	56
4.1. Ispitivanje uticaja gljiva roda <i>Trichoderma</i> na klijanje semena paradajza	56
4.1.1. <i>In vitro</i> stimulacija klijavosti semena u pristustvu gljiva iz roda <i>Trichoderma</i>	56
4.1.2. Određivanje biohemijskih promena i promena funkcionalnih grupa u ćelijskom zidu radikula semena paradajza primenom FTIR spektroskopije	57
4.2. Rane reakcije biljaka na interakciju sa gljivama roda <i>Trichoderma</i> u uslovima smanjene snabdevenosti vodom	62
4.3. Uticaj gljiva roda <i>Trichoderma</i> na biohemijske i morfo-fiziološke parametre paradajza u uslovima suše	68
4.3.1. Merenje sadržaja hlorofila u listu i polifenola u epidermisu lista	68
4.3.2. Parametri razmene gasova i fluorescencije hlorofila	69
4.3.3. Fotosintetički parametri	73
4.3.4. Određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata	75
4.3.5. Snimanje morfometrijskih parametara RBG kamerom	75
4.3.6. Automatska detekcija fluorescencija hlorofila na platformi za fenotipizaciju	76
4.3.7. Hiperspektralne analize	79
4.3.8. Snimanje termalnom kamerom	83
4.3.9. Sveža i suva masa listova, stabla i korena	85
4.3.10. Brzina formiranja plodova	87
4.3.11. Mikrobiološka analiza zemljišta	88
4.4. Molekularni mehanizmi odgovora biljke na sušu i dodatak suspenzije gljiva roda <i>Trichoderma</i>	89
4.4.1. Promene ekspresije gena paradajza u uslovima suše i interakciji sa <i>T. harzianum</i> i <i>T. brevicompactum</i>	89
4.4.2. Promene sadržaja ABA i fenolnih jedinjenja pod uticajem suše i interakcije sa <i>T. harzianum</i> i <i>T. brevicompactum</i>	96
4.5. Uticaj odabranog izolata <i>Trichoderma</i> na biohemijske, morfo-fiziološke i agronomske parametre paradajza gajenog u plasteniku	99

4.5.1. Enzimaska karakterizacija izolata	99
4.5.2. Analiza ekspresije svolenin gena.....	99
4.5.3. Hemijske analiza zemljišta	100
4.5.4. Rastenje i razviće biljaka	100
4.5.5. Sadržaj vode u zemljištu i relativni sadržaj vode u listovima paradajza	101
4.5.6. Sadržaj hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeks balansa azota.....	101
4.5.7. Sadržaj ukupnih polifenola, rastvorljivih šećera , ukupnih flavonoida i skroba u plodovima paradajza.....	102
4.5.8. Sadržaj makroelemenata u plodu paradajza	102
4.5.9. Sadržaj mikronutrijenata i teških metala u plodovima paradajza, zemljištu i indeks bioakumulacije.....	103
4.5.10. Usporedna analiza morfološko-hemijskih parametara.....	104
5. DISKUSIJA.....	108
5.1. Brzi odgovori.....	108
5.1.1. <i>Trichoderma</i> kao stimulatori klijanja	108
5.1.2. Vodni deficit i <i>Trichoderma</i>	110
5.2. Dugoročni efekti.....	113
5.2.1. Suša i <i>Trihoderma</i>	113
5.2.1.1. Fotosintetski parametri i parametri rasta.....	113
5.2.1.2. Signalizacija, genska aktivnost i sekundarni metabolizam.....	119
5.2.1.3. Zemljište.....	123
5.2.2. Kvalitet plodova	124
6. ZAKLJUČCI.....	129
7. LITERATURA.....	132
8. PRILOG	151
Prilog 1	151
Prilog 2	155

Lista skraćenica

A - intenzitet fotosinteze

ABA - abscisinska kiselina

ACC - 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina

ACC - 1-amino-ciklopropan-1-karboksilnu kiselinu

ACCD - 1-amino-ciklopropan-1-karboksilat deaminaze

ANOVA - analiza varijanse

Anth i Anth_RG - indeks antocijanina

APX - askorbat peroksidaze

Bi - indeks bioakumulacije

Ca i Chl a - koncentracija hlorofila a

Ca+b - koncentracija hlorofila a + b

CAT - katalaza

Cb - koncentracija hlorofila b

CFU - broj kolonija formiranih po mL ili g uzorka

Chl i SFR_G - sadržaj hlorofila

Ci - intracelularna koncentracija CO₂

CK - citokinini

CRI-1 - indeks refleksije karotenoida I

CRI-2 – indeks refleksije karotenoida II

Ct - ciklus u kome je fluorescentni signal iznad granične vrednosti (*engl.* Threshold cycle)

Cx+c - sadržaj ukupnih karotenoida

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

E - intenzitet transpiracije

ECSt - elektrochromni pomeraj

ELISA - enzimski imunoadsorpcioni test

ET – etilena

ETR - brzina linearnog elektronskog transporta kroz PS II

F₀ - minimalna fluorescencija hlorofila

Flav - indeks epidermalnih flavonola

Fm' - maksimalna fluorescencija hlorofila

FTIR - infracrvena spektrometrija sa Furijevom transformacijom

Fv/Fm - maksimalan kvantni prinos efikasnosti fotosistema II

GA - giberelini

gH^+ - provodljivost protona

gs – provodljivost stoma

GZ - Gružanski zlatni

HMI - ljudsko masinski interfejs (*engl.* Human Machine Interface)

IAA – indol sirćetna kiselina

IAA - indol-3-sirćetna kiselina

JA - jasmonske kiseline

LED - svetleća dioda (*engl.* Light Emitting Diode)

LEF - linearni elektronski transport

MAPK - mitogenom aktivirana prtein-kinaze

MCARI1 – modifikovani indeks odnosa apsorpcije hlorofila I

MS - Murashige & Skoog hranljiva podloga

N - narvik

NBI - indeks balansa azota (*engl.* Nitrogen Balance Index)

NDVI - vegetacijski indeks normalizovanih razlika

NIR - blisko infracrveno zračenje

NPQ - nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila

NPQ - nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila

PCA - analiza glavnih komponenti

PCR - lančana reakcija polimerazom (*engl.* Polymerase Chain Reaction)

PDA - krompir dekstrozni agar (*engl.* Potato Dextose Agar)

PDB - krompir dekstrozni bujon

PLC - programabilni logički kontroler (*engl.* Programmable Logic Controller)

PMF - protonska motorna sila

POD - peroksidaza

PS1 - reakcioni centra fotosistema I

qP_{lss} - koeficijent fotohemijskog gašenja fluorescencije hlorofila

QR - brzi odgovor (*engl.* Quick Response)

qRT-PCR - kvantitativni real-time PCR

Qy_{lss} - stvarna fotohemijska efikasnost

QY_{max} - maksimalan kvantni prinos fotohemije PS II u mraku

RC – relativni sadržaj hlorofila
Rfd_iss - fluorescencije hlorofila u ravnotežnom stanju
RGB - crvena, zelena, plava (*engl.* Red, Green, Blue)
RNK - ribonukleinska kiselina
ROS - reaktivna jedinjenja kiseonika
ROS - reaktivna jedinjenja kiseonika
rpm - obrtaja po minuti
SA - salicilne kiseline
SEM - skenirajući elektronski mikroskop
SOD - superoksid-dizmutaza
SR4 - jednostavni indeks odnosa vode
SWC - sadržaj vode u zemljištu
SWIR - kratko talasni bliski infracrveni region
VIS - vidljivo zračenja
VNIR - vidljivi i bliski infracrveni region elektromagnetnog spektra
VOC - lako isparljiva organska jedinjenja
Water-1 - indeks refleksije čiste vode
WI – indeks refleksije vode u zavisnosti od sadržaja vode u biljkama
WUE - trenutna efikasnost korišćenja vode
WUEi - unutrašnja efikasnost korišćenja vode
 ψ_{H_2O} - vodni potencijal lista
 ψ_S - osmotski potencijal

UVOD

1. UVOD

1.1. Klasifikacija i biologija gljive roda *Trichoderma*

Naziv *Trichoderma* potiče od grčkih reči: *thrix* (kosa) i *derma* (koža).

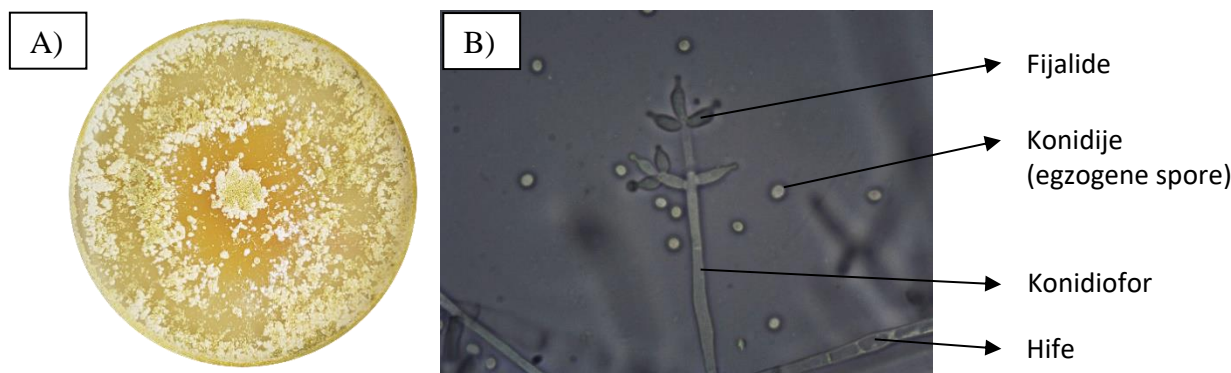
Gljive roda *Trichoderma* su kosmopolitske filamentozne gljive, koje su prilagođene za život u različitim ekosistemima i klimatskim zonama (Kubicek i sar., 2008). Pretežno nastanjuju zemljište i rizosferu ali su i stanovnici nadzemnih delova biljaka, trulih stabala, sedimenata, drugih gljiva i podloga (Ma i sar., 2020). Većina ovih gljiva su oportunistički, avirulentni biljni simbionti koje odlikuje sposobnost brzog razmnožavanja i efikasna kolonizacija supstrata (Sood 2020).

Rod *Trichoderma* prvi je opisao nemački naučnik Persoon 1794. godine. Dalja istraživanja pripisuju se francuskim naučnicima, braći Tulasne koji su 1865. godine otkrili da je *T. viride* bespolni stadijum (anamorf) *Hypocrea rufa* (Samuels 2006). Usled nemogućnosti razlikovanja vrsta na morfološkom nivou Bisbi ih 1939. godine definiše kao „koncept jedne vrste”. Monofiletski rod je bio aktuelan sve dok Rifai 1969. godine nije klasifikovao devet vrsta *Trichoderma*. Novu klasifikaciju je predložio Bissett 1984. godine grupisavši devet Rifai-jevih vrsta u četiri sekcije: *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* i *Hypocreanum* (Samuels 2006). Krajem 90²-ih godina razvojem molekularnih metoda, molekularna sistematika postaje standard u taksonomiji. Zahvaljući novim tehnikama identifikacija vrsta je pojednostavljena i do sada je identifikovano više od 260 filogenetskih vrsta *Trichoderma* (María del Carmen i sar., 2021; Sharma i sar., 2019). Danas, u eri molekularne biologije, identifikacija vrsta je dodatno olakšana, jer su formirane informatičke baze podataka u koje se deponuju genske sekvence. Po trenutnoj taksonomiji *Trichoderma* kao stariji naziv ima prednost nad nazivom *Hypocrea*, iako se u literaturi često mogu pronaći oba naziva.

Današnja klasifikacija gljiva roda *Trichoderma*:

Carstvo:	Fungi
Razdeo:	Ascomycota
Podrazdeo:	Pezizomycotina
Klasa:	Sordariomycetes
Red:	Hypocreales
Familija:	<i>Hypocreaceae</i>
Rod:	<i>Trichoderma</i>

Talus (micelija) gljiva roda *Trichoderma* izgrađena je od končastih razgranatih septiranih hifa. Posebni ogranci hifa (konidiofori) se granaju i nose specijalizovane fialide iz kojih se razvijaju bespolne egzogene konidije - spore (Slika 1). Spore su uglavnom okruglog ili elipsoidnog oblika sa prečnikom veličine 3 - 5 μm (Yang i Heinsohn 2007). Intenzivno formiranje spora se odvija u uslovima koji su nepovoljni za rast gljiva. Kada se spore ponovo nađu u uslovima koji su pogodni za rast i razvoj gljiva, dolazi do njihove germinacije iz koje nastaju svi ostali stadijumi morofgeneze. Neke vrste *Trichoderma* mogu da formiraju hlamidospore i askospore. Iako su hlamidospore gljiva roda *Trichoderma* davno otkrivene i dalje se ne zna mnogo o tome kako one nastaju (Sekhar i sar., 2017; Böttcher i sar., 2016). To su spore u mirovanju sa otpornom strukturom na nepovoljne uslove, koje se formiraju u kratkom vremenskom periodu (Li i sar., 2016). Imaju zadebljali ćelijski zid i nisu odvojene od hifa. Askospore su dvoćelijske strukture, slabije su zastupljene kod roda *Trichoderma* i locirane su u stromi (Zhu i sar., 2015). Javljaju se samo kod gljiva koje imaju telomorfni oblik (polni stadijum).



Slika 1. Morfologija *T. harzianum* SZMC 20660.

a) Izgled kolonije na PDA podlozi; b) Mikroskopski preparat micelija gljiva.

Gljiva roda *Trichoderma* proizvode raznovrsne pigmente, usled čega formiraju kolonije različitih nijansi zelene, žute i bele boje, a takođe, mogu da budu i bezbojne. Spore su najčešće zelene ili bezbojne, mada se kod nekih vrsta javljaju u različitim nijansama braon i sive boje. Odlikuje ih brza i efikasna produkcija kolonija, preživljavanje u nepovoljnim uslovima, ekonomično korišćenje nutrijenata i jako antagonističko dejstvo prema fitopatogenim gljivama. Zahvaljujući ovim osobinama mogu da nasele raznovrsne ekološke niše. Najznačajniji faktori koji utiču na opstanak i rasprostranjenost ovih gljiva su: temperatura, pH, vegetacija, vodni potencijal, dostupnost organskih i hranljivih supstanci (Kredics i sar., 2003). Gljive, iz ovog roda, su sposobne da rastu u širokom opsegu pH vrednosti koji se kreće od 2 do 7 (Singh i sar., 2014). Mogu da prežive temperaturu od 0 °C do 40 °C (Daryaei i sar., 2016). Prema Singh i sar. (2014) optimalna pH vrednost za rast gljiva *Trichoderma* je od 5.5 do 7.5, a temperatura od 25 °C do 30 °C.

1.2. Primena gljiva roda *Trichoderma*

Gljive iz roda *Trichoderma* imaju niz pozitivnih uticaja na biljke koji se ispoljavaju u podsticanju biljnog rasta i tolerancije na abiotičke i biotičke činioce stresa (Alfiky i sar, 2021). Ova odlika karakteriše samo odabrane sojeve i ne može se primeniti za celu vrstu. Utvrđeno je oko 35 vrsta gljiva *Trichoderma*, koje su od ekonomskog značaja, zbog njihove sposobnosti da proizvode enzime, antibiotike ili zbog korišćenja kao biokontrolni agensi (Sharma i sar., 2019). Ove gljive su pronašle široku biotehnološku primenu, jer deluju kao biopesticidi za kontrolu biljnih bolesti i kao biofertilizatori za promociju biljnog rasta.

Gljive roda *Trichoderma* pronalaze sve veću primenu u bioremedijaciji zemljišta koja su kontaminirana teškim metalima i zagađujućim organskim supstancama. Huang i sar. (2018) su detektovali da nekoliko štetnih organskih zagađivača poput fenola, cijanida i nitrata često bivaju razgrađeni od strane *T. harzianum*. Neke vrste ovih gljiva imaju sposobnost da razgrađuju dihlordifenil-trihloretan (DDT) i pentahlorofenol (PCP), jedan od najzastupljenijih pesticida (Taha i sar., 2020; Lladó i sar., 2009). Postoje i istraživanja koja govore o biodegradaciji policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAH) od strane gljiva roda *Trichoderma*. Morales-Barrera i sar. (2008) su prikazali izvanrednu sposobnost *T. inhamatum* u procesu bioremedijacije voda kontaminiranih hromom. Sličnu sposobnost pokazala je i *T. harzianum* u detoksikaciji zemljišta zagađenog hromom (Faedda i sar., 2012). Treba dodati, da prisustvo ovih gljiva u rizosferi može dodatno da pospeši i procese fitoremedijacije. Interakcije između biljaka i ovih gljiva treba sagledati i iz ugla klimatskih promena, nastalih posledicom globalnog zagrevanja, koje je između ostalog, praćeno i sušom. Gljive roda *Trichoderma* sve češće se koriste i u industrijskoj proizvodnji enzima. Enzimi ovih gljiva primenjuju se u procesu proizvodnje sokova (celulaze, hemicelulaze, pektinaze), vina i piva (β -glukanaze) i

aditiva stočne hrane (ksilanaze) (Ram i sar., 2020). Celulaze i hemicelulaze, koje proizvodi *T. viride*, koriste se i u proizvodnji bioetanola - biogoriva (Iqtedar i sar., 2015). Gljive roda *Trichoderma* imaju sposobnost da sintetišu brojne toksine širokog delovanja, kako protiv prokariota, tako i protiv eukariota (Yadav i sar., 2018). Sintetišu jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću poput alkohola, aldehida, ketona, cijanovodonika, peptaibola, monoterpena, glikovirina i glitoksina. Sposobnost proizvodnje antibiotika od strane gljiva roda *Trichoderma* najviše zavisi od brojnosti i vrste mikroorganizma, vrsta podloge, temperature i pH vrednosti. Gljive ovog roda produkuju brojne metabolite, međutim, uloga mnogih od njih još uvek nije dovoljno ispitana.

Pored mnoštva korisnih i pozitivnih osobina, kod nekih gljiva roda *Trichoderma* utvrđeni su negativni efekti i na ljude i na životinje. *T. viride* sa udruženim dejstvom buđi i vlage u vazduhu, izaziva bolesti sluzokože i respiratornih organa, kada udisanjem, spore ovog patogena dospeju u pluća, gde stupaju u interakciju sa epitelom respiratornog trakta. Najčešći uzročnik koji izaziva oboljenja kod ljudi iz ovog roda gljiva je *T. longibrachiatum* (Sood i sar., 2020).

1.3. Mehanizmi promocije biljnog rasta

Gljive roda *Trichoderma* su najaplikativniji mikroorganizmi koji promovišu rast biljaka i povećavaju njihovu otpornost prema abiotičkom i biotičkom stresu (Khoshmanzar i sar., 2019). Pored sticanja otpornosti na abiotički stres i kontrole biljnih patogena, stimulacija biljnog rasta povezana je i sa različitim mehanizmima koji podrazumevaju povećano usvajanje nutrijenata, uticaj na metabolitičke procese, fotosintezu kao i na sintezu fitohormona. Promocija biljnog rasta može da se predstavi i kao rezultat direktnih i indirektnih mehanizama. Direktni mehanizmi podrazumevaju rastvaranje fosfata, minerala i mikronutrijenata, dok indirektni mehanizmi obuhvataju indukciju otpornosti prema patogenima (Verma i sar., 2007).

U zavisnosti od vrste gljiva *Trichoderma*, genotipa biljke i uslova spoljašnje sredine, stimulacija rasta biljaka može da se odvija pokretanjem jednog ili više prethodno navedenih mehanizama. Tako je na primer dokazano da *T. harzianum* T22 stimuliše rast velikog broja biljnih vrsta putem mehanizama koji uključuju kombinaciju povećanog unosa hranljivih materija i jona naročito azota, kao i da povećava efikasnost procesa fotosinteze (Stewart i Hill 2014).

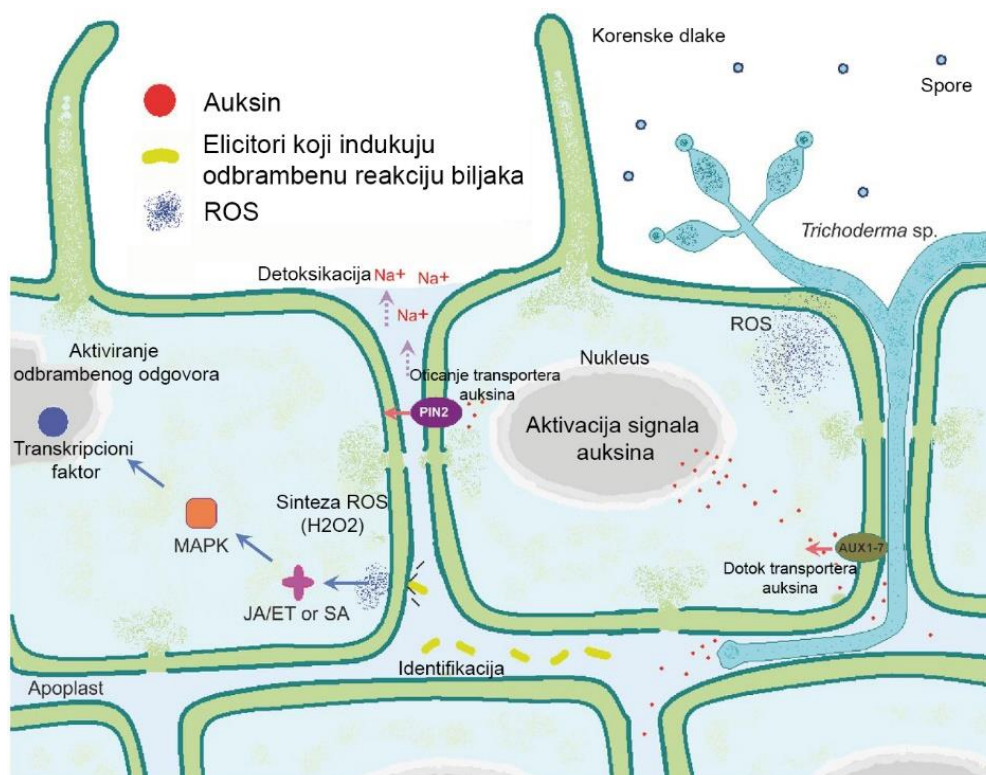
1.3.1. Kolonizacija i molekularni mehanizmi uspostavljanja interakcije *Trichoderma* – biljka

Pre uspostavljanja prvog kontakta *Trichoderma* - biljka, gljiva biva privučena hemijskim signalima, koje ispušta koren biljaka. Mehanizam uspostavljanja endofitne simbioze je sličan kao kod mikoriznih gljiva. Visoko hidrirani polisaharidi, koje luči sloj mucigela, kao i eksudati korena, poput monosaharida i disaharida, luče se u rizosferu i stimulišu rast gljiva (Hermosa i sar., 2012). Saharoza biljnog porekla je važan izvor energije, koji olakšava ćelijama gljiva *Trichoderma* da izvrše kolonizaciju korena. Uspešna kolonizacija podrazumeva sposobnost gljiva da prepoznaju koren biljaka, da se pričvrste i prodru u njega i da pri tome nadjačaju odbrambeni mehanizam biljaka koji se ogleda u lučenju toksičnih metabolita (Slika 2). U ranim fazama interakcije biljke povećavaju akumulaciju jona Ca^{2+} i reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS: vodonik-peroksid) koji predstavljaju glasnike za pokretanje odbrambenih odgovora. Neki od ovih odgovora mogu da zavise od aktivnosti MAPK koje vrše fosforilaciju odgovarajućih transkripcionih faktora uz naknadno aktiviranje gena iz JA ili SA signalnog puta.

Prilikom pričvršćivanja za koren biljaka *Trichoderma* proizvodi proteine bogate cisteinom, kao što su TassHyd1 i Qid74 koji štite vrhove hifa gljiva od odbrambenih jedinjenja koje luče biljke (Sood i sar., 2020). Prilikom uspostavljanja endofitne asocijacije, aktiviraju se signalni mehanizmi u biljci,

na molekularnom nivou, odnosno signalni putevi jasmonske kiseline (JA), salicilne kiseline (SA) i etilena (ET) (Slika 2). Prvi odgovor biljaka na kontakt sa gljivom može se ispoljiti u vidu povećanja koncentracije SA, što dovodi povećane ekspresije *PR* gena. Signalni put SA indukuje sistemsku stečenu otpornost, povezanu sa *PR* proteinima koji su locirani u ekstracelularnom prostoru ili u vakuolama ćelija biljnih tkiva koja su napadnuta (Hermosa i sar., 2012). U ovoj fazi, moguće je i da biljka spreči uspostavljanje endofitne asocijacije, jer prvi kontakt sa gljivom biljka može da prepozna kao napad patogena. Ipak, endofitna asocijacija se u većini slučajeva uspešno upostavlja. Ostvaruje se prodorom gljive u tkivo korena uz pomoć struktura nalik apresorijama, koje luče celulaze i proteolitičke enzime (Brotman i sar., 2008). Jedan od tih enzima je i svolenin, koji razara celulozu i u sinergiji sa ksilanazama omogućava uspešan kontakt mikroorganizama sa biljkom (Andberg i sar., 2015). Da bi se uspostavila endofitna asocijacija, potrebna je komunikacija između gljive i biljke na molekularnom nivou, koja se ostvaruje uz pomoć terpena harzianodinona, harzianuma, kao i trihodermina i viridina koje luči gljiva (Sood i sar., 2020; Ramírez-Valdespino i sar., 2019).

Uspešan prodor gljive u tkivo korena, praćen je brзом kolonizacijom i oslobađanjem brojnih enzima, avirulentnih molekula i jedinjenja male molekulske mase, kako od same biljke, tako i od strane gljive (Pelagio-Flores i sar., 2017).



Slika 2. Reakcija korena biljaka na prisustvo gljiva *Trichoderma* spp. (Contreras-Cornejo i sar., 2016). Prisustvo gljiva roda *Trichoderma* u rizosferi rezultira kolonizacijom površine korena biljke i prodiranjem gljiva kroz epidermis, što je praćeno produkcijom različitih jedinjenja koja aktiviraju ćelijske mehanizme u korenu.

Na osnovu analize transkriptoma u toku rane kolonizacije korena (do 24 h), ustanovljeno je da je kod gljiva *Trichoderma* indukovano oko 5 % jedinstvenih EST (*engl. Expressed sequence tags*) od njih ukupno 2496. Analize transkriptoma pokazale su da su obrasci ekspresije gena slični onima koji su opisani, kod mikoriznih i patogenih gljiva, tokom interakcije između biljke i gljive (Chacón i sar., 2007). EST koji odgovaraju genima uključenim u metabolizam lipida, transport vezikula i sintezu

ćelijskih membrana, takođe su indukovani tokom rane kolonizacije korena. Interakcije između gljiva *Trichoderma* i biljaka mogu pozitivno uticati na formiranje ćelijskih membrana, koje favorizuje razmenu hranljivih materija, što je primećeno i kod mikorizne simbioze i drugih biotrofnih interakcija (Chacón i sar., 2007).

Prisustvo ovih gljiva u rizosferi izaziva koordinisani proteomski, transkriptomski i metabolomski odgovor biljaka. S obzirom da su ekspresije gena, kod njih tokom prvih 24 h slične kao kod parazitskih gljiva, ne treba da začudi zašto biljke prvi kontakt sa ovom gljivom prepoznaju kao napad patogena. Tokom procesa interakcije u prva 72 h, nakon povećanja koncentracije salicilne kiseline (SA), aktiviranja signalnih reakcija i povećane ekspresije *PR* gena (Hermosa i sar., 2012; Yedidia i sar., 2000), kod biljaka dolazi do povećane aktivnosti hitinaze, 1.3 glukanaze, celulaze i peroksidaze. Povećanjem ukupne aktivnosti peroksidaza, indukcijom izoenzima i sintezom fenolnih jedinjenja, biljke u prvim satima, na ovaj način, kreiraju mikotoksičnu sredinu, pa ova jedinjenja sprečavaju dalji prodor gljiva u ćelije korena, a hife gljiva bivaju ograničene na međućelijski prostor, što zapravo omogućava uspostavljanje korisne asocijacije između biljke i gljive (Yedidia i sar., 2000).

1.3.2. Stimulacija biljnog rasta fitohormonima

Mehanizam koji se najčešće povezuju sa različitim stimulativnim efektima gljiva roda *Trichoderma*, na rast i razviće biljaka, je produkcija fitohormona (Tabela 1) (Contreras-Cornejo i sar., 2016). Prisustvo *Trichoderma* ne modulira samo nivo hormona u biljci, već i sama gljiva sintetise i obezbeđuje međuprodukte za sintezu fitohormona (Ramírez-Valdespino i sar., 2019).

Fitohormoni su organska jedinjenja, koja se još nazivaju i regulatorima raste biljka. Transportuju se vaskularnim putem, od mesta sinteze do mesta delovanja. Deluju u malim koncentracijama, pri čemu utiču na sve biohemijske i fiziološke procese biljaka. Biljke mogu da se snabdevaju fitohormonima endogenim (hormoni koje same proizvode) i egzogenim putem (hormoni koje proizvode mikroorganizmi). Molekularni mehanizmi delovanja fitohormona se odvijaju u tri faze. Prva faza je percepcija signala, gde dolazi do vezivanja fitohormona za specifične biljne receptore, koji se nalaze u jedru, citoplazmi ili na ćelijskoj membrani. Druga faza je transdukcija signala, do koje dolazi kada biljke prepoznaju kompleks hormona i receptora. Ovom prilikom dolazi do aktiviranja kaskadnih signalnih reakcija, koje prenose datu informaciju kroz ćeliju. Treća faza podrazumeva fiziološki odgovor biljaka. Signalni put uglavnom dovodi do aktivacije ili inaktivacije specifičnih gena, jer se delovanje fitohormona na molekularnom nivou, pre svega, postiže regulacijom ekspresije gena. Ukoliko dođe do aktivacije ekspresije gena formiraće se specifična iRNK koja nosi informaciju za sintezu novih proteina (enzima). Usled aktivnosti nosilaca sinteze enzima javljaju se specifične metaboličke ili fiziološke promene u ćelijama biljaka. Treba napomenuti, da rast i razviće biljaka nisu uslovljeni samo dejstvom pojedinačnog biljnog hormona, već zavise i od njihove interakcije. Optimalan rast biljaka usklađen je balansom između hormona stimulatora i hormona inhibitora rasta, pri čemu njihovi odnosi mogu biti antagonistički ili sinergistički (Stikić i Jovanović, 2015).

Kod različitih biljnih vrsta, potvrđeno je, da gljive roda *Trichoderma* imaju pozitivne efekte na njihov rast, razviće vegetativnih i reproduktivnih organa podstičući brojne hormonalne promene. Jedna od najočiglednijih morfoloških promena je porast u dužini izdanka i broju bočnih korenova, što je praćeno povećanjem biomase i apsorpcione površine korena. Za ove procese odgovorni su biljni hormoni auksini, kao i mehanizmi međusobne komunikacije (*engl.* cross-talk) između etilena (ET) i auksina, koji su posredovani signalnim putevima mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) (Contreras-Cornejo i sar., 2016). Literaturni podaci govore da *T. harzianum* pozitivno utiče na inicijaciju rasta korena biljaka, što je povezano sa stimulacijom sinteze hormona auksina. Ujedno, kod biljaka ova gljiva dovodi i do smanjene koncentracije citokinina koji su odgovorni za sprečavanje rasta korena. Kod nadzemnih delova biljaka gljive roda *Trichoderma* pozitivno utiču na rast prečnika

stabla, broj i površinu listova, kao i broj i masu plodova. Ova gljiva kod biljaka indukuje sintezu gibberelinske kiseline, koja pospešuje izduživanje aksijalnih pupoljaka i listova. Smatra se, da su tokom interakcije, kod biljaka povećano ekspimirani (*engl.* up-regulated) ključni geni zaduženi za biosintezu hormona ili da su smanjeno ekspimirani (*engl.* down-regulated) oni geni koji su uključeni u hormonski katabolizam, što je indukovano elicitorima koje luči *T. harzuanum* (Stewart i Hill 2014). *T. virens* kod biljaka *A. thaliana* dovodi do povećanja rasta izdanaka i korena, usled povećane ekspresije gena, koje su regulisane auksinom (Contreras-Cornejo i sar., 2009). Takođe, molekularne analize sprovedene na *A. thaliana* otkrile su da kolonizacija korena od strane *T. asperelloides* naglo aktivira porast transkripcionih faktora (WRKY18, WRKY40, WRKY60 and WRKY33) koji potiskuju signalizaciju SA i predstavljaju okidač za aktiviranje signalnih mehanizama JA (Brotman i sar., 2013). Nakon interakcije biljaka i gljiva roda *Trichoderma* dolazi do povećane *LOX* i *PAL1* gena, koji su uključeni u biosintezu JA i SA, kao i *ETR1* i *CTR1* gena koji učestvuju u signalnom putu ET (Sood i sar., 2020).

Tabela 1. Fitohormoni koji su uključeni u promociju biljnog rasta, koje sintetišu gljive roda *Trichoderma*.

Klasifikacija	Naziv	Funkcija	Vrsta	Referenca
Hormoni stresa	ABA	Regulacija procesa transpiracije i zatvaranje stoma	<i>T. virens</i> i <i>T. atroviride</i>	Contreras-Cornejo i sar., 2015
	JA	Signalni molekul za indukovanu sistemsku otpornost	<i>T. asperellum</i>	Yoshioka i sar., 2012
	ET	Signalni molekul za indukovanu sistemsku otpornost	<i>T. atroviride</i>	Mukherjee i sar., 2013
	SA	Povećava otpornost biljaka na bolesti indukovane sistemskom stečenom otpornošću	<i>T. atroviride</i>	Ruocco i sar., 2015
Stimulatori rastenja	IAA	Rast i razvoj biljaka i njihovog korenovog sistema	<i>T. atroviride</i> , <i>T. asperellum</i> , <i>T. harzianum</i> . i <i>T. virens</i>	Monfil i Casas-Flores 2014; Contreras-Cornejo i sar., 2009
	GA ₃	Promocija rasta biljaka koja se ostvaruje denaturacijom DELLA proteina	<i>Trichoderma</i> spp.	Guzmán-Guzmán i sar., 2019
	CK	Pozitivni efekti na rast i razvoj biljaka	<i>T. atroviride</i>	Guzmán-Guzmán i sar., 2019

1.3.2.1. Auksini

Prvi otkriveni fitohormoni su bili auksini, stimulatori rastenja, među kojima je fiziološki najaktivnija indol-3-sirćetna kiselina (IAA). Fiziološka uloga IAA je u izduživanju stabla i koleoptila, ubrzanom razvoju plodova, stimulise klijanje semena, obrazovanje bočnih i adventivnih korenova, takođe utiče procese fotosinteze, biosinteze pigmenata i brojnih metabolita, kao i na aktivnost nekih enzima za sintezu proteina i nukleinskih kiselina. Gljive roda *Trichoderma* sintetišu i izlučuju IAA, a takođe

svojim prisustvom mogu i da indukuju sintezu IAA od strane biljke (Monfil i Casas-Flores 2014). Ovo je jedan od načina na koji gljive roda *Trichoderma* stimulišu rast biljaka (Slika 3).

1.3.2.2. Etilen

Etilen (ET) je jedini biljni hormon u gasovitom stanju, koji se najčešće povezuje sa procesima sazrevanja. Deluje u vrlo malim koncentracijama i najčešće ga proizvode tkiva koja stare. Učestvuje u fiziološkim procesima kao što su ubrzano sazrevanje plodova, stimuliše sintezu antocijana i karotenoida, inhibira izduživanje korena i izdanaka i odgovoran je za ubrzano starenje listova i cvetova. Povećana akumulacija ET u biljnim tkivima inhibira rast biljaka i može prouzrokovati smrt biljke. Gljive roda *Trichoderma* snižavaju nivo ET u biljkama i na taj način pospešuju biljni rast. Mehanizam kojim gljive roda *Trichoderma* smanjuje nivo etilena zasniva se na proizvodnji enzima 1-amino-ciklopropan-1-karboksilat deaminaze (ACCD). Ovaj enzim vrši hidrolizu prekursora etilena 1-amino-ciklopropan-1-karboksilnu kiselinu (ACC) i sprečava sintezu etilena. Indirektno, na sintezu etilena može da utiče i IAA koja stimuliše aktivnost enzima ACCD (Stewart i Hill 2014).

1.3.2.3. Citokinini

Citokinini (CK) su fitohormoni čija je koncentracija najveća u tkivima koja aktivno rastu. Pozitivno utiču na fiziološke i razvojne procese biljaka kao što su: klijanje semena, grananje korena i izdanaka, debljanje stabla, olistavanje, transport hranljivih materija, akumulacija hlorofila, otvaranje stoma, deoba ćelija i odlaganje starenja. Gljive roda *Trichoderma* sintetišu CK slične onima koje proizvode i biljke. Biljke usvajaju CK koje produkuju ove gljive, te se ovim putem ostvaruje pozitivan efekat. Različiti izolati *T. harzianum* su u stanju da smanje ukupan sadržaj neaktivnih CK u izdancima biljaka, što zajedno sa dejstvom drugih fitohormona, kao što su ABA, IAA i ET, gljiva koristi za podsticanje biljnog rasta (Slika 3) (Guzmán-Guzmán i sar., 2019).

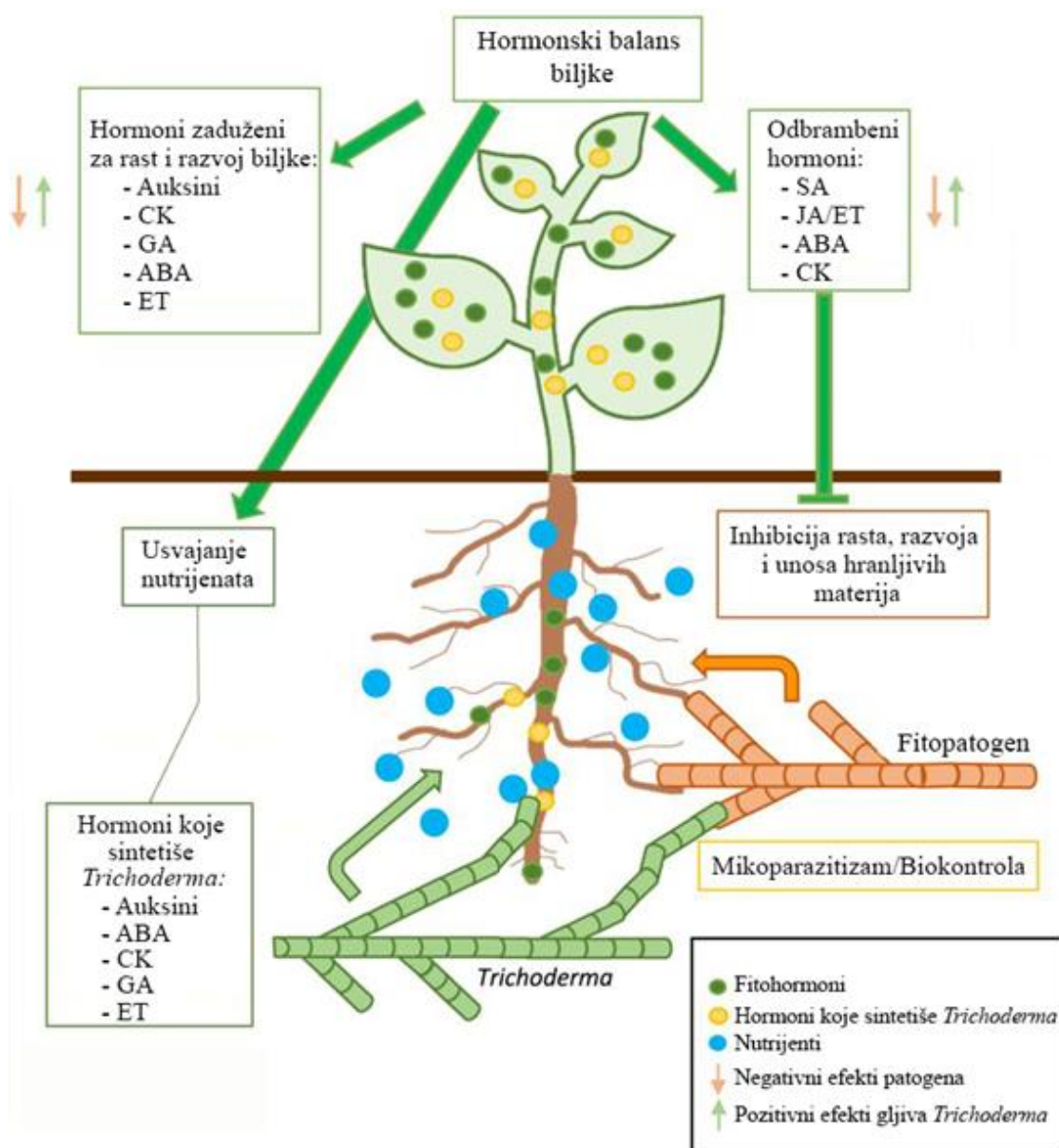
1.3.2.4. Giberelini

Giberelini (GA) su po hemijskom sastavu organske kiseline koje se iz tog razloga još i nazivaju giberelne kiseline, među kojima je najpoznatija GA₃. Fiziološka uloga giberelina je da stimulišu klijanje semena, cvetanje, rastenje i formiranje plodova, kao i izduživanje stabla. Gljive roda *Trichoderma* indukuju sintezu giberelina i povećavaju njihov sadržaj u biljnom tkivu, čime se pospešuje rast i razvoj biljaka. Mehanizam delovanja GA se zasniva na sposobnosti giberelinske kiseline da razgrađuje DELLA proteine, čime se stimuliše rast biljaka. DELLA proteini su transkripcioni faktori koji sprečavaju aktivnost GA gena za koje se smatra da uzajamno povezuju signale drugih hormona. Između ostalog, giberelinska kiselina razgradnjom DELLA proteina aktivira represor jasmonske kiseline (JA) JAZ1 koji smanjuje ekspresiju gena JA, usled čega se aktivira signalni put salicilne kiseline (SA), što dovodi do povećanja otpornosti na napade patogenih mikroorganizama (Guzmán-Guzmán i sar., 2019).

1.3.2.5. Apscisinska kiselina

Apscisinska kiselina (ABA) se kontinuirano sintetiše u malim količinama u ćelijama mezofila, sa tendencijom akumulacije u hloroplastima. Ima značajnu fiziološku ulogu u procesima inhibicije klijanja semena i cvetanja, ubrzava sazrevanje i senescenciju plodova, indukuje sintezu rezervnih proteina, ubrzava starenje i opadanje listova. ABA je poznata kao univerzalni hormon stresa, koji je umešan u percepciju mnogih abiotičkih stresnih faktora (suša, povišene koncentracije soli, visoke i niske temperature). Uloga ABA je izuzetno važna u adaptivnim reakcijama biljaka na stres izazvan nedostatkom vode. Dokazano je da je više od 67% gena koji se aktiviraju prilikom stresa suše regulisano apscisinskom kiselinom (Huang i sar., 2008). Povećana koncentracija ABA u biljnom tkivu je signal za regulaciju procesa transpiracije, procesa fotosinteze, reakciju stoma i ekspresiju gena koji regulišu adaptivne odgovore biljaka (Vishwakarma et al., 2017). Povećanje koncentracije ABA modifikuje regulatorne puteve abiotičkog stresa, dok su odgovori na biotički stres posredovani antagonizmom između drugih hormona stresa poput SA, JA i ET (Slika 3). Pri kombinaciji abiotičkog i biotičkog stresa ABA uglavnom deluje antagonistički sa SA i JA, tako da biljke koje su izložene jednom ili višestrukum stresu se aklimatizuju i mogu postati otpornije i na druge vrste stresa. Ova pojava poznata je kao unakrsna tolerancija. Tako, na primer, pod uticajem abiotičkog stresa suše

dolazi do povećanja koncentracije ABA u listovima, što izaziva zatvaranje stoma, što ujedno sprečava i prodiranje patogena u tkiva (Rejeb i sar., 2014). Vrste gljiva *Trichoderma* u stanju su da proizvode prekursor za sintezu apscisinske kiseline, ABA aldehid. Biljke tokom interakcije usvajaju ABA aldehid i uz pomoć enzima ABA aldehid-oksidadze prevode ga u ABA (Guzmán-Guzmán i sar., 2019).



Slika 3. Šematski prikaz modifikovane hormonske ravnoteže kod biljaka pod uticajem gljiva roda *Trichoderma* (Guzmán-Guzmán i sar., 2019).

Jedan od najvažnijih mehanizama pravilnog rasta i razvika biljaka, kao i preživljavanja biotičkih ili abiotičkih stresova uključuje modulaciju fitohormona, kao što su auksin, citokinini (CK), giberelini (GA), apscisinska kiselina (ABA), etilen (ET), salicilna kiselina (SA) i jasmonska kiselina (JA) (obeleženi su zelenim krugovima). Kada *Trichoderma* stupi u interakciju sa biljkom ona modifikuje njen hormonski balans, posredstvom hormona koje sama sintetiše (žuti krugovi), poboljšavajući na taj način zdravstveno stanje i rast i razvika biljaka (male zelene strelice) (Guzmán-Guzmán i sar., 2019).

1.3.3. Uticaj na dostupnost i usvajanja nutrijenata

Sadržaj hranljivih materija u zemljištu je važan faktor koji utiče na rast i razvoj biljaka. Biljke, usvajaju mineralne materije iz zemljišta uglavnom preko korena i putem ksilemskih elemenata ih dalje transportuju. Mineralni joni u zemljištu su vezani za koloidne čestice električnim silama, što biljkama omogućava lako usvajanje, mehanizmom izmenljive apsorpcije uz pomoć jona koje same luče. Međutim, postoje mineralni elementi koje biljke teško usvajaju i na čiju pristupačnost utiču fizičke i hemijske osobine samog zemljišta kao i njegova mikrobiološka aktivnost. Mikroorganizmi imaju važnu ulogu jer procesima humifikacije i mineralizacije vrše transformaciju organskih materija pri čemu dolazi do oslobađanja mineralnih elementa potrebnih za neometan rast biljaka. Mikroorganizmi - biofertilizatori, kroz učešće u ciklusima hranljivih elementa N, P, S i K snabdevaju biljke ovim elementima koji im inače nisu lako dostupni ili im uopšte nisu dostupni (Mitter i sar., 2021).

Brojni literaturni podaci govore o sposobnosti gljiva roda *Trichoderma* da biljkama olakšaju unos nutrijenata i da na taj način stimuliraju njihov rast, posebno u zemljištu koje je siromašno hranljivim sastojcima. Ove gljive smanjuju pH vrednost zemljišta proizvodnjom organskih kiselina, poput limunske, glukonske i fumarne, čime se olakšava rastvaranje fosfata, kao i unos mikro i makro elemenata (Fe, Mg i Mn) neophodnih za metabolizam biljaka (Ram i sar., 2020). Gljive roda *Trichoderma* vrše solubilizaciju različitih biljnih nutrijenata, kao što su fosfati i joni Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} i Zn^{2+} koji mogu predstavljati ograničavajući faktor za rast biljka (Contreras-Cornejo i sar., 2016). Sam proces solubilizacija metalnih oksida od strane gljiva *Trichoderma* spp. uključuje procese helacije i redukcije.

Dokazano je da su različite vrste gljiva *Trichoderma* sposobne da sintetišu kumarinsku, glukuronsku i limunsku kiselinu, koje moduliraju procese u rizosferi i olakšavaju biljkama usvajanje teško rastvorljivih oblika fosfora. (Sood i sar., 2020). Li i sar. (2015) su primetili da nakon inokulacije *T. harzianum* kod biljaka paradajza dolazi do povećanog usvajanja Cu, Na i Zn. Slično tome, primećeno je da ista gljiva pored Zn povećava biljkama dostupnost P i Fe (Altomare i sar., 1999). Nedostatak gvožđa u alkalnom zemljištu predstavlja jedan od glavnih uzročnika smanjenog prinosa i kvaliteta plodova biljaka. Pored toga, koncentracija gvožđa koja je pristupačna biljkama u poređenju sa ukupnom količinom gvožđa u zemljištu je veoma niska. Za rešavanje ovog problema može se iskoristiti sposobnost gljiva roda *Trichoderma* koja se zasniva na produkciji siderofora. Zabeleženo je da aplikacija *T. asperellum* u zoni korena krastavca povećava sadržaj jona Fe^{2+} i siderofora u zemljištu, kao i aktivnost Fe^{2+} i Fe^{3+} helat reduktaze (Harman i sar., 2004). Kompleks siderofora se vezuje za nerastvorno gvožđe (Fe^{3+}) i zatim ga prevodi u lako dostupnu formu za biljke (Fe^{2+}) (Amaresan i sar., 2020).

Azot zauzima važno mesto među neophodnim elementima za biljku i najviše utiče na prinos. Biljke ga usvajaju u obliku NO_3^- i NH_4^+ jona, koji u zemljištu najvećim delom nastaju kao ishod interakcijskih procesa između biljaka i mikroorganizama. Signalizacija N se ukršta sa drugim signalnim putevima, i to takođe utiče na rast i razvoj biljaka. Harman (1998) navodi da je u zemljištu siromašnom azotom *T. harzianum* uticala na povećanje prinosa kukuruza za 45 %. Značajno povećanje prinosa pripisano je pojačanom unosu azota i drugih minerala putem korena, kome se biomasa takođe povećala. Dalja istraživanja su pokazala da korenu kukuruza koji je tretiran sa *T. harzianum* treba do 40 % manje azotnog đubriva u odnosu na netretiran koren kukuruza (Stewart i Hill 2014). Brotman i sar. (2012) su objavili da *T. asperelloides* utiče na povećanje sadržaja aminokiselina kod biljaka. Sposobnost raspodele i unosa novih količina N određuje efikasnost korišćena azota. Shodno tome, povećanje sadržaja aminokiselina koje inače čine osnovni oblik transporta N je verovatno glavna determinanta odgovorna za povećanje efikasnosti korišćenja azota kod biljaka u interakciji sa gljivama roda *Trichoderma* (Contreras-Cornejo i sar., 2016).

Prethodno navedeni primeri dokazuju da vrste gljiva roda *Trichoderma* imaju široku sposobnost solublizacije makroelemenata (N i P) i mikroelemenata (Cu, Fe, Mn i Zn), čineći ih pristupačnijim za biljke, što se pozitivno održava i na sam rast i razvoj biljaka.

1.3.4. Stimulacija biljnog rasta sekundarnim metabolitima gljiva roda *Trichoderma*

Sekundarni biomolekuli su niskomolekulska jedinjenja, koja nisu od esencijalnog značaja za rast i razvoj organizma, ali su važni u interakciji između organizama. Gljive roda *Trichoderma* sintetišu brojne i raznovrsne sekundarne metabolite sa potencijalnom primenom u poljoprivredi, biotehnologiji i medicini. Do sada je identifikovano više od 370 različitih molekula, ali u mnogim slučajevima njihova uloga još uvek nije dovoljno poznata (Contreras-Cornejo i sar., 2016). Veličina genoma gljiva iz roda *Trichoderma* se uglavnom kreće u rasponu od 33 do 41 Mb, dok se broj gena kreće od 9000 do 14000 (Kubicek i sar., 2019). U poređnom analizom genoma nekoliko vrsta ovih gljiva, došlo se do informacija da veliki broj gena, čini deo klastera uključenog u sintezu sekundarnih metabolita. Primera radi, genom *T. virens* se sastoji od 440 gena (klasifikacija sprovedena „EuKaryotic Orthologous Groups, KOG”) koji su povezani sa biosintezom sekundarnih metabolita (Sharma i sar., 2019). Većina sekundarnih metabolita sintetiše se neribozomalnom peptid-sintetazom (NRPS), hibridnom poliketid-sintazom (PKS) i terpenskom sintazom (Zeilinger i sar., 2016). Gljive roda *Trichoderma* vrše sintezu neisparljivih i isparljivih organskih jedinjenja (VOC) od kojih su za stimulaciju biljnog rasta i kontrolu brojnosti fitopatogena najznačajniji neribozomalni peptidi, poliketidi, terpenoidi i pironi.

Neribozomalni peptidi čine veliku i važnu grupu sekundarnih metabolita. Nastaju fuzijom dve ili više aminokiselina uz pomoć neribozomalne peptid-sintetaze (NRPS). U ovu grupu spadaju peptabiotici, epiditiodioksipiperazini i siderofore. Peptabiotici su ciklični peptidi koji su izgrađeni od 4 do 21 aminokiselina. Identifikovano ih je više 1000 (Zeilinger i sar., 2016). Ispoljavaju antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost. Indukuju odbrambene odgovore biljaka u vidu taloženja kaloze, i ekspresije gena koja je povezana sa odbrambenim mehanizmom biljaka i akumulacijom fenolnih jedinjenja. Pored peptabiotika, danas je poznato više od 700 sekvenci peptabiotika (kratki peptidi neribozomalnog porekla) od kojih, većinu proizvode, upravo gljive roda *Trichoderma* (Degenkolb i sar., 2008). Epiditiodioksipiperazini su reaktivni sekundarni metaboliti gljiva, čija toksičnost potiče od disulfidne veze, koja može da inaktivira proteine vezivanjem za tiol grupe ili stvaranjem ROS (Zeilinger i sar., 2016). Najbolje proučeni biotoksini iz ove grupe su glitoksin i gliovirin, koje su važi za biokontrolu biljnih patogena i sintetiše ih *T. virens*. Siderofore su sekundarni biomolekuli koji heliraju gvožđe. Siderofore, kao što su dimerna kiselina, fusigen, fusarinin A, koprogen, sintetiše veliki broj vrsta gljiva *Trichoderma* (Lehner i sar., 2013). Poslednja izolovana siderofora za koju je utvrđeno da stimuliše rast biljaka je harzianska kiselina, koju su izolovali iz *T. harzianum* Vinale i sar. 2009. godine.

Poliketidi su najbrojnija grupa sekundarnih biomolekula, sintetišu se iz jedinjenja poput acetilkoenzima A i malonilkoenzima A posredstvom hibridne poliketid-sintaze (PKS). *Trichoderma* spp. vrši biosintezu poliketida poput: antibiotika (tetraciklini i makrolidi), pigmenta (bikaverin i fuzarubin), mikotoksina (aflatoksin, fusarna kiselina i fumonizin) i statina (lovastatin i kompaktin) (Zeilinger i sar., 2016).

Terpenoidi čine najveću grupu organskih jedinjenja i u prirodi se mogu javljati u vidu isparljivih ili neisparljivih organskih jedinjenja. R-mevalonska kiselina predstavlja polazno jedinjenje za sintezu terpenoida, dok je ključni enzim u biosintezi terpena terpenska sintaza. Kod gljiva roda *Trichoderma* identifikovani su sledeći terpeni: isparljivi terpen (harzianodinon), seskviterpeni (trihodermin i harzianum A) i triterpen (viridin) (Zeilinger i sar., 2016). Istraživanja ukazuju da prilikom formiranja endofitne asocijacije, spomenuti terpenoidi, imaju bitnu ulogu u komunikaciji između gljiva i korena biljaka, koja se ostvaruje na molekulskom nivou.

Pironi su heterociklična hemijska jedinjenja, čija biosinteza još uvek nije do kraja istražena. Najvažniji predstavnik, koji sintetišu gljive roda *Trichoderma* je 6-penil-piron (6-PP). Ovo jedinjenje se klasifikuje kao VOC, odgovorno za karakterističnu aromu kokosa i deluje antifungalno (Zeilinger i sar., 2016).

1.3.5. Stimulacija otpornosti biljaka na abiotički i biotički stres

Adaptacije ili sticanje otpornosti na biotički i/ili abiotički stres od velikog su značaja za biljke, jer kao sesilni organizmi one nisu u mogućnosti da izbegnu nepovoljne uslove. Da bi biljke reagovala na stres one prvo moraju da ga prepoznaju. Prepoznavanje je najčešće na membranskom nivou i ostvaruje se uz pomoć receptornih proteina za koje se vezuju signalni molekuli. Ključni korak u biljnoj odbrani je blagovremena percepcija stresa, kako bi odgovor mogao biti brz i efikasan (Rejeb i sar., 2014). Nakon prepoznavanja stresa, odbrambeni mehanizam biljaka aktivira kaskadne, intracelularne signalne reakcije, koje zatim prenose informaciju o stresu kroz ćeliju. Signalni put se dalje nastavlja regulacijom procesa transkripcije ili post-translacionim modifikacijama. Transkripcija gena idukovanih stresom reguliše se vezivanjem transkripcionih faktora za specifične regione DNK (Stikić i Jovanović, 2015). U ovoj fazi dolazi do ekspresije određenih gena i sinteze proteina stresa. Ćelije zatim reaguju specifičnim metaboličkim odgovorima, a kao rezultat svega, nastaje određena adaptivna reakcija (Ramírez-Valdespino i sar., 2019).

1.3.5.1. Stimulacija otpornosti na abiotički stres

Brojna istraživanja govore o sposobnosti gljiva roda *Trichoderma* da indukuju otpornost biljaka na abiotički stres. Poznato je da ove gljive poboljšavaju otpornost biljaka na sušu, visoke ili niske temperature, vlagu, salinitet i povećane ili smanjene koncentracije hranljivih supstanci (Contreras-Cornejo i sar., 2016). U zemljištu, povišene koncentracije NaCl deluju kao osmotski stres, koji izaziva sušu, smanjene koncentracije hlorofila, smanjene otpornosti na patogene i smanjenog rasta biljaka. Zabeleženo je da *T. harzianum* ublažava štetne efekte kod pirinča uzrokovane povećanim salinitetom (Rawat i sar., 2012), *T. asperelloides* kod *A. thaliana* (Brotman i sar., 2013), a *T. asperellum* kod krastavca (Qi i Zhao, 2013). Kod pšenice, kada je izložena istoj vrsti stresa, u prisustvu *T. longibrachiatum*, dolazi do značajne stimulacije sinteze antioksidanasa, kao što su superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza (CAT) i peroksidaza (POD) (Zhang i sar., 2016). Ghorbanpour i sar. (2018) su primetili da je stres uzrokovan niskim temperaturama kod biljaka paradajza ublažen primenom *T. harzianum*. Montero-Barrientos i sar. su 2010. godine dokazali da biljke *A. thaliana* pokazuju veću toleranciju na povišene temperature nakon što su genetički transformisane genom *Hsp70* *T. harzianum*. Istraživanja Adams i sar. (2007) su pokazala da *T. harzianum* u zemljištu, u kojem su povišene koncentracije Cr, Ni, Pb i Sb, vezuje teške metale, čine ih manje toksičnim i podstiče produkciju biomase vrba za 39 % u odnosu na netretirane biljke.

Jedana od najznačajnijih vrsta abiotičkog stresa je suša. Ona indukuje niz biohemijskih i fizioloških odgovora, među kojima su najznačajniji mehanizmi zatvaranja stoma, ekspresija gena za biosintezu ABA, smanjen intenzitet fotosinteze i intracelularne koncentracije CO₂. Istraživanja gljive roda *Trichoderma* govore da ova gljiva stimuliše rast korena, što je jedan od najefikasnijih načina na koji biljke stiču otpornost u uslovima smanjene snabdevenosti vodom. Jedan od mehanizama otpornosti na sušu zasniva se i na činjenici da koren biljaka u interakciji sa hifama ovih gljiva olakšano usvaja kapilarnu vodu, koja je kapilarnim silama vezana za pore u tlu. Sintezom organskih kiselina poput glukonske, limunske i fumarne kiseline, ove gljive rastvaraju fosfate, mikroelemente i mineralne katjone poput gvožđa, mangana i magnezijuma, što dalje olakšava i/ili omogućava usvajanje hranljivih nutrijenata i u uslovima suše. Sintezom fitohormona (auksini, CK i ET) doprinose otpornosti biljaka na stres izazvan sušom. Stres izazvan vodnim deficitom i/ili visokim temperaturama, kod biljaka dovodi do intenzivnije proizvodnje reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS)

koja negativno utiču na ćelijske membrane, enzimske reakcije, odvijanje procesa fosforilacije, a u velikim koncentracijama prouzrokuju i ćelijsku smrt. Kod biljaka koje su u interakciji sa *Trichoderma* spp. utvrđene su povišene koncentracije hitinaza, lipooksigenaza, glukanaza, preoksidaza i hidroperoksidaza. Ovi enzimi su uključeni u procese sinteze fenola i fitoaleksina koji redukuju ROS u tkivu biljaka i takve biljke bivaju otpornije na uslove smanjene snabdevenosti vodom. Kod biljaka paradajza koje su izložene dejstvu suše utvrđeno je da *T. harzianum* u korenu i listu moduliše ekspresiju gena koji kodiraju antioksidativne enzime kao što su superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza (CAT) i askorbat-peroksidaza (APX) koji uklanjaju ROS (Contreras-Cornejo i sar., 2016).

1.3.5.2. Stimulacija otpornosti na biotički stres - *Trichoderma* kao biopesticid u biokontroli biljnih bolesti

Za suzbijanje bolesti, u većini slučajeva, u poljoprivredi se koriste hemijski pesticidi. Ove hemijske mere dovode do efikasnog povećanja prinosa, ali one vrše negativan uticaj na životnu sredinu, diverzitet mikroorganizama i zdravlje ljudi. Sve veća potreba za kontrolom bolesti u cilju povećanja prinosa i kvaliteta poljoprivrednih proizvoda, a da se pri tome ne vrše negativni uticaji na životnu sredinu, dovela je do razvoja alternativnog pristupa tj. biološke kontrole. Biokontrola je ekološki prihvatljiv način u borbi protiv biljnih patogena i štetočina primenom bioloških materijala. Najčešće su u upotrebi mikroorganizmi i njihovi proizvodi. Na mogućnost primene gljiva roda *Trichoderma* kao biokontrolnog agensa, prvi put su ukazali Weindling i saradnici 1934. godine.

U interakciji između biljke, soja *Trichoderma* i patogena uključeni su brojni procesi. Pored toga što su uspešni biljni simbioti, ove gljive su danas poznate i kao jeftini, efikasni i ekološki prihvatljivi biokontrolni agensi. Prilikom kontrole biljnih patogena utvrđeno je da vrše minimalan uticaj na ekološku ravnotežu zemljišta, kao i na brojnost drugih korisnih mikroorganizama zaduženih za kontrolu patogena. Mehanizmi delovanja ovih gljiva, kao biokontrolnih agenasa, zasnivaju se na antagonističkim odnosima kao što su: kompeticija, amensalizam, indukovana otpornost i parazitizam (Sood i sar., 2020; Contreras-Cornejo i sar., 2016).

Kompeticija kao tip ekoloških odnosa je klasičan mehanizam biokontrole od strane gljiva *Trichoderma* spp. koje se nadmeću za prostor i hranljive materije sa drugim mikroorganizmima. Sposobnost da modifikuju rizosferu, brz rast micelija, produkcija velikog broja spora, mala potreba za vodom, podnošenje širokog raspona temperature i pH vrednosti, samo su neke od osobina, koje omogućavaju ovim gljivama da se uspešno izbere za prostor i nutrijente. Ugljenik, gvožđe i azot su neophodni elementi za većinu filamentoznih gljiva (Vinale i sar., 2008). Ograničavanje unosa spomenutih elemenata jedna je od metoda biološke kontrole patogena od strane gljiva roda *Trichoderma*. Neke vrste gljiva *Trichoderma* u uslovima nedostatka gvožđa proizvode siderofore, koje heliraju gvožđe i prevode ga u oblik lako dostupan za biljku. Povećano usvajanje gvožđa od strane biljaka iscrpljuje izvore ovog elementa i na taj način inhibira rast drugih mikroorganizama. Gljive roda *Trichoderma* pokazuju veću sposobnost apsorpcije hranljivih materija iz zemljišta, u poređenju sa drugim zemljišnim mikroorganizmima (Bargaz i sar., 2018). Ovu prednost, između ostalog, ostvaruju smanjivanjem pH vrednosti zemljišta lučenjem glukonske, fumarne i limuinske kiseline, koje olakšavaju solubilizaciju mikroelemenata i mineralnih katjona (Fe, Mn, Mg) (Sood i sar., 2020). Dobar primer je *T. harzianum* koja kontroliše rast patogena *Fusarium oxysporum* nadmećući se sa njim za hranljive materije i kolonizacijom rizosfere.

Amensalizam je vid biološke interakcije u kojoj gljive roda *Trichoderma* ograničavaju rast i razviće drugih mikroorganizama, pri čemu same ne trpe negativne posledice. Ovaj tip biokontrole karakteriše sinteza i lučenje brojnih ekstracelularnih enzima i sekundarnih metabolita gljiva *Trichoderma* spp (Cardoza et al. 2007). Važniji predstavnici sekundarnih metabolita i antibiotika koje luče su peptaiboli, poliketidi, pironi, neribozomski peptidi, siderofore, terpeni, steroidi i jedinjenja koja sadrže azot i oni direktno ograničavaju rast i razvoj patogenih gljiva (Sharma i sar., 2019). Antibiotički

i fungicidni metaboliti, poput konigidina D (sintetiše *T. konigii*) sprečavaju rast i razvoj patogena *R. solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii*, *Fusarium oxysporum* i *Bipolaris sorokiniana*. Na isti način antibiotik viridin (sintetiše *T. koningii*, *T. viride* i *T. virens*) deluje na patogene *Botrytis allii*, *Colletotrichum lini*, *Fusarium caeruleum*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* i *Stachybotrys atra* (Sood i sar., 2020). Harzianična kiselina kao derivat *T. harzianum* u *in vitro* kulturi pokazuje antibiotsku aktivnost protiv patogen *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *R. solani* (Manganiello i sar., 2018).

Indukovana otpornost dovodi do aktiviranja odbrambenog sistema biljaka, koji suzbija i usporava infekcije patogenima. Poznato je da inokulacijom gljiva roda *Trichoderma* u rizosferu, biljke stiču otpornost od napada patogena kao što su virusi, bakterije i gljive. Biljke tada aktiviraju različite mehanizme u borbi protiv patogena, koji uglavnom uključuju indukovanu sistemsku otpornost i sistemsku stečenu otpornost (Sood i sar., 2020). Potvrđeno je da različiti metaboliti ovih gljiva mogu da izazovu indukovanu otpornost. Elicitori iz gljiva roda *Trichoderma* odgovorni su za ekspresiju nekoliko familija gena, koje kodiraju proteine, povezane sa odbrambenim sistemima biljaka (Gomes i sar., 2018). Ove gljive kod biljaka aktiviraju ekspresiju gena, koji kodiraju enzime oksidativnog stresa, PR (patogenesis-related), hitinaze, ksilanaze, peroksidaze i β -glukozidaze. Kada gljive roda *Trichoderma* kolonizuju koren biljaka, dolazi do povećanja koncentracije biljnih hormona JA i ET, koji kao signalni transdukциони molekuli indukuju sistemsku otpornost. Iako su geni i signalni putevi ova dva tipa otpornosti kod biljaka drugačiji, rezultat njihovog delovanja je isti. Biljke u oba slučaja stiču otpornost na napad patogena. Poznato je da ova dva vida otpornosti mogu da deluju i sinergistički te se u literaturi često mogu pronaći i kao sinonimi.

Parazitizam, kao interspecijski odnos, predstavlja sposobnost gljiva roda *Trichoderma* da žive na račun druge vrste tj. domaćina. Ove gljive su antagonisti biljnih parazita kao što su nematode. Poznato je da su *T. harzianum*, *T. asperellum* i *T. atroviride* paraziti nematode *Meloidogyne javanica* koja parazitira na više od 700 biljnih vrsta, takođe *T. harzianum* je i parazit nematoda koje napadaju krompir *Globodera rostochiensis* (Sharma i sar., 2019). Ove gljive odlikuje i sposobnost mikoparazitizma. Ovo je jedan od najvažnijih antagonističkih mehanizama kod gljiva *Trichoderma*. Zabeleženo je oko 75 vrsta *Trichoderma* koje pokazuju mikoparazitski potencijal. Ove gljive napadaju brojne biljne patogene gljive kao što su *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Pythium spp.* i *Ustilago maydis* (Sood i sar., 2020). Kada gljive roda *Trichoderma* prepoznaju biljnog patogena, na osnovu malih molekula koje on proizvodi, uvijaju svoje hife oko hifa patogena. Zatim dolazi do pojačane ekspresije gena, koji kodiraju litičke enzime. Litički enzimi glukanaze, proteinaze i hitinaze u sinergiji sa peptidolima razgrađuju ćelijski zid fitopatogenih gljiva. Na ovaj način *Trichoderma* prodire u hife domaćina, gde počinje da parazitira i da se hrani njihovim unutrašnjim sadržajem. Pretpostavlja se da je oko 20 do 30 poznatih gena, proteina ili metabolita uključeno u ovu aktivnost.

1.4. Paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) kao model organizam - opšte karakteristike

Genom paradajza je sekvenciran 2012. godine na sorti Heinz 1706 (H1706) i od tada dodatno raste njegova popularnost kao model sistema u istraživanju biljaka. Veličina genoma iznosi približno 950 megabaza (Mb) i 35000 gena. Od toga je 760 Mb složeno u 91 skafold koji su uređeni u 12 hromozoma. Za razliku od genoma arabidopsisa i sirka, paradajz ima manje velikih kopija gena, LTR (*engl.* long terminal repeat) retrotranspozona i manje visokofrekventnih k-mer (sve moguće podsekvence dobijene sekvenciranjem DNK) (Sant'Ana i sar., 2018). Zbog značaja u proizvodnji povrća, kratkog ciklusa razvika, raznovrsne hemijske prirode sekundarnih metabolita, genoma male veličine pogodnog za genetičke manipulacije i transformacije, paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) se često koristi kao model organizam za istraživanja abiotičkog i biotičkog stresa, kao i za

proučavanja razvića i sazrevanja plodova. Shodno tome, paradajz pruža nove uvide u biološke procese koji se ne mogu dobiti primenom drugih model organizama poput arabidopsisa i pirinča. Veoma je značajan jer se koristi kao model organizam za čitavu familiju biljaka *Solanaceae* (krompir, biber, duvan i patlidžan) koja broji više od 3000 biljnih vrsta.

Paradajz je poreklom iz Južne Amerike i druga je najčešća i ekonomski najznačajnija povrtarska kultura posle krompira (Quinet i sar., 2019). Ukupna svetska proizvodnja paradajza iznosi oko 182.3 miliona tona godišnje na površini od 4.85 miliona hektara (FAOSTAT, 2019). To je višegodišnja zeljasta biljka iz familije *Solanaceae*, koja se uglavnom gaji kao jednogodišnja biljka. Primarno stablo odlikuje simpodijalan rast, sklonost poleganju zbog slabo razvijenog sklerenhimskog tkiva i sposobnost formiranja adventivnih korena pri optimalnoj vlažnosti zemljišta i vazduha. Bočni izdanci se razvijaju iz glavnog stabla, koje za razliku od bočnih grana neposredno po formiranju prve cvetne grane zaustavlja svoj rast. Visina stabla uglavnom varira od 40 cm do 120 cm, dok kod pojedinih genotipova može dostići i visinu do 3m. List paradajza je dug i do 50 cm, uglavnom je neparno perast na dugačkim drškama i prekriven sitnim dlačicama. Nervatura lista je mrežasta i izraženija je na njegovom naličju. Koren je razgranat i vretenast. Centralni koren dostiže dubinu do 150 cm, dok je najveća biomasa korena koncentrisana na dubini od 30 do 60 cm. Cvetovi paradajza su samooplodni i organizovani u vidu prostih ili složenih cvasti. U najvećem broju slučajeva cvet sadrži 6 kruničnih i 6 čašičnih listića. Iz metamorfoziranih delova cveta nakon oplodjenja nastaje plod. Plod paradajza je bobica čija veličina, oblik, boja i ukus zavise od genotipa i uslova gajenja. Izgrađen je od perikarpa, placente i semenih komora u kojima se nalazi sitno i spljošteno seme sa debelom semenjačom koju prekrivaju sitne dlačice (Jones, 2007).

Paradajz ima širok areal rasprostranjenosti. S obzirom da je poreklom tropska biljka zahteva dosta toplote, svetlosti i vlage. Najbolje uspeva u predelima gde je prosečna dnevna temperatura iznad 15 °C tokom 150 dana u godini. Optimalna dnevna temperatura za biljke je od 20 do 25 °C, dok je noćna od 13 do 17 °C. Minimalna temperatura potrebna za klijanje semena je 10 °C, dok pri temperaturi ispod 15 °C i iznad 35 °C prestaje da cveta. Rast paradajza se zaustavlja ukoliko je temperatura padne ispod 9 °C. Pored temperature biljka zahteva i dosta svetlosti, posebno u fazi rasade. Najkraće vreme fotoperioda za cvetanje i zametanje plodova je između 9 i 10 h, dok optimalno iznosi između 12 i 16 h pri aktivnoj radijaciji od 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Schwarz i sar., 2014). U uslovima smanjene osvetljenosti izraženo je smanje kvaliteta plodova u vidu koncentracije šećera i vitamina C. Optimalna relativna vlažnost vazduha za rast i razviće paradajza se kreće od 50 do 60%, dok je optimalna vlažnost zemljišta oko 70 %. Paradajz uspeva na raznovrsnim tipovima zemljišta. Tolerantan je na blagu zaslanjenost do 640 mg soli/L i podnosi širok raspon pH vrednosti zemljišta od 5.5 do 7.9.

Suša je jedan od najznačajnijih faktora koji utiču na prinos paradajza, naročito kada se biljka nalazi u fazi cvetanja i formiranja plodova. Vodni deficit u navedenim fazama razvića indukuje apscisiju cvetova i smanjuje broj formiranih plodova, usled čega dolazi do redukcije prinosa i smanjenja kvaliteta plodova. Nedostatak vode utiče na većinu fizioloških procesa kao što su elongacija i deoba ćelija, reakcije stoma, aktivaciju hormona i enzima dok je proces rasta i razvića listova najosetljiviji na pojavu vodnog deficita (Zhou i sar., 2017). Kako bi preživele stres suše, biljke paradajza pokreću niz mehanizama za adaptaciju na stres. Ovi mehanizmi uključuju različite molekularne, fiziološke i metaboličke procese kao i različite morfološke adaptacije. Odgovor biljke na nedostatak vode zavisi od genotipa, tipa zemljišta, faze razvića biljke, intenziteta i trajanja suše. U uslovima suše opada turgor i vodni potencijal, što dovodi do akumulacije ABA koja izaziva zatvaranje stoma, što dovodi do smanjenog usvajanja CO₂ i intenziteta fotosinteze. Ovi procesi dalje indukuju smanjenje rasta listova sa ciljem da se sačuva neophodna voda za normalno odvijanje fizioloških procesa (Bharath i sar. 2021; Zahao i sar., 2015). Zbog velike osetljivosti paradajza na sušu, u brojnim zemljama gde se uzgaja, neophodno je navodnjavanje kako bi se ostvario optimalan prinos. Dosadašnja istraživanja su dokazala da se primenom mikroorganizama može povećati efikasnost korišćenja vode biljaka, a samim tim i smanjiti količina potrebne vode za navodnjavanje. S obzirom da se paradajz gaji na najvećoj površini od svih povrtarskih kultura primenom mikroorganizama može se napraviti značajna

ušteda vode, što je pored ekonomskog značaja od posebne važnosti i zbog efekata klimatskih promena.

***CILJEVI
ISTRAŽIVANJA***

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Intenzivna istraživanja gljiva roda *Trichoderma* aktuelna su od sredine dvadesetog veka, međutim molekularni i fiziološki mehanizmi interakcije biljka - *Trichoderma* nisu još uvek dovoljno razjašnjeni.

Glavni naučni cilj istraživanja u okviru ove teze je definisanje molekularno-fizioloških pokazatelja pozitivnog odgovora biljaka na primenu gljiva iz roda *Trichoderma*, proučavanjem biohemijskih, morfo-fizioloških i molekularnih parametara. Da bi se ostvario glavni cilj istraživanja definisani su sledeći specifični ciljevi:

1. Izbor izolata gljiva roda *Trichoderma* iz kolekcije Fakulteta ekološke poljoprivrede, Univerziteta Edukons u Sremskoj Kamenici.
2. Proučavanje brzih odgovora biljke (do 48h) i interakcije *Trichoderma* - paradajz, kako bi se bolje razumeli signalni mehanizmi. U okviru brzih odgovora ispitivan je uticaj gljiva iz roda *Trichoderma* na:
 - *in vitro* stimulaciju klijavosti semena paradajza,
 - biohemijske promene i promene funkcionalnih grupa jedinjenja u ćelijskom zidu radikula semena paradajza (korišćena metoda: infracrvena spektrometrija sa Furijevom transformacijom),
 - biljke paradajza u uslovima smanjene snabdevenosti vodom (korišćene metode: ELISA test za ABA, određivanje sadržaj vode u zemljištu, merenje stomatalne provodljivosti i vodnog potencijala listova, određivanje sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeksa balansa azota).
3. Procena i razumevanje dugoročnih efekata gljiva roda *Trichoderma* na procese rastjenja i kvaliteta ploda paradajza. U okviru dugoročnih odgovora ispitivan je uticaj gljiva iz roda *Trichoderma* na:
 - biohemijske i morfo-fiziološke parametre paradajza u uslovima stresa suše (korišćene metode: automatska platforma za fenotipizaciju koja prati morfološke parametre, parametre fluorescencije hlorofila i parametre spektralne refleksije. Pored platforme dodatno je korišćena oprema uz pomoć koje su merenii parametri razmene gasova, fluorescencija hlorofila, fotosintetički pigmenti i osmotski potencijal i temperatura listova biljaka),
 - molekularne mehanizme odgovora biljaka (korišćene metode: izolacija RNK, praćenje ekspresije gena (*PR1b1* - signalni put salicilne kiseline; *PINII* - signalni put jasmonske kiseline; *NCED1* - sinteza ABA; *SIJAF13* - sinteza antocijana; *TPX1* - sinteza lignina i suberin; *FLS* - sinteza flavonoida; *C3H* - sinteza hlorogenske kiseline; aktin - endogena kontrola) primenom qRT-PCR, dok su ABA i fenolna jedinjenja određena upotrebom LC-MS-MS tehnike),
 - biohemijske, morfo-fiziološke i agronomske parametre paradajza gajenog u plasteniku (korišćene metode: hemijska analiza zemljišta, analiza biohemijskih, morfoloških i fizioloških parametara biljaka kao i analiza kvaliteta ploda sprovedene su uz pomoć atomske apsorpcione spektrofotometrije).

Očekuje se da će rezultati iz ove disertacije imati doprinos u rasvetljavanju mehanizama interakcije između biljaka i gljiva roda *Trichoderma*.

MATERIJAL I
METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Za istraživanja, kao eksperimentalni materijal, izabrane su tri sorte paradajza (*Solanum lycopersicum* L.): gruzanski zlatni, narvik i ailsa craig.

Gružanski zlatni i narvik su dve srednje kasne sorte paradajza. Odabrane su za istraživanja, jer se često koriste i za industrijsku proizvodnju i za tržišnu upotrebu, zbog dobrog kvaliteta ploda i otpornosti na bolesti. Sorta gruzanski zlatni je otporan na *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *Verticillium albo-atrum*, kao i na *Phytophthora infestans*, dok je narvik otporan na *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* i *Verticillium albo-atrum*. ailsa craig je rana sorta paradajza, koja se uzgaja više od 100 godina. Zbog lakoće genetičkih transformacija na ovoj sorti paradajza sproveden je veliki broj istraživanja (Schwarz i sar., 2014).

3.2. Metode primenjene u ispitivanje uticaja gljiva iz roda *Trichoderma* na klijanje semena paradajza

3.2.1. Uslovi gajenja

Uticaj gljiva iz roda *Trichoderma* na klijanje semena paradajza ispitan je na dve sorte paradajza: gruzanski zlatni i narvik. Semena paradajza su sterilisana u 2 % NaClO u trajanju od 20 minuta, nakon čega su ispirana destilovanom vodom. Semena su potom naklijavana u Petri posudama (Ø 15 cm) na hranljivoj podlozi 0.5 x Murashige & Skoog (MS). Gljive iz roda *Trichoderma*, stare četiri dana, presejane su sa PDA podloga (krompir dekstrozni agar) u Petri posude sa MS podlogama, kako bi rasli u kokulturi sa semenom paradajza. Semena su potom inkubirana u mraku, u termostatskoj komori, na temperaturi od 25 °C. Ispitivan je uticaj pet različitih vrsta gljiva (Tabela 2), kako bi se sagledao njihov uticaj na klijanje semena paradajza. Uticaj različitih vrsta *Trichoderma* na klijanje semena na MS podlogama (Slika 4) ispitan je nakon 48 h, dok još nije ostvaren fizički kontakt između gljiva i semena paradajza. Istraživanja su sprovedena sa više od 10000 semena paradajza (5000 semena paradajza gruzanski zlatni i 5000 semena paradajza narvik).

Tabela 2. Izolati gljiva *Trichoderma* korišćeni za *in vitro* istraživanje stimulacije klijanja semena paradajza

Vrsta	Br. izolata u SZMC kolekciji
<i>T. harzianum</i>	SZMC 20660
<i>T. brevicompactum</i>	SZMC 22661
<i>T. virens</i>	SZMC 22659
<i>T. longibrachiatum</i>	SZMC 22664
<i>T. citrinoviride</i>	SZMC 22668



Slika 4. Klijanci semena paradajza gružanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* 48 h posle nanošenja na MS hranjivu podlogu.

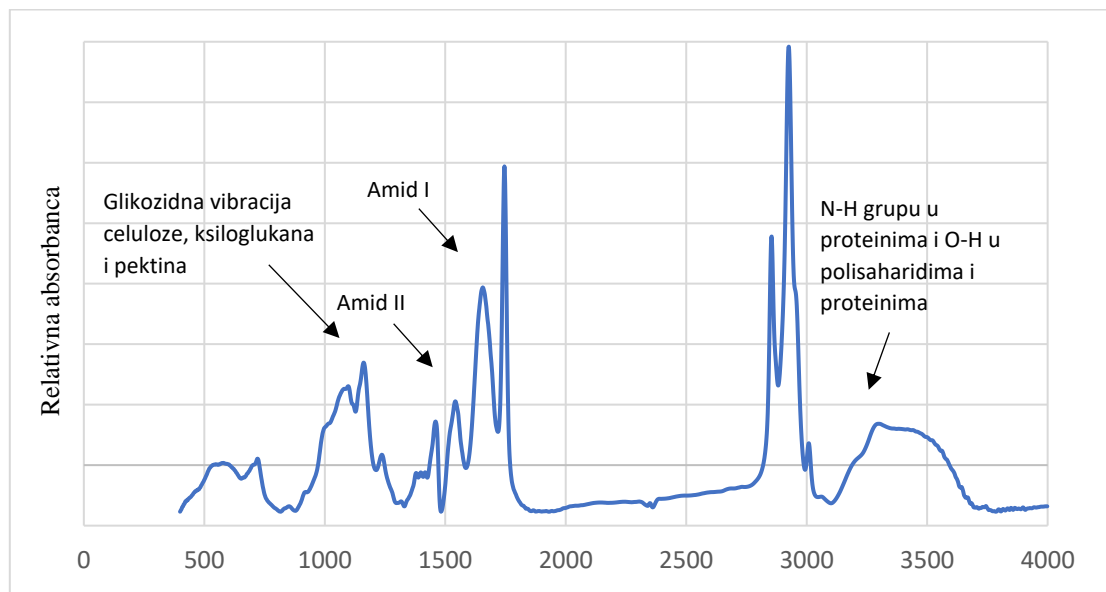
3.2.2. FTIR spektroskopija za određivanje biohemijskih promena i promena funkcionalnih grupa jedinjenja u ćelijskom zidu

Infracrvena spektrometrija sa Furijevom transformacijom (FTIR) je vibraciona metoda koja koristi upadno zračenje široke oblasti spektra. Frekvencija vibracionog kretanja hemijskih grupa jedinjenja se nalazi u infracrvenoj oblasti spektra. Tokom interakcije sa uzorkom upadno infracrveno zračenje pobuđuje vibracione modove što dovodi do razmene energija. Nakon interakcije smanjen je intenzitet reflektovanog spektra na talasnim dužinama koje je uzorak apsorbovao. Oduzimanjem spektra reflektovanog zračenja od spektra referentnog zračenja dobija se apsorpcioni spektar (Griffiths, 1975).

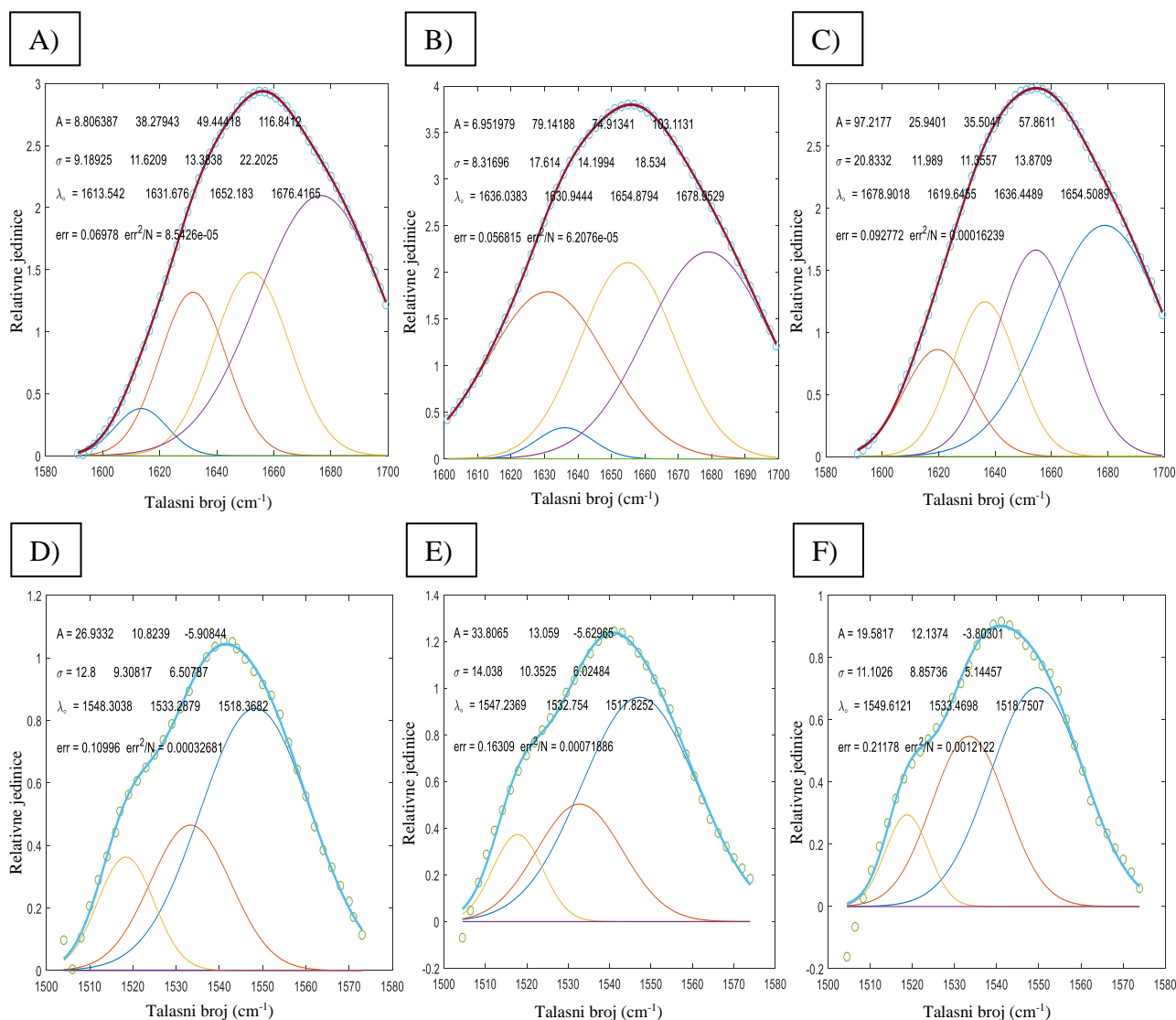
Uticaj gljiva roda *Trichoderma* na klijanje semena paradajza sprovedeno je primenom FTIR spektrofotometra (IRAffinity-1, Shimadzu, Japan), kako bi se okarakterisale biohemijske promene i promene funkcionalnih grupa jedinjenja u ćelijskom zidu radikula semena paradajza. Radikule semena sorti paradajza gružanski zlatni i narvik koje su rasle u kontrolnim uslovima kao i u kokulturi sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* prikupljena su sa MS podloga. Radikule dužine ~ 4 mm su sušene na 60 °C pet dana, nakon čega su usitnjene. Prikupljeno je 250 mg suvog materijala, odnosno po 1530 radikula od svakog tretmana. Analiza uzoraka je sprovedena pri rezoluciji od 4 cm⁻¹ u opsegu talasnih dužina 4000-600 cm⁻¹ primenom tehnike KBr tableta (1 mg uzorka u 200 mg KBr). Primer FTIR spektra prikazan je na Slici 5.

Detekcija razlika u strukturnoj organizaciji ili konformaciji proteina u radikulama semena paradajza izvršena je na osnovu delova spektra kod kojih je rađena dekonvolucija proteinskih traka normiranih na jediničnu površinu (Slika 6). Analiza je sprovedena pomoću Gausovog modela za dekonvoluciju, četvorokomponentni za Amid I traku i trokomponentni za Amid II traku uz pomoć softvera Matlab 6.5 (R2010a). Udeo α heliksa, β nabrane ravni i zaokreta u strukturi proteina je određivan kao procentualni udeo površine komponenti dobijenih dekonvolucijom i koje odgovaraju ovim strukturama u površini cele trake Amid I, dok je udeo uređene i neuređene strukture u proteinima

određivan kao procentualni udeo površine odgovarajućih komponenti u površini trake Amid II, s tim što je površina trake uzimana kao 100 %.



Slika 5. FTIR spektar kontrolnog uzorka usitnjenih radikula semena paradajza gružanski zlatni.



Slika 6. Primeri dekonvolucije Amid I trake (A, B i C) i Amid II trake (D, E i F) FTIR spektra za radikule paradajza: gružanski zlatni kontrola (A, D), gružanski zlatni u kokulturi sa *T. harzianum* (B, E), gružanski zlatni u kokulturi sa *T. brevicompactum* (C, F).

3.2.3. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) za mikroanalizu poprečnog preseku radikula semena paradajza

Snimanje površine epidermisa i poprečnog preseka radikule semena paradajza sprovedeno je skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). SEM (Tescan Vega TS 5130MM, Češka Republika) sa BSE detektorom (*engl.* back-scattered electrons, povratno rasuti elektroni) i EDS sistemom (energiodisperziona spektroskopija), ("INCAPentaFETx-3" detektor, Oxford Instruments, UK). Za sprovođenje analize uzoraka uređaj koristi snop visokoenergetskih elektrona, koji bombarduju površinu uzorka što dovodi do pojava sekundarne emisije elektrona. Detektor registruje snop odbijenih elektrona od površine uzorka i oblikuje se slika.

Primenom SEM-a analizirano je da li dolazi do morfoloških promena radikulama semena i da li dolazi do njihovog fizičkog kontakta sa gljivom. Pripremljeni uzorci su posmatrani pod uveličanjima od 200x, 500x, 1000x, 2000x i 5000x, pri naponu snopa od 20 kV.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Kako bi se odredile statistički značajne razlike ($p < 0.05$) u brzini klijanja semena paradajza u kokulturi sa gljivama *Trichoderma* spp. korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey-ovim Post Hoc testom. Analiza je sprovedena uz pomoć programa GraphPad Prism verzija 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3.3. Metode primenjene u ispitivanju ranih reakcija biljaka na interakciju sa gljivama roda *Trichoderma* u uslovima smanjene snabdevenosti vodom

3.3.1. Uslovi gajenja

Biljke paradajza (*Solanum lycopersicum* Mill. cv. ailsa craig) gajene su u fitotronskejoj komori u kontrolisanim uslovima (Slika 7). Intenzitet svetlosti je iznosio $250 \mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sa fotoperiodom od 14 h. Dnevna temperatura je bila $23 \text{ }^\circ\text{C}$, noćna $17 \text{ }^\circ\text{C}$, a relativna vlažnost vazduha je održavana na 60 %. Mlade biljke su optimalno zalivane (75 % sadržaja vode u zemljištu) do pojave četiri lista, nakon čega su uvedena dva faktora: prestanak zalivanja biljaka i *Trichoderma brevicompactum*. Primenjeni su sledeći tretmani: optimalno zalivanje (K), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (K_T), prestanak zalivanja (S), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (S_T).



Slika 7. Izgled biljaka u fitotronskejoj komori tokom eksperimenta.

3.3.2. Priprema suspenzije gljiva

Izolat gljive *Trichoderma brevicompactum* SZMC 22661, je pre pripreme suspenzije, inkubiran četiri dana na PDA podlogama u mraku na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Kolonije čiste kulture su skinute ezom iz Petrijeve posude i suspendovane u 100 mL vode. Reagens boce, sa suspenzijom spora gljiva, postavljene su u šejker

(TalBoys, Kingwood, Houston, TX, USA) i mešane 2 h pri brzini od 50 rpm. Broj spora gljiva izbrojan uz pomoć hemocitometra. Podešena je gustina suspenzije koja je iznosila 8×10^6 CFU/mL i koja je primenjena u zoni korena biljke. Zapremina inokulata kojim su biljke tretirane iznosila je 5 mL.

3.3.3. Određivanje sadržaja vode u zemljištu

Sadržaj vode u zemljištu (SWC) meren je na dubini od 6 cm pomoću Theta probe (Delta-T, Cambridge, U.K). SWC je praćen je u vremenskom intervalu od 2 h do 48 h (2 h, 6 h, 24 h, 48 h) nakon aplikacije *T. brevicompactum*.

Sadržaj vode u zemljištu meren je u svim saksijama tokom trajanja oglada i izražen je kao srednja vrednost za svaki tretman.

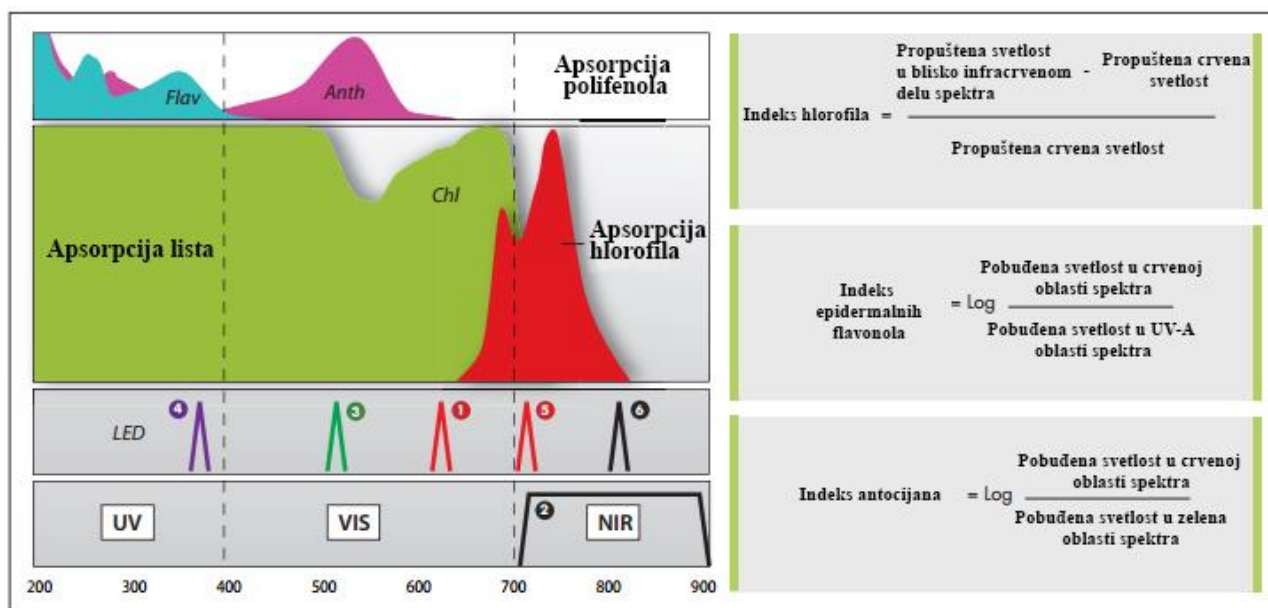
3.3.4. *In vivo* merenje sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeksa balansa azota

Sadržaj hlorofila (Chl), epidermalnih flavonola (Flav), antocijanina (Ant) i indeks balansa azota (NBI) u listovima paradajza mereni su *in vivo* nedestruktivnom metodom, primenom Dualex Scientific senzora (Force-A, France). Ispitivani parametri su određeni merenjem apsorbance epidermisa lista u VIS (vidljivom delu spektra, 650 nm), NIR (blisko infracrvenom delu spektra, 710 nm) i UV-A (ultraljubičastom delu spektra, 375 nm) (Cerovic i sar., 2012). Sadržaj hlorofila je izmeren na osnovu razlike transmisije na dve talasne dužine 650 nm i 710 nm. Sadržaj epidermalnih flavonola i antocijanina je određen iz diferencijalnog odnosa fluorescencije hlorofila, poređenjem vrednosti absorbancija na 375 nm i 650 nm, dok indeks balansa azota predstavlja odnos Chl/Flav.

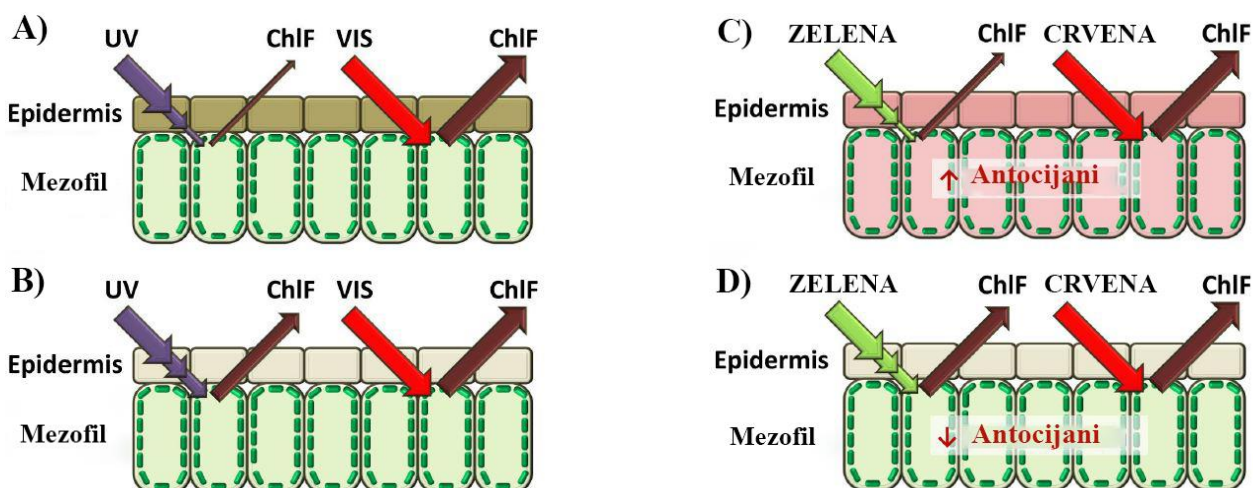
Obzirom da je epidermalni sloj lista bogat polifenolima, a mezofilni sloj lista bogatiji hlorofilom, razlika u fluorescenciji hlorofila izmerena u blisko-crvenoj oblasti je direktna mera sadržaja polifenola u listovima. Odnos pobuđene crvene svetlosti i zelene pobuđene svetlosti predstavlja indikator za sadržaj antocijana (Slika 8 i Slika 9). Na aparatu se direktno očitavaju indeksi za sva tri pigmenta, a dobijene vrednosti ukazuju na nivo stresa kojem je biljka bila izložena.

Merenja su obavljana na uniformnim i potpuno razvijenim mladim listovima paradajza 2 h, 6 h, 24 h i 48 h nakon inokulacije *T. brevicompactum*.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost sedam bioloških i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.



Slika 8. Šematski prikaz talasnih dužina emitovanih od strane Dualex i Multiplex senzora koje služe za određivanje sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijanina i indeksa balansa azota u listovima biljaka.



Slika 9. Šematski prikaz adaksijalnog dela poprečnog preseka lista koji ilustruje princip metode fluorescencije hlorofila (ChlF) za procenu sadržaja jedinjenja koja apsorbuju UV zrake u uzorku sa visokom A) i niskom B) koncentracijom epidermalnih flavonoida kao i visokom C) i niskom D) koncentracijom antocijana (Syta i sar., 2016). Debljina strelica ukazuje na relativni intenzitet.

3.3.5. Merenje provodljivosti stoma (G_s)

Provodljivost stoma (G_s) je merena na potpuno razvijenim mladim listovima pomoću porometra (AP4, Delta-T, Cambridge, U.K). Aparat meri difuznu provodljivost vodene pare koja se oslobađa kroz stomine ćelije tokom procesa transpiracije, što se prevodi u G_s čija je vrednost izražena su u $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Provodljivost stoma merena je 2 h, 6 h, 24 h i 48 h od momenta aplikacije *T. brevicompactum*. Merenja su obavljena na tri uniforma i potpuno razvijena mlada lista po biljci.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost sedam bioloških i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.3.6. Merenje vodnog potencijal listova (Ψ_{H_2O})

Vodni potencijal listova (Ψ_{H_2O}) je određen primenom komore pod pritiskom gasa azota (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, CA, USA) po metodi Scholander et al. (1965). Metoda se zasniva na istiskivanju ksilemskog soka iz listova koji se nalaze u komori, posredstvom pritiska gasa azota, pri čemu pritisak koji dovede do pojave prvih kapi ksilemskog soka na poprečnom preseku lisne drške predstavlja Ψ_{H_2O} čija je vrednost izražena u -MPa.

Ψ_{H_2O} listova meren je 2 h, 6 h, 24 h i 48 h nakon inokulacije *T. brevicompactum*. Merenja su obavljena na tri uniforma i potpuno razvijena mlada lista po biljci.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri biološka ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.3.7. Određivanje koncentracije apscisinske kiseline (ABA) u listu i korenu

Ekstrakcija uzoraka je urađena iz usitnjenog biljnog materijala zamrznutog u tečnom azotu. Odmereno je 100 mg biljnog tkiva i izmešano sa 1 mL destilovane vode i 2 % polivinilpirolidonom (PVP40). U cilju sprečavanja nastanka nespecifične reakcije antitela za apscisinsku kiselinu, sa drugim jedinjenjima, biljno tkivo je kratko prokuvano u vodi, a potom prebačeno u termomešalicu (Thermomixer comfort, Eppendorf) gde je nastavljeno mućkanje uzoraka u mraku u trajanju od 16 h pri temperaturi od 4 °C. Uzorci se potom prebačeni u centrifugu, gde su centrifugirani 5 minuta, na temperaturi od 4 °C i brzini od 14000 obr./min (Sigma 2- 16K, Germany). Izdvojen supernatant je upotrebljen da se naprave odgovarajuća razblaženja potrebna za dalju analizu.

Sadržaj apscisinske kiseline (ABA) u ekstraktima iz lista i korena određen je ELISA testom (Tecan, Sunrise, Švajcarska) primenom MAC 252 monoklonskog antitela za ABA (Asch, 2000). Nakon imunološke reakcije, gde je došlo do vezivanja antitela MAC 252 za enzim koji je obeležen sekundarnim antitelom AntiRat IgG, vrši se bojenje dodavanjem supstrata p-nitro-fenil-fosfata. Apsorbanca rastvora je obrnuto proporcionalna koncentraciji ABA. Absorbanca rastvora je merena na ELISA čitaču na 405 nm, a koncentracija ABA je izračunata preko standardne kalibracione krive. Standardna kriva se određuje na osnovu serije merenja standardnih rastvora poznatih koncentracija ABA.

Koncentracija ABA praćena je 2 h, 6 h, 24 h i 48 h nakon inokulacije *T. brevicompactum*. U svakom vremenskom intervalu, za određivanje ABA, prikupljeni su listovi sa tri biljke, za jedno biološko ponavljanje iz svakog tretmana.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri biološka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.3.8. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey-evim Post Hoc testom opisanom u poglavlju 3.2.4.

3.4. Ispitivanje uticaja gljiva roda *Trichoderma* na biohemijske i morfo-fiziološke parametre paradajza u uslovima smanjene snabdevenosti vodom primenom platforme za fenotipizaciju

3.4.1. Uslovi gajenja

Semena paradajza sorte gruzanski zlatni zasejana su u plastične kontejnere malih dimenzija i gajena su u klima komori pod optimalnim uslovima (75 % sadržaja vode u zemljištu (SWC); fotoperiod 14 h; relativna vlažnost vazduha 60 %; intenzitet svetlosti 250 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$; dnevna temperatura 25 °C; temperatura tokom noći 17 °C). Biljke su uzgajane na komercijalnom supstratu TS-2 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany) sledećeg sastava: pH 6.0, N - 280 mg/L, P₂O₅ - 200 mg/L, K₂O - 360 mg/L, Mg - 100 mg/L.

Nakon tri nedelje, kada su biljke bile u fazi dva listića, presađene su u saksije od 2 L i postavljene su na platformu za fenotipizaciju biljaka, Slovačkog poljoprivrednog Univerziteta u Nitri (PSI, Drásov, Czech Republic) (Slika 10). Sve sadnice (ukupno 108) su bile fiksirane pomoću pritki kako bi se formiralo uspravno stablo. Platforma za fenotipizaciju je obezbedila ujednačene i optimalne uslove za sve biljke. Biljke su gajene pri intenzitetu svetlosti od 700 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiod je trajao 14 h, relativna dnevna vlažnost vazduha iznosila je 40 %, a tokom noći 50 %. Koncentracija CO₂ iznosila je 300 ppm. Temperatura u toku dana bila je 25 °C, a tokom noći 17 °C.

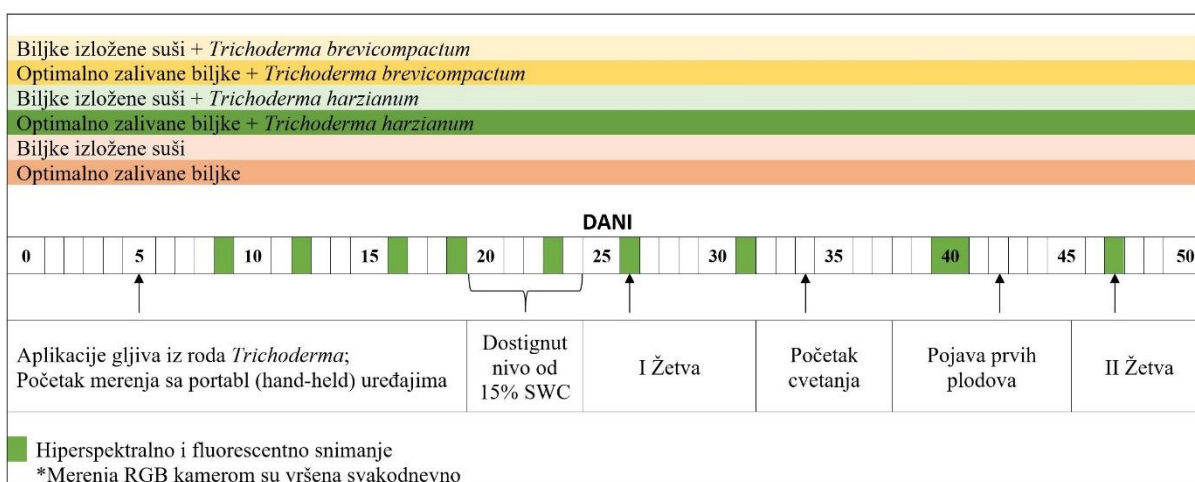
Period adaptacije je trajao pet dana. Kada su biljke bile u fazi tri listića, peti dan od momenta prebacivanja biljaka na platformu za fenotipizaciju, uvedena su dva režima zalivanja, u kombinaciji sa aplikacijom dve vrste gljiva roda *Trichoderma*. Primenjeni režimi automatskog zalivanja kojima su biljke podvrgnute bili su: optimalno zalivanje do 70 % SWC i suša do 15 % SWC (Slika 11). Svaki tretman imao je tri kombinacije: bez dodatka gljive, sa dodatkom gljive *T. harzianum* i sa dodatkom gljive *T. brevicompactum*. Nivo od 15 % SWC dostignut je između 16 i 20 dana od momenta aplikacije gljiva iz roda *Trichoderma* (Slika 11 i Slika 12a).

Kombinacijom dva režima zalivanja i dve vrste gljiva roda *Trichoderma* dobijeno je ukupno šest tretmana (C - optimalno zalivane biljke, D - biljke izložene suši, C_T1 - optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum*, C_T2 - optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum*, D_T1 - biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* i D_T2 - biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum*) (Slika 12). Saksije sa biljkama u različitim tretmanima su bile nasumično raspoređene na platformi za fenotipizaciju i njihov položaj je menjan tokom ogleđa (jednom nedeljno) kako bi se izbegao uticaj neuniformnih uslova gajenja tzv. ivični efekat (pre svega intenziteta osvetljenja, temperature i vlažnosti vazduha). Istraživanja su sprovedena na ukupno 90 biljaka (15 biljaka po tretmanu), dok se na platformi nalazilo još 18 rezervnih biljaka.

Istog dana kada je izvršena aplikacija gljiva *T. harzianum* i *T. brevicompactum* započeta su merenja.



Slika 10. Klijanci postavljeni na platformu za fenotipizaciju.



Slika 11. Šematski prikaz eksperimenta po danima.

Pet dana nakon prebacivanja biljaka na platformu za fenotipizaciju izvršena je inokulacija gljiva *T. harzianum* i *T. brevicompactum* dodavanjem 5 mL suspenzije u zonu korena biljke, a za kontrolu je dodata ista zapremina vode. Istog dana započeta su merenja sa portabl (hand-held) uređajima, dok je biljkama predodređenim za tretman suše uveden režim prestanka zalivanja sve dok nivo SWC nije opao na 15 %, koji je kasnije održavan do kraja ogleda. Merenja RGB kamerom sprovedena su svakodnevno od početka eksperimenta, dok je hiperspektralno i fluorescentno snimanje ukupno sprovedeno devet puta. Polovina biljaka sakupljena je 26-og dana za vreme I žetve kako bi se odredio sadržaj pigmenata, osmotski potencijal, sveža i suva masa podzemnih i nadzemnih delova biljaka. Ostatak biljaka prikupljen je 47-og dana za vreme II žetve kako bi bile sprovedene iste analize.



Slika 12. Optimalno zalivane biljke (biljka br 36) i biljke podvrgnute suši (biljke br 56 i 59) u trenutku kada je dostignut nivo od 15 % SWC (20 dan) (A), biljke u fazi cvetanja i formiranja plodova (B), formirani plodovi kod biljaka podvrgnutih suši u tretmanu sa *T. brevicompactum* (C), formirani plodovi kod optimalno zalivane biljaka u tretmanu sa *T. harzianum* (D).

3.4.2. Priprema suspenzije gljiva

Priprema suspenzije izolata gljiva je opisana u poglavlju 3.3.2. U ovom ogledu korišćene su dve vrste gljiva *T. harzianum* SZMC 20660 i *T. brevicompactum* SZMC 22661.

3.4.3. Mikrobiološka analiza zemljišta

Ispitivanje mikrobnog diverziteta obavljeno je na standardnim mikrobiološkim podlogama metodom razređenja i nakupljanja (Pepper i sar., 1995). Sve podloge su sterilisane u autoklavu (Fedegari FVG2, Albuzzano, Italija) vodenom parom pod pritiskom od 1 atm i temperaturi od 121 °C. Razređenje uzoraka sprovedeno u sterilnoj vodi iz vodovoda. Određen je ukupan broj bakterija, amonifikatora, sporogenih bakterija i ukupan broj gljiva, nakon I i II žetve.

Ukupan broj bakterija određen je na 10 % tripton sojinom agaru (10 % TSA, Torlak, Srbija). Broj amonifikatora i sporogenih bakterija određen je na meso-peptonskom agaru (MPA, Torlak, Srbija), s tim što je pre zasejavanja inokulum odgovarajućeg razređenja sporogenih bakterija zagrevan 10 min na 80 °C. Ukupan broj gljiva određen je na roze bengal streptomycin agar hranljivoj podlozi (Pepper i sar., 1995).

3.4.4. Merenje fotosintetičke razmene gasova i fluorescencije hlorofila pomoću Li-6400XT

Fotosintetička aktivnost listova određena je pomoću mobilnog sistema Li-6400XT (LiCor, Lincoln, NE, USA) (Slika 13). Li-6400XT je otvoren sistem namenjen za nedestruktivne analize. Princip merenja fotosinteze i transpiracije zasnivaju se na razlici koncentracija CO₂ i H₂O tokom strujanja vazduha kroz komoru tj. kivetu u kojoj se nalazi list koji vrši fotosintezu i transpiraciju. Digitalnom kontrolom ventila dolazni tok vazduha se usmerava u kolone uz pomoć kojih se kontroliše i podešava koncentracija CO₂, vlažnost i temperatura vazduha. Vazduh sa podešenom vlažnošću, temperaturom i koncentracijom CO₂ dolazi do detektora koji registruje promene gasova koje nastaju usled fotosintetičke aktivnosti lista. U komori u kojoj je list osvetljen fotosintetičkom aktivnom radijacijom, dolazi do opadanja koncentracija CO₂ i porasta vlažnosti vazduha. Vazduh cirkuliše kroz komoru uz pomoć pumpe zahvaljujući kojoj se ponovo vraća u detektor gde se registruju oscilacije koncentracije CO₂ i vlažnosti vazduha koje se javljaju kao rezultat procesa fotosinteze lista. Pomoću softvera aparata upoređuju se razlike ulaznog i izlaznog vazduha na osnovu kojih se izračunavaju parametri razmene gasova i fluorescencije hlorofila prikazani u Tabeli 3. Brzina promene spomenutih parametara direktno zavisi od brzine fotosinteze i provodljivosti stoma lista.

Tabela 3. Parametri razmene gasova i fluorescencije hlorofila mereni primenom mobilnog sistema Li-6400XT.

Naziv parametra	Oznaka	Jedinica
Intenzitet transpiracije	E	mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹
Intenzitet fotosinteze	A	μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹
Intracelularna koncentracija CO ₂	Ci	μmol CO ₂ mol ⁻¹
Nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila	NPQ	/
Provodljivost stoma	Gs	mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹
Brzina linearnog elektronskog transporta kroz PS II	ETR	μmol m ⁻² s ⁻¹
Minimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila	F ₀	/
Maksimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila	F _m	/
Maksimalan kvantni prinos fotohemije fotosistema II	F _v /F _m	/
Trenutna efikasnost korišćenja vode	WUE	μmol CO ₂ mmol ⁻¹ H ₂ O
Unutrašnja efikasnost korišćenja vode	WUEi	μmol CO ₂ mol ⁻¹ H ₂ O
Efikasnost karboksilacije	A/Ci	/

Obrasci za izračunavanje:

$$F_v/F_m = 1 - F_0/F_m$$

$$NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$$

$$WUE = A/E$$

$$WUE_i = A/g_s$$

Merenje pomenutih parametara vršeno je na svim biljkama i to na najmlađem potpuno razvijenom intaktnom listu. Merenja su sprovedena 21, 22, 23, 41 i 44-og dana u vremenskom intervalu od 10 h do 15 h. Snimanje je vršeno na listovima koji nisu bili pre-adaptirani u mraku, uslovi merenja su bili sledeći: ekvibraciono vreme 2-3 min; fotosintetička aktivna radijacija 1000 μmol m⁻² s⁻¹ (90% crvena led i 10 % plava led svetlost); koncentracija CO₂ unutar komore 400 ppm; relativna vlažnost vazduha 40-50 %; temperatura kivete 26 °C (Zivcak et al., 2013).

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest (nakon I žetve sedam) bioloških ponavljanja po svakom tretmanu ± SD.



Slika 13. Merenje razmene gasova i fluorescencije hlorofila pomoću portabl aparata Li-6400XT.

3.4.5. Merenje fotosintetičkih parametara primenom MultispeQ V2.0

Merenja fotosintetičkih parametara su sprovedena 26 i 41-og dana, nedestruktivno, na svim biljkama i to na najmlađem potpuno razvijenom intaktnom listu. Merenje je vršeno primenom portabl aparata MultispeQ V2.0 (PhotosynQ LLC, East Lansing, MI). Aparat predstavlja kombinaciju merača hlorofila, fluorimetra i spektrofotometra objedinjenih u jedan uređaj koji je putem bluetooth-a povezan sa pametnim telefonom koji koristi aplikaciju PhotosynQ u cilju lakše manipulacije podacima (Slika 14). Snimanje je vršeno na listovima koji nisu bili pre-adaptirani u mraku. Merenje na jednom listu trajalo je 8 sekundi i tom prilikom izmereni su parametri prikazani u Tabeli 4.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest (nakon I žetve sedam) bioloških ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD

Tabela 4. Parametri fotosinteze i fluorescencije hlorofila mereni primenom portabl aparata MultispeQ V2.0

Naziv parametra	Oznaka
Elektrohromni pomeraj (mAU)	ECSt
Provodljivost protona	gH+
Linearni elektronski transport	LEF
Reakcioni centra fotosistema 1	PS1
Nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila	NPQ
Relativni sadržaj hlorofila	RC



Slika 14. Merenje parametara fotosinteze i fluorescencije hlorofila pomoću portabl aparata MultispeQ V2.0.

3.4.6. Merenje sadržaja hlorofila u listu i polifenola u epidermisu lista

Sadržaj hlorofila (SFR_G), epidermalnih flavonola (Flav), antocijanina (Anth_RG) i indeks balansa azota (NBI_G) u listovima paradajza mereni su *in vivo*, nedestruktivnom metodom, primenom portabl optičkog senzora Multiplex-3® (Force-A, Paris, France). Za razliku od Dualex senzora (opisano u poglavlju 3.3.4.), aparat vrši beskontaktno merenje pomenutih parametara sa udaljenosti od približno 10 cm od biljke, koliko iznosi i dijametar snimanja. Multiplex je opremljen sa četiri LED diode koje emituju UV (375 nm), plavi (470 nm), zeleni (516 nm) i crveni (635 nm) spekter svetlosti koji pobuđuju lisnu površinu (Ghozlen et al., 2010). Na osnovu refleksije epidermisa lista registruju se signali uz pomoć tri detektora za žuto, crveno i daleko crveno zračenje.

Merenja su obavljena na svim biljkama u četiri vremenska intervala. Prvo merenje sprovedeno je 2h pre početka inokulacije biljaka sa gljivama *Trichoderma*, dok su naredna merenja sprovedena 24 h, 48 h i 72 h nakon inokulacije sa gljivama roda *Trichoderma*.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest bioloških i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD

3.4.7. Ekstrakcija i određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata

Sveži uzorci sa potpuno razvijenih listova paradajza su prikupljeni nakon I žetve i dobro su usitnjeni i homogenizovani uz pomoć kvarcnog peska, $MgCO_3$ i 100 % acetona. Zatim je urađena ekstrakcija 80 % acetonom. Pripremljeni rastvor je cetrifugiran 2 minuta na 2500 rpm na sobnoj temperaturi. Zatim je i izmerena apsorbancija rastvora primenom UV-VIS spektrofotometra (Jenway, UK) na talasnim dužinama od 470, 647 i 663 nm sa korekcijom rasipanja merenom na 750 nm.

Koncentracija pigmenata u acetonskom rastvoru po jedinici lisne površine izmjerena je korišćenjem jednačine Lichtenthaler (1987), u modifikaciji Porra i sar., (1989):

$$Ca = 12.25 A_{663} - 2.79 A_{647} \text{ (mg/m}^2\text{)}$$

$$Cb = 21.50 A_{647} - 5.10 A_{663} \text{ (mg/m}^2\text{)}$$

$$Ca+b = 7.15 A_{663} + 18.71 A_{647} \text{ (mg/m}^2\text{)}$$

$$Cx+c = (1000 A_{470} - 1.82 Ca - 85.02 Cb) / 198 \text{ (mg/m}^2\text{)}$$

Ca – koncentracija hlorofila a;

Cb – koncentracija hlorofila b;

Ca+b – koncentracija hlorofila a + b;

Cx+c – sadržaj ukupnih karotenoida;

A – očitana apsorbanca na spektrofotometru;

1.82, 2.79 i 12.25 – molarni apsorpcioni koeficijenti hlorofila a na 470 nm, 647 nm i 663 nm;

5.10, 21.50 i 85.02 – molarni apsorpcioni koeficijenti hlorofila b na 663 nm, 647 nm i 470 nm;

7.15 i 18.71 – molarni apsorpcioni koeficijenti hlorofila a + b na 663 nm i 647 nm;

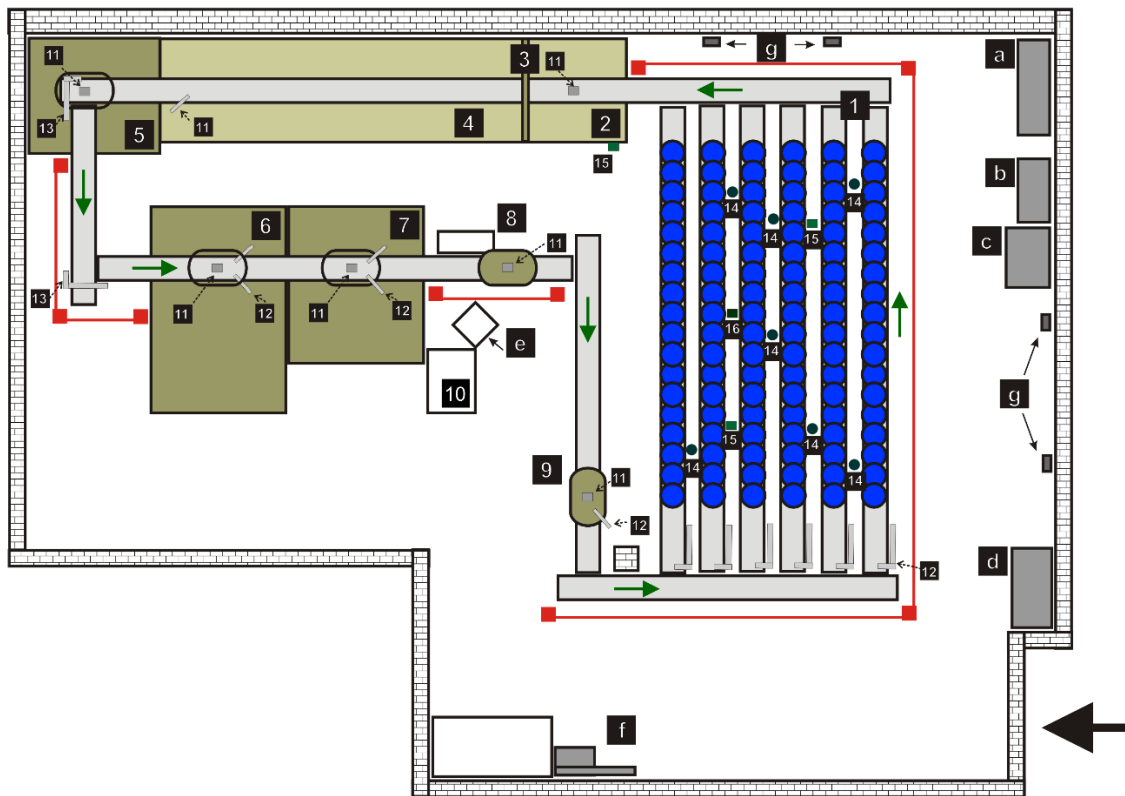
Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost osam bioloških i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD

3.4.8. Parametri koji su dobijeni na platformi za fenotipizaciju biljaka

Na platformu za fenotipizaciju biljaka Slovačkog poljoprivrednog Univerziteta u Nitri (PSI, Drásov, Czech Republic) može da se postavi ukupno 108 saksija zapremine 2 L. Platforma ima 6 pokretnih kaiševa od kojih svaki nosi po 18 saksija, na Slici 15. označeno je pod br. 1. Ukupna površina na kojoj se biljke uzgajaju iznosi 24 m². Platforma automatski omogućuje regulisanje uslova spoljašnje sredine. Moguće je precizno podešavati temperaturu, intenzitet osvetljenja, relativnu vlažnost vazduha, kao i koncentraciju CO₂. Takođe automatski se vrši i zalivanje biljaka. Maksimalna dozvoljena visina biljaka za neometano funkcionisanje platforme iznosi 120 cm.

Platforma za fenotipizaciju je opremljena sa pet optičkih senzora: RGB (*engl.* Red, Green, Blue) – za ugao snimanja od 90°, RGB – za snimanje različitih bočnih uglova, VNIR (vidljivi i bliski infracrveni region elektromagnetnog spektra), SWIR (kratko talasni bliski infracrveni region) sa senzorom za fluorescenciju hlorofila a. U sklopu platforme je i poluautomatski senzor za termalno snimanje.

Količina podataka koju je platforma prikupila tokom trajanja ogleda je 2.78 TB sa ukupno napravljenih 17010 fotografija.



Slika 15. Šematski prikaz platforme za fenotipizaciju biljaka.

1. Prostor za uzgajanje biljaka sa LED sistemom osvetljenja
 2. Komora za preadaptaciju biljaka
 3. Lasersko skeniranje QR koda biljaka
 4. Komora za adaptaciju biljaka sa LED sistemom osvetljenja
 5. Kamera za detekciju signala fluorescencije hlorofila
 6. RGB kamera
 7. Hiperspektralna kamera
 8. Jedinica za zalivanje i merenje mase
 9. Prostor za ručnu kontrolu biljaka
 10. Glavni računar sa bazom podataka
 11. TAG čitači
 12. Ručica za zaustavljanje saksija
 13. Jedinica za izvlačenje diskova koji se nalazi ispod saksije
 14. Senzor za fotosintetičku aktivnu radijaciju (FAR)
 15. Senzor za temperaturu i vlažnost vazduha
 16. CO₂ senzor
-
- a) Ormar sa FLIR sistemom
 - b) PLC - programabilni logički kontroler (*engl.* Programmable Logic Controller)
 - c) Kompresor za vazduh
 - d) Kabinet za kontrolu LED sistema osvetljenja
 - e) HMI - ljudsko mašinski interfejs (*engl.* Human Machine Interface) - kontrolna tabla
 - f) Sistem za osmozu vode
 - g) Ultrazvučni ovlaživač vazduha

3.4.8.1. Snimanja RGB kamerom

Biljke su svakodnevno snimane, tokom trajanja oglada, ukupno 47 dana. Snimanje je vršeno sa RGB kamerom rezolucije 2454 x 2056 piksela u vidljivom delu spektra (400–700 nm). Kamera je pozicionirana u komori za snimanje, dok su biljke automatski transportovane do nje (Slika 16a).

Dobijene slike su korišćene za analiziranje parametara rasta i vizuelno otkrivanje morfoloških promena, kao odgovor biljaka na sušu i dodatak suspenzije gljiva.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest (nakon I žetve sedam) bioloških ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD

3.4.8.2. Snimanje kamerom za detekciju signala fluorescencije hlorofila

Snimci fluorescencije hlorofila dobijeni su upotrebom visoko senzitivne kamere za detekciju signala fluorescencije CCD (400 – 1000 nm) u kombinaciji sa više nijansi svetlosti LED lampi (Slika 16c). Merenja su sprovedena sa dve vrste pobuđujuće (*engl.* actinic) svetlosti sa maksimalnim intenzitetom osvetljena $\geq 2.000 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Signal fluorescencija hlorofila ChlF sniman je nakon što su biljke bile pre-adaptirane u mraku u trajanju od 15 min.

Snimanja su vršena jednom nedeljno na svim biljkama i tom prilikom praćeni su sledeći parametri:

Fv/Fm - maksimalan kvantni prinos PS II u mraku;

NPQ - nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila;

QY_max - maksimalan kvantni prinos PS II u mraku;

qP_1ss - koeficijent fotohemijskog gašenja;

Qy_1ss - stvarna fotohemijska efikasnost;

Rfd_1ss – fluorescencije hlorofila u ravnotežnom stanju.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest (nakon I žetve sedam) bioloških ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.4.8.3. Hiperspektralne analize

Hiperspektralne kamere VNIR (vidljivi i bliski infracrveni region elektromagnetnog spektra) i SWIR (kratko talasni bliski infracrveni region) korištene su za automatsko snimanje svih biljaka jednom nedeljno tokom trajanja eksperimenta (Slika 16b).

Tehničke karakteristike VNIR kamere: spektralni opseg 340 - 900 nm, veličina opsega 400 nm, širina ulaznog proreza 25 μm , disperzija po pikselu 0.2 nm \times piksel⁻¹, rezolucija talasnih dužina FWHM 0,8 nm, detektor silicijuma, prostorna rezolucija 480 piksela, spektralna rezolucija 640 piksela, frekvencija slike 12 - 60 fps, dinamički opseg 68 db.

Kamera VNIR korišćena je za analizu spektra refleksije u vidljivom (VIS) i blisko infracrvenom (NIR) regionu (380-1000nm), kako bi se utvrdili efekti različitih tretmana na sledeće hiperspektralne indekse:

NDVI - vegetacijski indeks normalizovanih razlika (predstavlja pokazatelj zelene pokrivenosti i izračunava se na osnovu razlika između blisko infracrvene i vidljive refleksije);

Chl a - indeks refleksije hlorofila a;

ANTH – indeks antocijana;

CRI-1 - indeks refleksije karotenoida I;

CRI-2 - indeks refleksije karotenoida II;

MCARI1 - modifikovani indeks odnosa apsorpcije hlorofila I.

Tehničke karakteristike SWIR kamera: spektralni opseg 1.100 - 1.700 nm, veličina opsega 600 nm, širina ulaznog proreza 25 μm , disperzija po pikselu: 0.95 nm \times piksel-1, rezolucija talasnih dužina: 1.2 nm, detektor InGaAs, prostorna rezolucija 480 piksela, spektralna rezolucija 640 piksela, frekvencija slike 50 fps, bit dubina 16 bit (Sytar i sar., 2017).

SWIR kamera je korišćena prilikom analize spektra refleksije u kratkotalasnom blisko infracrvenom regionu (900-2500 nm). Analizirani su sledeći hiperspektralni indeksi:

SR4 - jednostavni indeks odnosa vode;

Water-1 - indeks refleksije čiste vode;

WI – indeks refleksije vode u zavisnosti od sadržaja vode u biljkama.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest (nakon I žetve sedam) bioloških ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.



Slika 16. Komora sa RGB kamerom i jedinica za zalivanje i merenje mase biljaka (A), komora sa hiperspektralnom kamerom (B), komora za snimanje fluorescencije hlorofila i tunel za adaptaciju biljaka (C).

3.4.9. Snimanje termalnom kamerom

Prvih pet dana nakon izvršene inokulacije sa gljivama roda *Trichoderma*, sve biljke su snimane, svaki dan, u vremenskom periodu od 13 h i 30 min do 14 h i 30 min. Nakon petog dana tretmana, sve biljke su snimane jednom nedeljno u istom vremenskom periodu. Snimanje je vršeno termalnom kamerom FLIR E60 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, SAD) (Slika 17).

Princip rada termalne kamera zasniva se na merenju infracrvenog zračenja emitovanog sa površine lista. Razlike u temperaturi lista javljaju se usled promena otvorenosti stoma. Preko stoma se odvija transpiracija, a u zavisnosti od njihove otvorenosti dolazi do hlađenja ili zagrevanja površine lista. Biljke koje imaju nižu temperaturu uglavnom imaju bolji korenov sistem i bolje su snabdevene vodom. Temperatura lista neposredno utiče na brzinu metabolizma biljaka preko koga je povezana sa ciklusom vode pri čemu utiče na protok CO₂ i H₂O, što je u direktnoj vezi sa rastom i razvojem biljaka.

Termalnom kamerom su dobijeni snimci rezolucije 320 x 240 piksela, a zahvaljujući infracrvenom detektoru od 60Hz temperatura je očitavana sa tačnošću od ± 0.05 °C. Talasna dužina lasera kamere iznosi 650 nm, a temperaturni opseg snimanja od -20 do 650 °C.

Termalna kamera je bila postavljena iznad trake za automatsko transportovanje biljaka. Ugao pod kojim su biljke snimane iznosio je 90 °. Sve fotografije napravljene su uz pomoć stativa sa udaljenosti od 60 cm od biljke. Ukupno je napravljeno 730 termalnih fotografija. Obrada podataka urađena je uz pomoć softvera FLIR Tools + v5.13 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, SAD).

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost petnaest (nakon I žetve sedam) bioloških ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD



Slika 17. Snimanje biljaka pomoću termalne kamere FLIR E60 (FLIR Systems, Inc., Wilsonville, Oregon, SAD).

3.4.10. Sveža i suva masa listova, stabla i korena

Sveže mase listova, stabla i korena izmerena su posle I žetve (nakon što je polovina biljaka uklonjena sa platforme) da bi posle II žetve bila izmerena i sveža masa preostalih biljaka. Kako bi se izmerila suva masa nadzemnih delova i korena, biljke su dobro osušene na 75 °C, a potom su mase izmerene na tehničkoj vagi.

3.4.11. Statistička obrada rezultata

Za statističku obradu rezultata korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey-evim Post Hoc testom, kako bi se odredile statistički značajne razlike ($p < 0.05$) između tretmana. Analiza je sprovedena uz pomoć programa RStudio®, verzija 3.6.2. (RStudio, Inc., Boston, MA) primenom paketa za vizuelizaciju i manipulaciju podataka: magrittr (verzija 1.5), tibble (verzija 3.0.3), dplyr (verzija 1.0.0), data.table (verzija 1.12.8), emmeans (verzija 1.4.8), ggplot2 (verzija 3.3.2).

3.5. Metode za ispitivanje molekularnih mehanizama odgovora paradajza na sušu i dodatak suspenzije gljiva roda *Trichoderma*

3.5.1. Uslovi gajenja

Uslovi gajenja biljaka i tretmani su opisani u poglavlju 3.4.1.

3.5.2. Određivanje ekspresije gena paradajza kao odgovor na sušu i dodatak suspenzije gljiva *T. harzianum* i *T. brevicompactum*

Za identifikaciju molekularnih mehanizama, kao odgovor biljaka na kombinaciju abiotičkog i biotičkog stresa, korišćene su biljke paradajza koje su gajene na platformi za fenotipizaciju. Listovi paradajza koji su prikupljeni tokom I žetve, zamrznuti su u tečnom azotu, a potom je urađena i liofilizacija uzoraka na temperaturi od $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod pritiskom od 0.13 mbar (Telstar LyoQuest HT-40, Beijer Electronics Products AB, Malmoe, Sweden).

Grupni uzorci su pripremljeni od uzoraka liofilizovanih listova sakupljenih sa 45 biljaka paradajza. Napravljeno je 18 grupnih uzoraka, tako da su se u svakom tretmanu (šest tretmana) nalazila po 3 grupna uzorka. Grupni uzorci su imali od 2 do 3 replikata.

Izolacija RNK je sprovedena uz pomoć komercijalnog seta za ekstrakciju Sigma-Aldrich Kit, prema uputstvu proizvođača. Nakon izolovanja RNK, gDNK je uklonjena dodatkom DNA-aze, a provera integriteta izolovane RNK je izvršena elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (Slika 18). Jasno vidljivi fragmenti 18S i 28S rRNK pokazatelj su dobrog integriteta RNK. Koncentracija RNK je određena merenjem apsorbancije na 260 nm uz pomoć NanoVuePlus spektrofotometra (GE HealthCare LifeSciences, Engleska), dok je čistoća uzoraka procenjena iz odnosa apsorbancija: $A_{260/230}$, $A_{260/240}$ i $A_{260/280}$.



Slika 18. Elektroforeza odabranih uzoraka RNK na 1 % agaroznom gelu.

Od 1 µg ukupne RNK, upotrebom reverzne transkriptaze (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific), prema uputstvu proizvođača, sintetisana je cDNK uz pomoć Oligo (dT)₁₈ prajmera. Specifičnim prajmerima sprovedena je qRT-PCR amplifikacija (Tabela 5). Uzorci cDNK su za potrebe PCR-a razblaženi sa vodom u odnosu 1:5, reakcije su se odvijale u Light Scanner 32 sistemu (Idaho, USA) sa Kapa SYBR FAST qPCR Master Mix-om.

Za svaki grupni uzorak urađena je qRT-PCR amplifikacija u tri ponavljanja. Zapremina reakcionih smeša iznosila je 20 µl. Reakcije su se odvijale pod sledećim uslovima u aparatu:

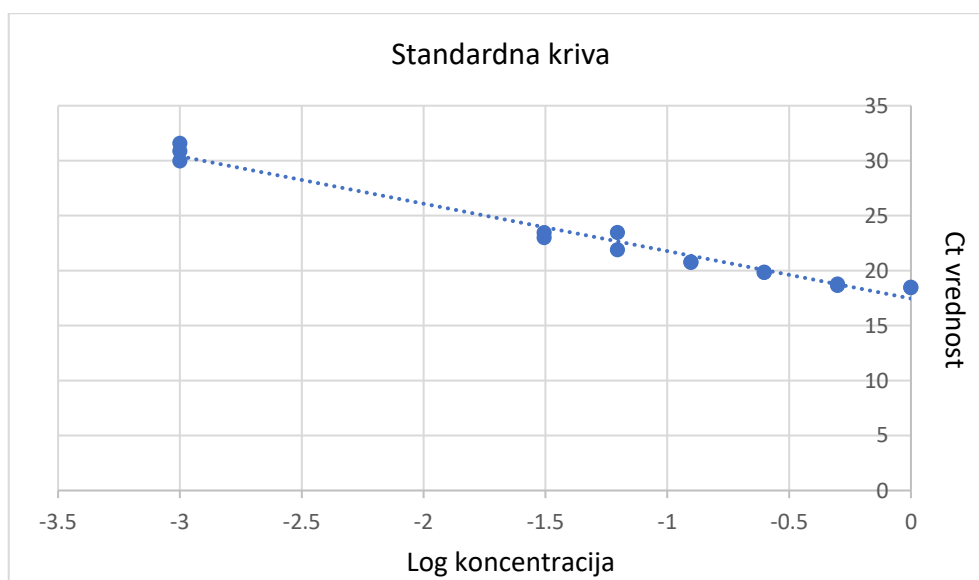
Inicijalna denaturacija	1 min	95 °C	} 30 ciklusa
Denaturacija	15 s	95 °C	
Hibridizacija	30 s	Temperature anilinga prikazane u Tabeli 5	
Elongacija	1 min 45 s	72 °C	
Finalna ekstenzija	10 min	72 °C	

Pre određivanja relativne ekspresije gena, prethodno je potrebno uraditi validaciju Real time PCR metode, računanjem efikasnosti PCR amplifikacije. Brzina stvaranja PCR produkta predstavlja efikasnost PCR amplifikacije (E). Izražava se u procentima i računa se preko nagiba standardne krive:

$$E = (10^{-1/\text{nagib st. krive}} - 1) \times 100$$

Validacija Real time PCR metode se ocenjuje kao pozitivna kada se vrednost efikasnosti PCR amplifikacije (E) kreće u opsegu od 90 % do 110 %, odnosno nagib standardne krive treba da se kreće od -3.6 do -3.1. Ukoliko je $E < 90\%$, nagib standardne krive je manji od -3.6 i u tom slučaju dolazi do loše reproducibilnosti rezultata između ponovljenih uzoraka. U slučaju kada je $E > 110\%$, nagib standardne krive je veći od -3.1 što ukazuje na loš kvalitet uzorka.

Da bi se izračunala efikasnost PCR produkta napravljen je jedan grupni uzorak svih ispitivanih cDNA, koji je potom razblažen u odnosu 1:20 i od njega su dade pripremljene serije razblaženja (koncentrovano, 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32) za svaki ispitivani gen. Sve vrednosti E ispitivanih gena kretale su se u optimalnom opsegu (Slika 19).



Slika 19. Primer standardne kriva za referenti gen aktin.
 Efikasnost PCR amplifikacije $E = 103\%$
 Nagib standardne krive -3.251

Računanje relativne ekspresije gena sprovedeno je primenom komparativne $\Delta\Delta Ct$ metode (Livak & Schmittgen, 2001). Kao endogena kontrola, referentni gen koji se ekspirira nezavisno od eksperimentalnih uslova, korišćen je aktin, dok kalibrator označava referentnu vrednost ciljnog gena konkretno u ovom slučaju predstavlja kontrolu za tretmane.

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

Pri čemu je:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{uzorka}} - \Delta Ct_{\text{kalibratora}}$$

$$\Delta Ct_{\text{uzorka}} = \Delta Ct_{\text{ciljni gen u uzorku}} - \Delta Ct_{\text{referentni gen u uzorku}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibratora}} = \Delta Ct_{\text{ciljni gen u kalibratoru}} - \Delta Ct_{\text{referentni gen u kalibratoru}}$$

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri biološka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu $\pm SD$.

Tabela 5. Sekvence gena i temperature anilinga korišćene u qRT-PCR amplifikaciji

GEN	Funkcionalna kategorija	Prajmer forward (5'-3')	Prajmer reverse (3'-5')	Temperatura anilinga	Referenca
<i>Aktin</i>	Endogena kontrola	GTCCTCTTCCAGCCATCCAT	ACCACTGAGCACAATGTTACCG	61 °C	Loukehaich i sar., 2012
<i>PR1b1</i>	Signalni put salicilne kiseline	GCACTAAACCTAAAGAAAAATGGG	AAGTTGGCATCCCAAGACATA	61 °C	Tucci i sar., 2011
<i>PIN1</i>	Signalni put jasmonske kiseline	GGCCAAATGCTTGCACCTTT	CGTGGTACATCCGGTGGGATA	58 °C	Tucci i sar., 2011
<i>NCED1</i>	Sinteza abscisinske kiseline	CTTATTTGGCTATCGCTGAACC	CCTCCAACCTTCAAACCTCATTGC	61 °C	Nitsch i sar., 2009
<i>SIJAF13</i>	Sinteza antocijana	AGGAGAGTTCAGGAGCTGGAG	GCCTTCCTTTTGTTCGGTAG	60 °C	Løvdal i sar., 2010
<i>TPX1</i>	Sinteza lignina i suberin	TGCAGCATTGACAACACGTA	TCTTCCCATTTTCTCCATCG	60 °C	Quiroga i sar. 2000
<i>FLS</i>	Sinteza flavonoida	TAAGATTTGGCCTCCTCCTG	ACCAAGCCCAAGTGATAAGC	60 °C	Løvdal i sar., 2010
<i>C3H</i>	Sinteza hlorogenske kiseline	CTGTTGCTCGCGACCTCAAG	ACCTAATTGTGCCCTGGAC	60 °C	Paupière i sar., 2020

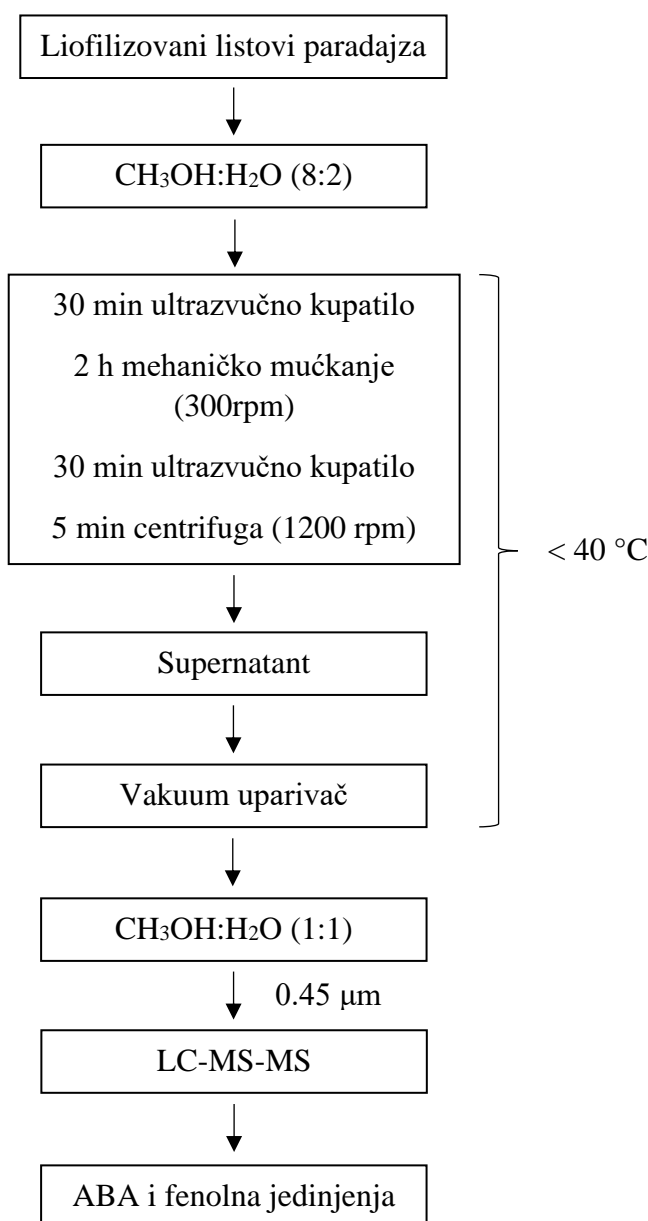
* *engl.* - Primer forward, nizvodni prajmer; *engl.* - Primer reverse, uzvodni prajmer

3.5.3. Kvantitativno određivanje sadržaja ABA i fenolnih jedinjenja primenom LC-MS-MS tehnike

Kvantitativno određivanje sadržaja ABA i fenolnih jedinjenja (4 flavonoidna glikozida, 4 fenilpropanske kiseline, 3 derivata benzojeve kiseline i 1 kumarin) (Tabela 6) u pripremljenim ekstraktima listova paradajza urađena je primenom LC-MS-MS tehnike (Orčić i sar., 2014.).

Od ukupno 45 uzoraka liofilizovanih listova paradajza, napravljeno je 18 grupnih uzoraka, tako da su se u svakom tretmanu nalazila po 3 grupna uzorka. Grupni uzorci su imali od 2 do 3 replikata.

Ekstrakcija uzoraka je urađena iz odmerenih liofilizovanih grupnih uzoraka listova na sobnoj temperaturi (Slika 20). Mereno je po 0.1 g i ekstrahovano sa 1 mL 80% metanola, zatim su uzorci postavljeni 30 min u ultrazvučno kupatilo, pa na mehaničko mućkanje 2 h, pri brzini od 300 rpm. Nakon ovog koraka uzorci su vraćeni u ultrazvučno kupatilo još 30 min. U toku trajanja ekstrakcije, treba voditi računa, da temperatura bude podešena, tako da ne prelazi 40 °C, da ne bi došlo do degradacije termolabilnih proizvoda. Posle ekstrakcije u ultrazvučnom kupatilu, uzorci su centrifugirani u trajanju od 5 min na 12000 rpm. Dobijeni supernatant je uparen do suva u rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi od 40 °C. Dobijeni suvi ostatak je rastvoren u 50% metanolu. Uzorci su filtrirani kroz membranski filter sa veličinom pora od 0.45 µm (Taveira i sar., 2012.).



Slika 20. Šematski prikaz procedure kvantitativnog određivanja sadržaja ABA i fenolnih jedinjenja primenom LC-MS-MS tehnike.

Analiza je sprovedena korišćenjem tečnog hromatografa Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA) (opremljen vakum degazerom, binarnom pumpom, autosemplerom, termostatiranom komorom i detektorom DAD) kuplovanog sa Agilent G6410A QqQ tandemskim masenim spektrometrom sa elektrospej (ESI) jonskim izvorom. Razdvajanje analita je postignuto upotrebom reverzno-fazne kolone Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 50 mm × 4.6 mm × 1.8 μm (Agilent Technologies, USA). Upravljanje instrumentom i akvizicija podataka vršeno je uz pomoć MassHunter Workstation Data Acquisition v. B.01.03 softvera (Agilent Technologies, USA). Zapremina svih injektovanih uzoraka je iznosila 5 μL. Uzorci su zatim razblaženi u smeši faza A (0,05% mravlja kiselina) i B (metanol) uz protok od 1 mL/min, dok je temperatura kolone iznosila 45 °C. Komponente su eluirane u gradijentnom modu: 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, vreme reekvilibracije je iznosilo 3 min. Dobijeni eluat je prosleđen na jonski izvor sa podešenim sledećim parametrima: protok gasa za sušenje N₂ je i iznosio 9 L/min, temperatura 350 °C, pritisak gasa za raspršivanje 40 psi, napon na kapilari 4 kV uz negativan polaritet. Ostali optimizovani parametri za kvantifikaciju prikazani su u Tabeli mm2. Sadržaj ABA i fenolnih jedinjenja je određen metodom

eksternog standarda na osnovu kalibracione krive (funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda, $\log(A) = f \log(C)$).

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri biološka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

Tabela 6. LC-MS-MS parametri za kvantifikaciju ABA i ispitivanih fenolnih jedinjenja

Klasa	Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Koliziona energija (V)
Cikloheksan karboksilna kiselina	Hinska kiselina	0.52	150	191	85	20
Derivati benzoeve kiseline	<i>p</i> -OH-benzoeva kiselina	1.08	80	137	93	10
	Siringinska kiselina	1.31	90	197	182	7
Fenilpropanske kiseline	Ferulna kiselina	1.90	90	193	134	11
	Sinapinska kiselina	1.92	100	223	193	17
	Kafena kiselina	1.18	100	179	135	10
	5- <i>O</i> -kafeoil-hinska kiselina	0.80	100	353	191	10
Flavonoidni glikozidi	Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	2.80	190	447	284	30
	Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	2.13	230	447	285	30
	Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	2.25	210	463	300	30
	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	2.33	135	609	300	42
Kumarini	Eskuletin	1.13	105	177	133	15

3.5.4. Statistička obrada rezultata

Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey-evim Post Hoc testom korišćena je kako bi se odredile statistički značajne razlike ($p < 0.05$) između tretmana. Analiza je sprovedena uz pomoć programa GraphPad Prism verzija 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). (GraphPad Prism).

3.6. Metode za ispitivanje uticaja gljiva roda *Trichoderma* na biohemijske, morfo-fiziološke i agronomске parametre paradajza gajenog u plasteniku

3.6.1. Uslovi gajenja

Ogled je sproveden u selu Selenči (45°24'52,1"N, 19°18'52,4"E) u pokrajini Vojvodini, Srbija, na organskoj farmi povrća. Uslovi gajenja su bili slični kao u Živanoviću i sar. (2017). Paradajz gružanski zlatni i paradajz narvik uzgajani su u plasteniku dužine 20 m, širine 4.5 m i maksimalne visine 2.5 m (Slika 21).

Za setvu su korišćeni kontejneri od stiropora sa podlogom mešavine treseta i perlita u zapreminskom odnosu 3:1. Setva je obavljena sredinom februara. Nakon dvadeset dana uniformni rasad je presađen u plastične posude. Početkom aprila kada su biljke bile visoke ~ 20 cm, presađene su u plastenik dužine 20 m, širine 4.5 m i visine do 2.5 m. Biljke su raspoređene u dva reda, pri čemu je razmak između biljaka u redu iznosio 50 cm, dok je razmak između redova iznosio takođe 50 cm, kako bi se lakše pratio uticaj gljive *T. harzianum* pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gružanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gružanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T). U okviru svakog tretmana nalazilo se po 20 biljaka. Suspenzije *T. harzianum* zapremine 5 ml primenjena je u zoni korena za vreme početka cvetanja biljaka. Kao pesticid korišćen je bakar sulfat i primenjen je dva puta pre cvetanja i pre formiranja prvih plodova. Biljke su navodnjavane svakodnevno sistemom kap po kap.



Slika 21. Ogled u plasteniku, paradajz gružanski zlatni desno i paradajz narvik levo na slici.

3.6.2. Priprema suspenzije gljiva

Priprema suspenzije izolata gljive *Trichoderma harzianum* SZMC 20660 je opisana u poglavlju 3.3.2.

3.6.3. Enzimska karakterizacija izolata

Izolat *T. harzianum* SZMC 20660 je inkubiran na PDA podlozi pet dana pri temperaturi od 25 °C, nakon čega je isečeno pet diskova micelije gljive prečnika 5 mm. Diskovi micelija gljive su potom prenešeni u erlenmajer sa po 200 ml sterilne PDB podloge (krompir dekstrozni bujon). Inkubacija je nastavljena narednih sedam dana u mraku u orbitalnom šejkeru na temperaturi od 25 °C pri 160 rpm, nakon čega je tečna kultura profiltrirana kroz sterilnu gazu. Dobijeni filtrat je korišćen za detekciju ekstracelularne enzimske aktivnosti 19 enzima (Alkalna fosfataza, esteraza (C4), esteraza lipaza (C8) lipaza (C14), leucin- arilamidaza, valin-arilamidaza, cistin- arilamidaza, tripsin, α -himotripsin, kisela fosfataza, naftol-AS-BI-fosfohidrolaza, α -galaktozidaza, β -galaktozidaza, β -glukuronidaza, α -glukozidaza, β -glukozidaza, N-acetil- β -glukozaminidaza, α -manozidaza i α -fukozidaza)

Enzimska karakterizacija je izvršena API ZYM testom (BioMerieux, France) prema uputstvu proizvođača. U svaki od 20 bunara API ZYM testa (prvi bunar predstavlja kontrolu) je preneto po 65 μ l filtrata u koje je prethodno dodato 5 ml destilovane vode. Nakon perioda inkubacije (4 h na 37 °C) dodata je po jedna kap reagensa ZYM A i ZYM B u svaku reakcionu tubu. Vizuelno ocenjivanje promena boje i poređenja sa APY YZM Colour Chart-om je sprovedeno nakon 5 min. Prisustvo enzima je ocenjivano na osnovu intenziteta obojenja: 0 - bez prisustva; 1 - slab intenzitet; 2 - srednji intenzitet; 3 - jak intenzitet.

3.6.4. Ekstrakcija RNK i analiza ekspresije svolenin gena primenom qRT-PCR

Nakon šezdeset dana od aplikacije gljiva iz svakog tretmana (G1C, G2C, G1T i G2T) prikupljeno je po šest biljaka i zamrznuto u tečnom azotu. Sakupljeni su bočni uzorci korena nakon brzog ispiranja čestica tla. Ukupna RNK je ekstrahovana iz ~ 100 mg zamrznutog i samlevenog uzorka pomoću RNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany), prema uputstvu proizvođača. Od 1 μ g ukupne RNK, upotrebom reverzne transkriptaze (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific), prema uputstvu proizvođača, sintetisana je cDNK. Specifičnim prajmerom praćena je ekspresija svolenin gena, doke je β -aktin korišćen kao referentni gen (Tabela 7).

Sastav PCR reakcione smeše je bio sledeći: 1x PCR pufer, 3 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTP, 0.3 μ M prajmer, 1U Taq polimeraze i 2.5 ng BSA.

PCR reakcije su se odvijale pod sledećim uslovima u aparatu:

Inicijalna denaturacija	1 min	94 °C	} 30 ciklusa
Denaturacija	15 s	94 °C	
Hibridizacija	30 s	60 °C	
Elongacija	1 min 45 s	72 °C	
Finalna ekstenzija	10 min	72 °C	

Tabela 7. Sekvence gena i temperature anilinga korišćene u qRT-PCR amlifikaciji

GEN	Pristupni broj	Funkcionalna kategorija	Prajmer forward (5'-3')	Prajmer reverse (3'-5')	Temperatura anilinga	Aplikon (bp)	Referenca
β -aktin	BT013524	Endogena kontrola	GACCTGCTCCACCATCTTCC	CAGTGGAGTTGCCGACAAAGG	60	280	Tucci i sar., 2011.
Svolenin	EU370698	Razgradnja celuloze	GTGGCCAGTGTGGAGGTATT	GTGAGGGATCGAGGTAGCTG	61	121	Brotman i sar., 2008.

* *engl.* - Primer forward (F), nizvodni prajmer; *engl.* - Primer reverse (R), uzvodni prajmer

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost tri biološka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.6.5. Hemijske analiza zemljišta

Za potrebe hemijskih ispitivanja uzorci zemljišta su uzeti sa dubine od 0 do 30 cm, potom su sušeni do vazdušno suvog stanja i prosejani kroz sito od 0.2 mm. Analizirana su sledeća osnovna hemijska svojstva zemljišta:

1. Aktivna kiselost (pH u vodi) određena je potenciometrijski, pH metrom (LLG Labware, pH Meter).
2. Ukupan sadržaj azota (N) određen je mikroelementalnom analizom po metodi AOAC 972.43:2000, CHNS analizatorom.
3. Sadržaj humusa određen je po metodi Tjurin-a (Tjurin, 1931) u modifikaciji Simakova (Simakov, 1957) oksidacijom organskih supstanci.
4. Sadržaj slobodnog kalcijum karbonata (CaCO₃) određen je volumetrijskom analizom, primenom Scheiblerov-og kalcimetra.
5. Sadržaj lakopristupačnog kalijuma (K₂O) i fosfora (P₂O₅) određen je plamenom fotometrijom uz pomoću AL-metode koja se temelji na ekstrakciji kalijuma sa amonijum-laktatom (Egner i sar., 1960).

3.6.6. Parametri rasta i razvića biljaka

Šezdeset dana od tretmana sa gljivom *T. Harzianum*, kao pokazatelji rastenja i razvića biljaka praćeni su parametri: dijametar stabljike, dijametar sredine stabljike, težina ploda, broj plodova, dijametar ploda i visina ploda.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost 10 bioloških ponavljanja po svakom tretmanu ± SD.

3.6.7. Merenje sadržaja vode u zemljištu i relativnog sadržaja vode u listovima paradajza

Sadržaj vode u zemljištu (SWC) meren na dubini od 6 cm pomoću Theta probe (Delta-T, Cambridge, U.K).

Relativan sadržaj vode u listovima (RWC) je određen gravimetrijski. Izmerena je sveža masa 10 kružnih isečka sa jednog lista (2r = 1 cm), potom su isečci preneti u Petri posude sa filter papirom natopljenim sa vodom, i 4 sata su držani u mraku do postizanja konstantne težine turgidne mase. Nakon merenja turgidne mase, isečci su zatim sušeni na 105 °C do konstantne težine, da bi se izmerila suva masa. RWC je određen iz odnosa:

$$RWC = [(FW-DW) / (TW-DW)] \times 100$$

TW - turgidna masa isečka je određena nakon što su lisni isečci držani u mraku 4 h u uslovima zasićujuće vlage.

FW - masa svežih lisnih isečaka

DW - masa suvih lisnih isečaka, nakon sušenja u sušnici na 105 °C

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost 10 bioloških ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.6.8. Merenje sadržaja hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeksa balansa azota u listovima paradajza

Metoda je opisana su u poglavlju 3.3.4. Merenja su obavljana na mladim i potpuno razvijenim listovima.

Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost deset bioloških i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.6.9. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola, rastvorljivih šećera i ukupnih flavonoida u plodovima paradajza

Ekstrakcija uzoraka

Uzorcima mase 500 mg osušenog ploda paradajza na 70 °C ekstrahovani su dva puta sa 5 ml 80 % metanola u ultrazvučnom kupatilom tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je vršeno centrifugiranje u trajanju od 10 min na 1000 g, na temperaturi od 4 °C. Prikupljeni supernatant je uparen do suvog ostatka na 40 °C korišćenjem rotacionog vakum uparivaču (Heidolph, Laborota 4000, Schwabach, Germany). Nakon uparavanja, talog je rastvoren sa 50 mL ultra čiste vode. Dobijeni rastvori su korišćeni za analizu ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i rastvorljivih šećera.

Sadržaj ukupnih polifenola

Ukupni sadržaj fenola određen je spektrofotometrijski, na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu reagensom, prema metodi Singleton (1998). Ekstrakt iz prethodno zamrznutog ploda paradajza na -80 °C je razblažen sa destilovanom vodom u odnosu 1:9. Alikvot razblaženog uzorka (70 μ L) izmešan je sa 300 μ L razblaženog (1:10) Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 5 minuta mućkanja u smešu je dodato 230 μ L 7,5 % Na₂CO₃ i inkubirano 30 minuta na 45 °C u mraku. Po završetku inkubacije, uzorci se drže 1 h na sobnoj temperaturi u mraku, a zatim je merena apsorbancija na 765 nm pomoću Shimadzu spektrofotometra (UV-1800, Shimadzu USA Manufacturing Inc, UR, USA). Za konstruisanje standardne kalibracione krive korišćena je galna kiselina (0-100 mg /L). Sadržaj ukupnih fenola izražen je u mg ekvivalenta galne kiseline na 100 g osušenog uzorka (mg GAE / 100 g).

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednost grupnog uzorka od 10 biljaka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

Koncentracije rastvorljivih šećera

Sadržaj rastvorljivih šećera je određen je kolorimetrijski, po metodi Yemm i Willis (1954) korišćenjem glukoze kao standarda. Razblaženi suvi ekstrakti ploda paradajza (1 mL) je dodat u antronski reagens (5 mL), inkubiran je 5 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je smeša postavljena u ključalo vodeno kupatilo 10 min. na 620 nm. Apsorbancija je očitana nakon hlađenja uzoraka 10 min. na sobnoj temperaturi. Koncentracija rastvorljivih šećera izražena je u miligramima po gramu suvog uzorka.

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednost grupnog uzorka od 10 biljaka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

Sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je kolorimetrijskom metodom koju su opisali Dewanto i sar. (2002). Alikvot uzoraka (125 μ L) je dodat u 625 μ L ultra čiste vode i 37,5 μ L 5 % NaNO₂. Nakon 6 min. dodato je 75 μ L 10% AlCl₃ kao bi se dobio kompleks flavonoida sa aluminijumom. Posle 5 min u smešu je dodato 250 μ L 1 M NaOH i 138 μ l destilovane vode da bi se dobila ukupna zapremina od 1,25 ml. Odmah, nakon dodatka vode, očitavana je apsorbancija uzorka na 510 nm u odnosu na slepu probu. Sadržaj ukupnih flavonoida je izražen u miligramima ekvivalenta kvercetina na 100 g osušenog uzorka (mg QE / 100 g).

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednost grupnog uzorka od 10 biljaka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.6.10. Određivanje sadržaja skroba u plodovima paradajza

Sadržaj skroba je određen prema metodi koju su opisali Kostić i sar. (2019). Talog nakon ekstrakcije rastvorljivih šećera pomešan je sa 3,25 ml 52% HCl i 2,5 ml destilovane vode. Nakon 30 minuta na 0 °C, smeša je 15 min centrifugirana na 17000 g. Sakupljen je supernatant i ponovljen je prethodno opisani postupak, nakon čega je ponovo sakupljen supernatant i pomešan sa prethodnim supernatantom. Supernatant je neutralisan na pH 7 sa 4 M NaOH i zasićenim rastvorom Na₂CO₃ ,pa je zapremina supernatanta podešena na 10 mL dodavanjem destilovane vode. Sadržaj skroba u dobijenim ekstraktima određen je antronskom kolorimetrijskom metodom koja je prethodno opisana za određivanje koncentracije rastvorljivih šećera. Dobijeni rezultati su pomnoženi sa 0,9 (faktor konverzije glukoze u skrob) (Rose i sar., 1991) i izraženi su u miligramima po gramu osušenog uzorka.

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednost grupnog uzorka od 10 biljaka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.6.11. Određivanje sadržaja makroelemenata u plodovima paradajza

Sadržaj ukupnog azota određen je metodom po Kjeldalu (Kjeltec system 1026, Foss Tecator, Danska) koja se zasniva na digestiji uzorka u rastvoru kiseline. Razaranje uzoraka se postiže koncentrovanom sumpornom kiselinom (cc H₂SO₄) u prisustvu katalizatora (K₂SO₄) uz zagrevanje. Nitrati i azot se redukuje do amonijaka koji se vezuje sa sumpornom kiselinom kao amonijum-sulfat. Dodatkom natrijum-hidroksida dolazi do ponovnog oslobađanja azot u vidu gasa amonijaka koji se destiliše u sud u kome se nalazi određena količina kiseline poznate koncentracije. Završnom titracijom utvrđuje se količina preostale kiseline, a sadržaj azota se preračunava po formuli:

$$\% N = 1.4007 \times c \times (V-Vb) / E$$

Gde je:

V – zapremina uzorka

Vb – zapremina slepe probe

E – masa uzorka

c – koncentracija rastvora standardne kiseline (NaOH = 0,1 mol/L)

Sadržaj ukupnog fosfora i kalijuma određen je plamenom fotometrijom, koja se bazira na merenju svetlosti koje emituju pobuđeni atomi. Primenjena je AL-metoda koja se temelji na ekstrakciji kalijuma i fosfora sa amonijum-laktatom (Egner i sar., 1960). Analiza makroelemenata urađena je u plodovima paradajza nakon suvog razaranja, žarenjem do pepela na 550 °C (Jones, 2001).

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednost grupnog uzorka od 10 biljaka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD.

3.6.12. Određivanje sadržaja mikroelemenata i teških metala u plodovima paradajza i zemljištu

Sadržaj ispitivanih metala (Mn, Fe, Cu, Zn, Ni, Cr, Pb i Co) određen je atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom - plamenom fotometrijom (Varian SpectrAA 220 FS), u plamenu acetilen/vazduh. Metoda spada u oblast emisione spektrofotometrije i zasniva na merenju intenziteta zračenja koje emituju pobuđeni atom u plamenu.

Uzorci su osušeni na 70 °C i usitnjeni u fini prah. Odmeren je 1 g uzorka u normalan sud i dodato 3 mL ccHNO_3 . Blago ključanje je vršeno u trajanju 4-5 časova. Nakon hlađenja dodato je 3 mL smeše HNO_3 i HClO_4 u odnos 2:1 i 33% H_2O_2 . Smeša je zagrevana na 120-130 °C 5-6 časova, do momenta kada su prestala isparenja i kada je rastvor postao bistar. Zatim je u normalan sud dodato 10 mL dejonizovane vode i rastvor je ponovo postavljen da ključa 10-15 minuta, sve do momenta dok se zapremina rastvora i dejonizovane vode ne svede na polovinu. Nakon hlađenja, na sobnoj temperaturi rastvor je profiltriran kroz kvantitativni filterparir (Whatman No. 42). Filtrat je prikupljan u normalne sudove od 50 mL i dopunjen je do konačne zapremine dejonizovanom vodom.

Sadržaj mikroelemenata i teških metala utvrđen je očitavanjem intenziteta signala na talasnim dužinama za koje dati element ima najosetljiviji odziv: Mangan (Mn) - 279,5 nm; Gvožđe (Fe) - 248,3 nm; Bakar (Cu) - 324,8 nm; Cink (Zn) - 213,9 nm; Nikl (Ni) - 232,0 nm; Hrom (Cr) - 357,9 nm; Olovo (Pb) - 283,3 nm; Kobalt (Co) – 240,7 nm.

Dobijeni rezultati su izraženi kao vrednost grupnog uzorka od 10 biljaka i tri tehnička ponavljanja po svakom tretmanu \pm SD

3.6.13. Određivanje indeksa bioakumulacije

Efikasnost biljaka da usvajaju ispitivane elemente iz zemljište i transportuju ih do jestivih delova biljke može se izraziti indeksom bioakumulacije (BI). Indeks bioakumulacije predstavlja odnos između koncentracije metala u jestivim delovima biljke i ukupnog sadržaja metala u zemljištu (Rodriguez-Iruretagoiena et al., 2015).

Indeks bioakumulacije predstavljen je sledećom jednačinom:

$$BI = \frac{\text{Koncentracija metala u plodu}}{\text{Koncentracija metala u zemljištu}} \times 100$$

3.6.14. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka u ogledu u kome su praćeni morfo-fiziološki i agronomski parametri urađena je pomoću programa R verzija 3.6.2. (RStudio, Inc., Boston, MA, USA) i GraphPad Prism verzija 6.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey-evim Post Hoc testom korišćena je kako bi se odredile statistički značajne razlike ($p < 0.05$) između tretmana (GraphPad Prism).

Analizom glavnih komponenti (Principal Components Analysis - PCA) utvrđeni su odnosi i vizuelno je predstavljena statistička bliskost tj. različitost između sorti paradajza, tretmana i promenljivih korišćenjem programa R i paketa ade4TkGUI (Thioulouse and Dray 2009). Pearson-ov koeficijent korelacije urađen u programu R primenom `cor.test` funkcije u cilju otkrivanja značajnih odnosa između glavnih komponenti i analiziranih promenljivih ($p < 0.05$).

REZULTATI

4. REZULTATI

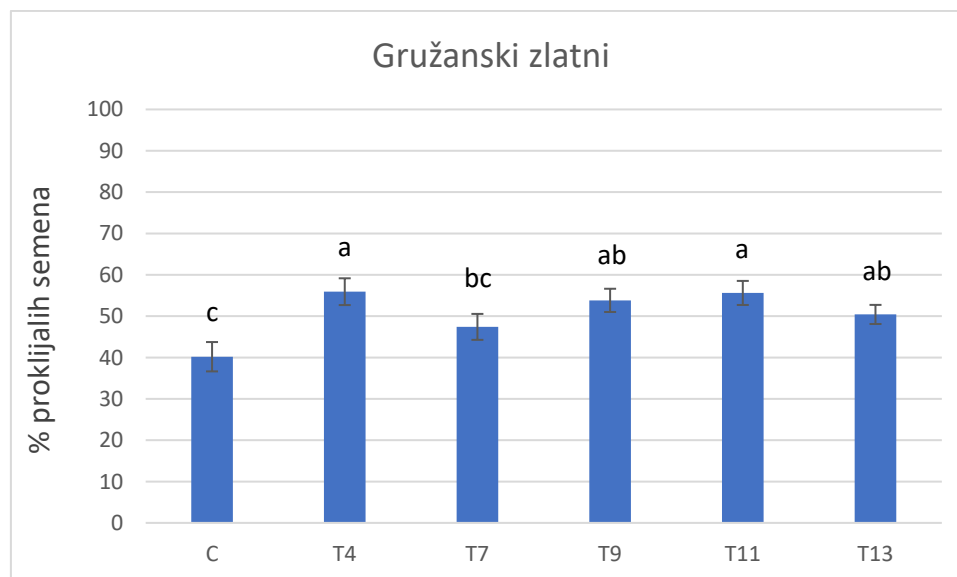
4.1. Ispitivanje uticaja gljiva roda *Trichoderma* na klijanje semena paradajza

4.1.1. *In vitro* stimulacija klijavosti semena u pristustvu gljiva iz roda *Trichoderma*

Uticaj pet gljiva vrsta *Trichoderma* na klijanje dve sorte paradajza gružanski zlatni i narvik ispitan je u *in vitro* uslovima. Semena paradajza su naklijavana 48h u kokulturi sa *T. harzianum*, *T. brevicompactum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum* i *T. citrinoviride* na hranljivim podlogama Murashige and Skoog.

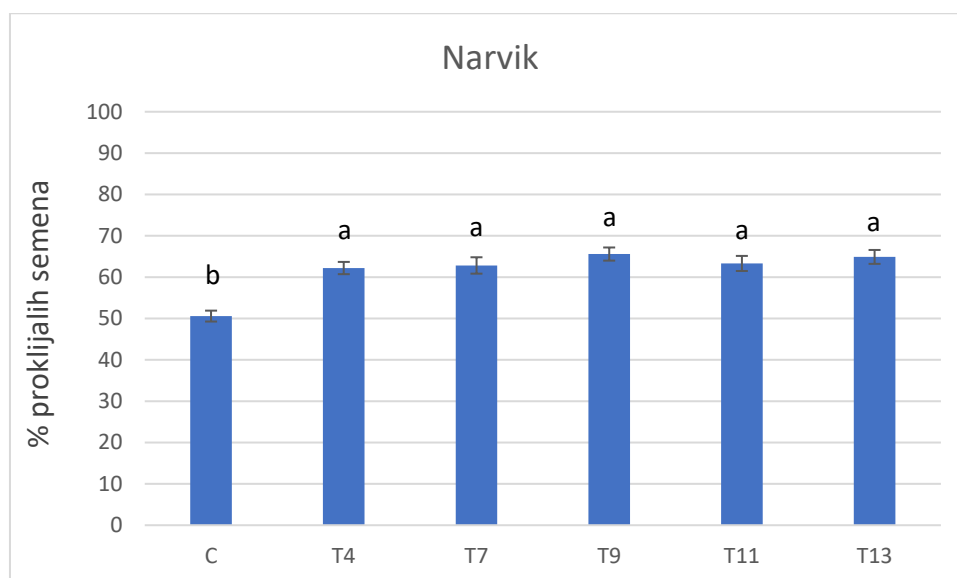
T. harzianum je najviše stimulisala klijanje semena paradajza gružanski zlatni sa 15.73 % u odnosu na kontrolu, nakon 48 h na MS podlozi. Slična stimulacija klijanja od 15.43 % primećena je u tretmanu sa *T. longibrachiatum*. *T. brevicompactum* je stimulisala klijanje semena paradajza gružanski zlatni sa 13.63 %, a *T. citrinoviride* sa 10.23 %. *T. virens* jedina nije statistički značajno stimulisala klijanje semena u odnosu na kontrolu (Slika 22).

T. brevicompactum je najviše stimulisala klijanje semena paradajza narvik sa 15 % u odnosu na kontrolu, nakon 48 h na MS podlozi. Nešto slabija stimulacija zabeležena je u tretmanima sa *T. citrinoviride* 14.31 %, *T. longibrachiatum* 12.73 %, *T. virens* 12.24 % i *T. harzianum* 11.62 % (Slika 23).



Slika 22. Procenat prokljalih semena paradajza gružanski zlatni, nakon 48h na MS podlogama, pri različitim tretmanima: kontrola (C), *T. harzianum* (T4), *T. virens* (T7), *T. brevicompactum* (T9), *T. longibrachiatum* (T11), *T. citrinoviride* (T13).

Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).



Slika 23. Procenat prokljalih semena paradajza narvik, nakon 48h na MS podlogama, pri različitim tretmanima: kontrola (C), *T. harzianum* (T4), *T. virens* (T7), *T. brevicompactum* (T9), *T. longibrachiatum* (T11), *T. citrinoviride* (T13).

Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

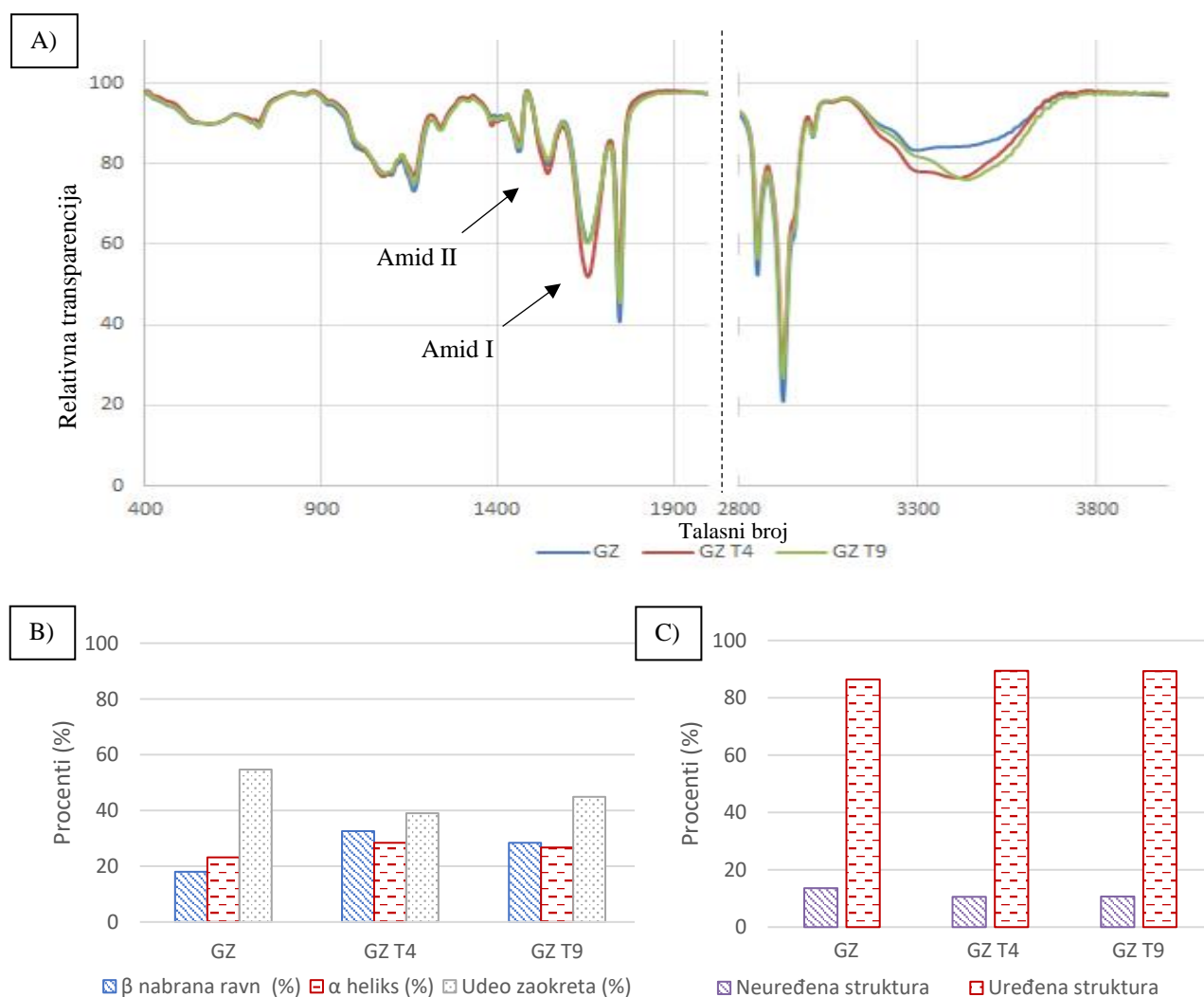
4.1.2. Određivanje biohemijskih promena i promena funkcionalnih grupa u ćelijskom zidu radikula semena paradajza primenom FTIR spektroskopije

Infracrvena spektroskopija daje precizne spektre svih hemijskih veza prisutnih u uzorku i omogućava posmatranje svih metaboličkih modifikacija izazvanih tretmanom na subćelijskom nivou. Svi biološki makromolekuli (polisaharidi, polifenoli, proteini) imaju karakteristične trake u ovim spektrima, na osnovu čijih promena se procenjuju promene u strukturi/sadržaju odgovarajućih molekula. Da bi se ustanovilo da li primena gljiva roda *Trichoderma* utiče na strukturu karakterističnih bioloških makromolekula i da li ove promene mogu biti u vezi sa povećanjem klijavosti semena mereni su FTIR spektri na radikulama semena paradajza.

FTIR spektri radikula semena paradajza gružanski zlatni pokazuju da se najveće promene dešavaju u proteinskom delu spektra. Izdvajaju se proteinske trake Amid I (max 1652 cm^{-1} i 1637 cm^{-1}) i Amid II (max 1552 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} , 1520 cm^{-1}) (Slika 25a). U poređenju sa kontrolom kod radikula semena tretiranih sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* intenzitet pikova je niži što ukazuje na smanjenje proteina. Traka Amid I je karakteristična za C=O vibraciju u proteinskom skeletu i zavisi od sekundarne strukture. Traka Amid II potiče od C-N savijajuće vibracije i osetljiva je na konformacione promene proteina. Obe trake se sastoje od traka karakterističnih za α heliks i β nabranu ravan, odakle potiču višestruki maksimumi u svakoj traci. U delovima spektra koji su karakteristični za polisaharide, nema velikih razlika između kontrole i tretmana, osim kod trake 1155 cm^{-1} koja je karakteristična za glikozidnu vibraciju kod celuloze, ksiloglukana i pektina. Intenzitet pika 1155 cm^{-1} je najviši kod kontrole. Pošto kod drugih traka koje su karakteristične za celulozu nema razlika, najverovatnije je došlo do malog povećanja pektina ili ksiloglukana koji se inače povećava u tkivima koja su u razvoju. Traka na $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ je najmanjeg intenziteta kod kontrole i strukturno se razlikuje kod svih uzoraka. Ova traka je karakteristična za N-H grupu u proteinima i O-H u polisaharidima i proteinima usled čega nije moguće da se odredi o kojoj grupi se radi. Čak ni nakon razlaganja na komponente nije moguće odrediti njihovu asignaciju. Različite pozicije podtraka u ovoj

širokoj traci ukazuju da postoje različiti tipovi vodoničnih veza kod uzoraka. Bilo da je reč o NH ili OH vibracijama, njihova pozicija varira u zavisnosti od tipa intramolekulskih i intermolekulskih vodoničnih veza.

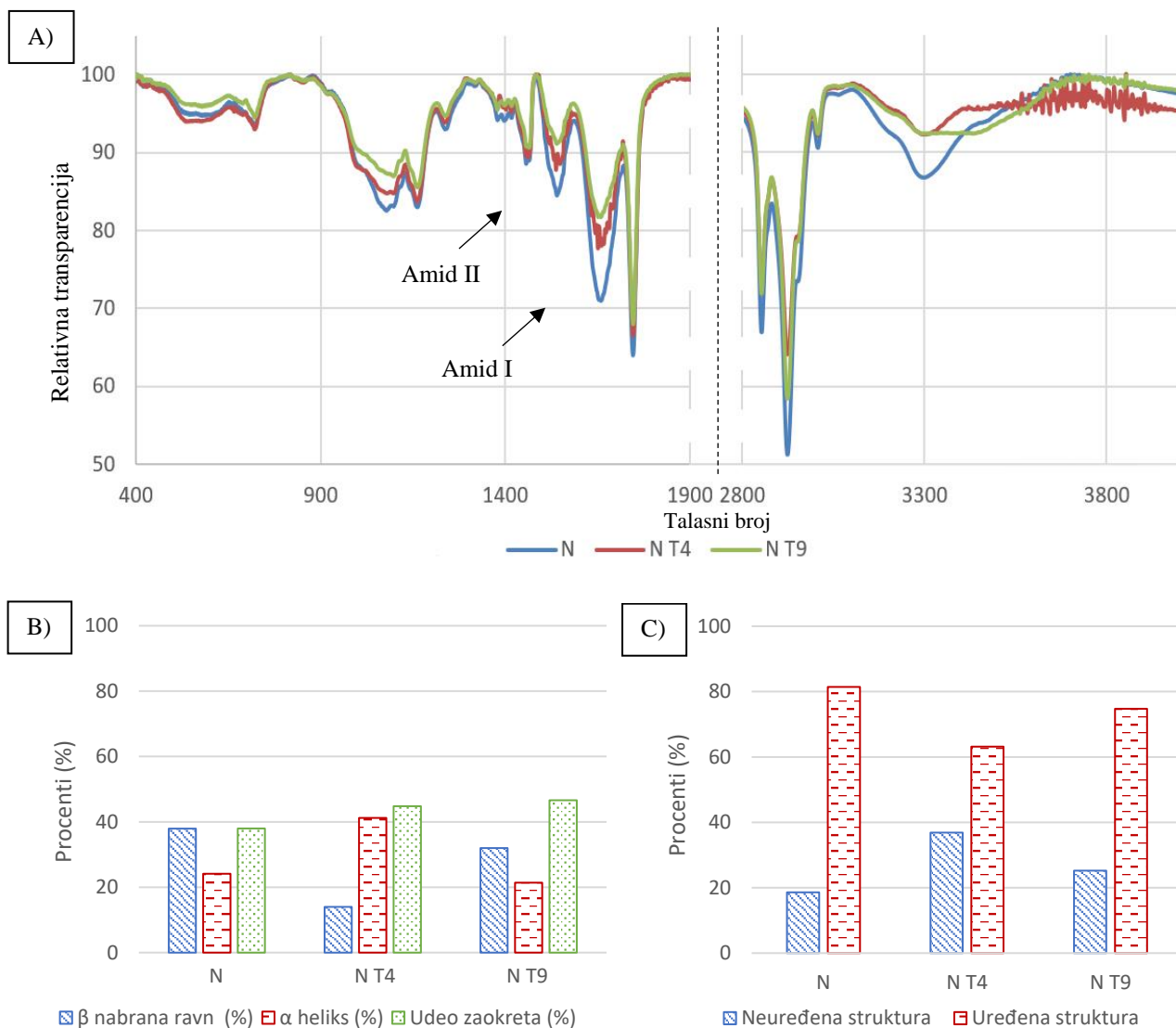
Da bi se odredila promena odnosa ova dva dela sekundarne strukture u proteinima, tj. njihova strukturalna organizacija ili konformacija urađena je dekonvolucija proteinskih traka Amid I i Amid II. Dekonvolucija proteinskih traka $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ (Amid I) i $1500-1570\text{ cm}^{-1}$ (Amid II) sprovedena je korišćenjem Gausovog modela za dekonvoluciju četvorokomponentni za Amid I traku i trokomponentni za Amid II traku uz pomoć softvera Matlab 6.5 (R2010a). Traka Amid I je indikativna za udeo različitih tipova sekundarne strukture u proteinima. Razlaganje je pokazalo da se kod tretmana sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* smanjuje udeo zaokreta, a povećava udeo alfa heliksa i beta nabrane ravni, što je izraženije kod uzorka GZ T4 nego kod GZ T9 (Slika 24b). Traka Amid II nije toliko indikativna za udeo tipova sekundarne strukture u proteinu, ali je na osnovu njene dekonvolucije procenjen odnos neuređene i uređene strukture, koja uključuje sve vidove sekundarne strukture, u proteinima biljke (Slika 24c). Rezultat pokazuje da *T. harzianum* i *T. brevicompactum* ne menjaju odnos uređene i neuređene strukture u proteinima radikula semena.



Slika 24. FTIR spektri usitnjenih uzoraka radikula semena paradajza gružanski zlatni pri različitim tretmanima: kontrola (GZ), semena tretirana *T. harzianum* (GZ T4), semena tretirana *T. brevicompactum* (GZ T9) (A); Procentualna zastupljenost tri tipa sekundarne strukture kod radikula semena, na osnovu dekonvolucije FTIR trake Amid I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) (B); Procentualna

zastupljenost uređene strukture i neuređene strukture kod radikula semena, na osnovu dekonvolucije FTIR trake Amid II ($1500-1580\text{ cm}^{-1}$) (C).

FTIR spektri (Slika 25a) radikula semena paradajza narvik takođe pokazuju da se najveće promene dešavaju u proteinskom delu spektra. Kao i kod predhodne sorte paradajza i kod paradajza narvik se izdvajaju proteinske trake Amid I ($\text{max } 1652\text{ cm}^{-1}$ i 1637 cm^{-1}) i Amid II ($\text{max } 1552\text{ cm}^{-1}$, 1539 cm^{-1} , 1520 cm^{-1}).

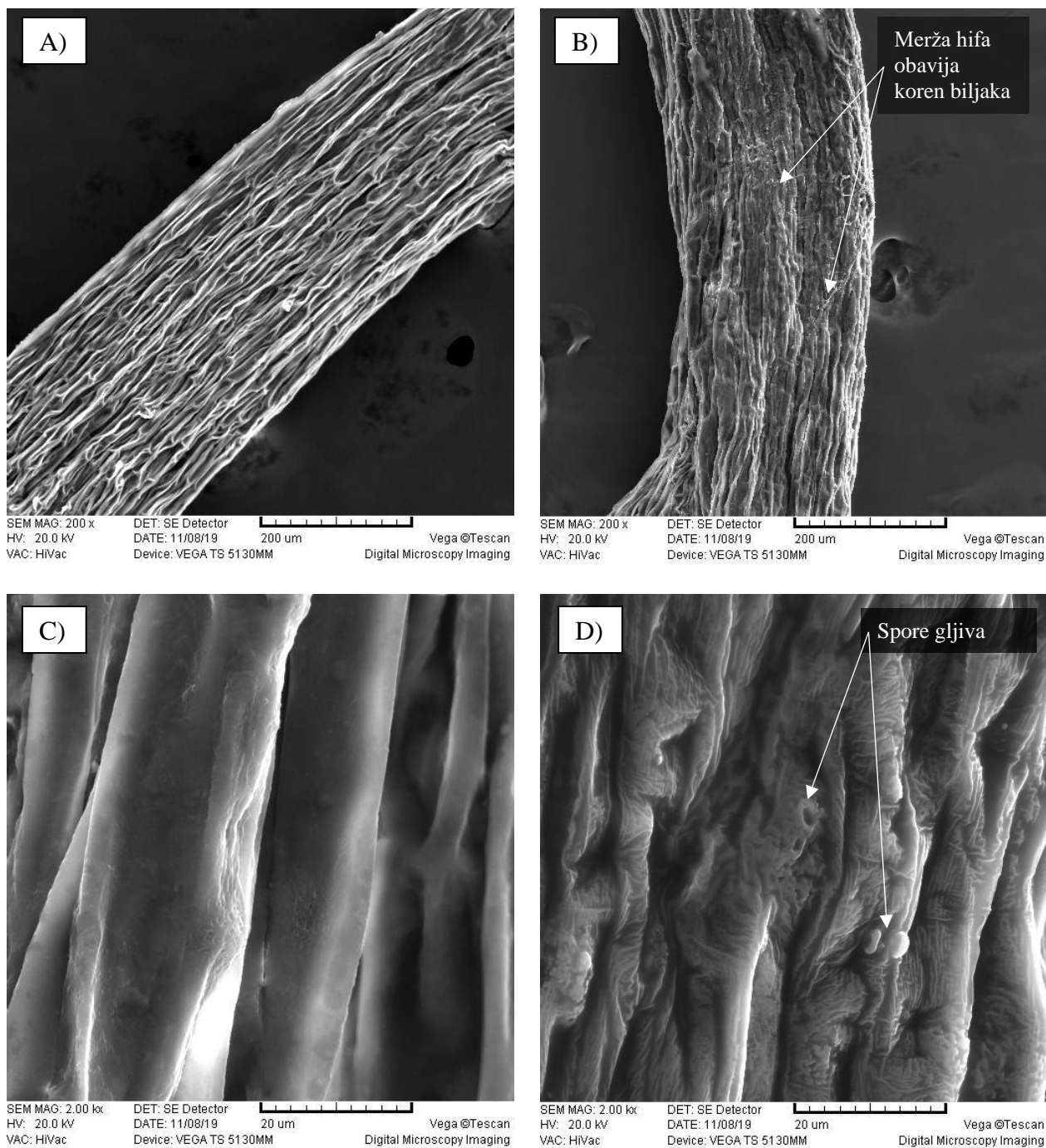


Slika 25. FTIR spektri usitnjenih uzoraka radikula paradajza narvik pri različitim tretmanima: kontrola (N), semena tretirana sa *T. harzianum* (N T4), semena tretirano sa *T. brevicompactum* (N T9). Procentualna zastupljenost tri tipa sekundarne strukture kod radikula semena, na osnovu dekonvolucije FTIR trake Amid I ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) (B); Procentualna zastupljenost uređene strukture i neuređene strukture kod radikula semena, na osnovu dekonvolucije FTIR trake Amid II ($1500-1580\text{ cm}^{-1}$) (C).

Radikule semena sorte narvik tretirane sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* su imale manji intezitet pikova Amid I i Amid II trake u odnosu na kontrolu što ukazuje na smanjenje sadržaja proteina. Poređenjem spektara sorte gruzanski zlatni i sorte narvik uočavaju se promene i u strukturi proteina. Tako da je za dekonvoluciju trake Amid I kod sorte narvik korišćen trokomponentni Gausov model

za razliku od sorte gruzanski zlatni kod koje je korišćen četvorokomponentni model, jer se oblik date trake razlikuje između dve sorte paradajza. Razlaganje Amid I trake ($1600-1700\text{ cm}^{-1}$) kod paradajza narvik je pokazalo da se u oba tretmana povećava udeo zaokreta u odnosu na kontrolu (Slika 25b). Kod uzorka N T4 se povećava udeo alfa heliksa uz paralelno smanjenje beta nabrane ravani u odnosu na kontrolu, dok se kod uzorka N T9 zastupljenost ovih struktura ne menja u odnosu na kontrolu. Na osnovu trake Amid II ($1510-1575\text{ cm}^{-1}$) procenjen je odnos uređene i neuređene strukture. Rezultat pokazuje da u odnosu na kontrolu kod uzoraka N T4 i N T9 dolazi do povećanja udela neuređene strukture u proteinima u odnosu na uređenu, što je izraženije kod uzorka T4 (Slika 25c).

Na osnovu skenirajuće elektronske mikrografije utvrđeno je da u kokulturi nije došlo do fizičkog kontakta gljive i radikula semena paradajza tokom prvih 48 h tj. kada su se uzorci radikula sakupljali za snimanje FTIR spektara (Slika 26b). Takođe uočeno je da su radikule u kokulturi *T. harzianum* i *T. brevicompactum* veće i da je zona primarne kore koja se vidi na uzdužnom preseku manje naborana. (Slika 26a, b). Kada je rast u kokulturi trajao više od 48 h, dolazilo je do fizičkog kontakta gljive i radikula semena paradajza. Kada dođe do fizičkog kontakta između gljive i radikule na mikrografijama se jasno uočava razgranata mreža ćelija hifa sa sporoma (Slika 26c, d).

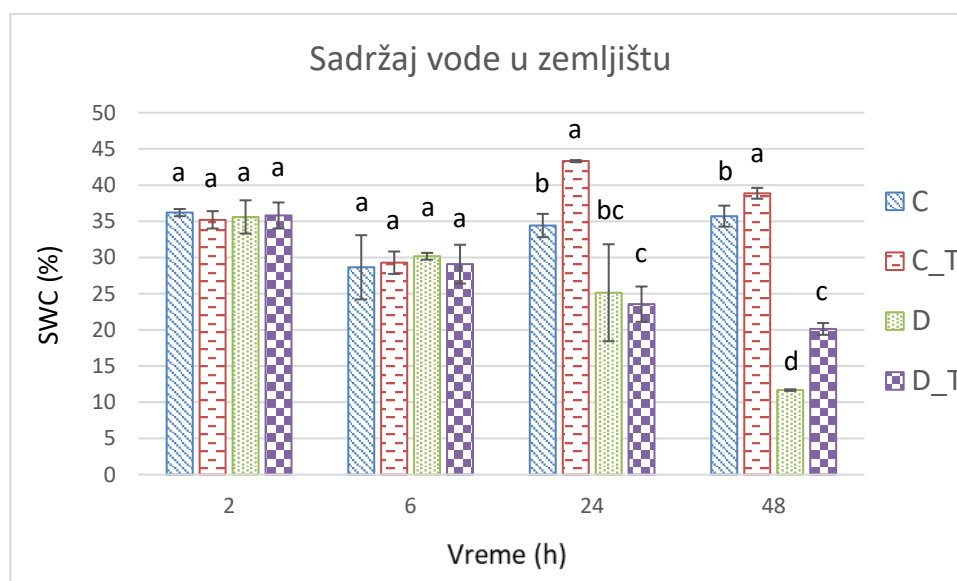


Silka 26: Pričvršćivanje hifa gljiva za korenak biljaka snimano skenirajućim elektronskim mikroskopom. Površina epidermisa radikule GZ paradajza pri uvećanju 200x (A), površina epidermisa radikule GZ paradajza nakon kontakta sa *T. brevicompactum* pri uvećanju 200x (B), površina epidermisa radikule GZ paradajza pri uvećanju 2000x (C), površina epidermisa radikule GZ paradajza nakon kontakta sa *T. brevicompactum* pri uvećanju 2000x (D).

4.2. Rane reakcije biljaka na interakciju sa gljivama roda *Trichoderma* u uslovima smanjene snabdevenosti vodom

Biljke paradajza (*Solanum lycopersicum* Mill. cv. ailsa craig) gajene su u kontrolisanim uslovima i optimalno su zalivane do pojave četiri lista. Kada su biljke bile u fazi četiri lista primenjeni su sledeći tretmani: dodatak suspenzije *T. brevicompactum* uz optimalno zalivanje, prestanak zalivanja, prestanak zalivanja uz dodatak suspenzije *T. brevicompactum*. Suspenzija je primenjena u zoni korena biljke.

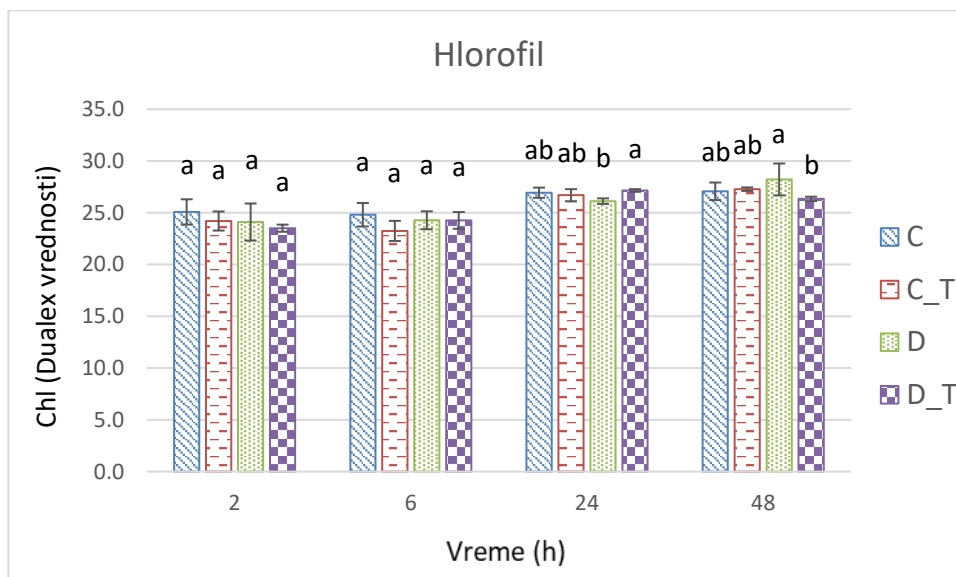
Sadržaj vode u zemljištu (SWC) tokom prvih 6 h nakon aplikacije *T. brevicompactum* nije se značajno menjao u posmatranim tretmanima. Nakon 24 h nije bilo značajnih razlika između optimalno zalivanih biljaka i biljaka kod kojih je zaustavljeno snabdevanje vodom. U tretmanu sa *T. brevicompactum* kod optimalno zalivanih biljaka došlo je do porasta sadržaja vode u zemljištu za 9 % u odnosu na kontrolu. Sličan efekat je primećen u tretmanu sa *T. brevicompactum* kod biljaka koje nisu zalivane. Nakon 48 h značajne razlike su se javile između svih tretmana. Sadržaj vode u zemljištu je veći kod optimalno zalivanih biljaka za 24 % u odnosu na biljke kod kojih je zaustavljeno snabdevanje vodom. Tretman sa *T. brevicompactum* uticao je na povećanje SWC kod optimalno zalivanih biljaka za 3 %, a kod biljaka kod kojih je zaustavljeno snabdevanje vodom za 8.5 (Slika 27). Rezultati ukazuju da su biljke posle 48h od prestanka zalivanja bile u uslovima zemljišne suše, a da je sadržaj vode u zemljištu u tretmanu sa *T. brevicompactum* povećan.



Slika 27. Sadržaj vode u zemljištu pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom, merene u istom vremenskom periodu, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

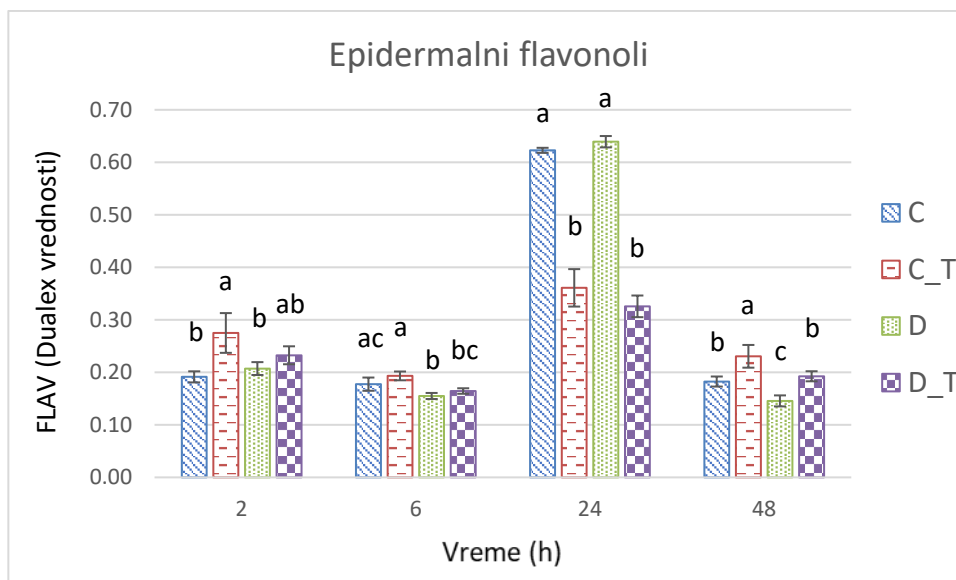
Sadržaj hlorofila u ovom eksperimentu se nije značajno menjao između ispitivanih tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 28).



Slika 28. Sadržaj hlorofila pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom merene u istom vremenskom periodu nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

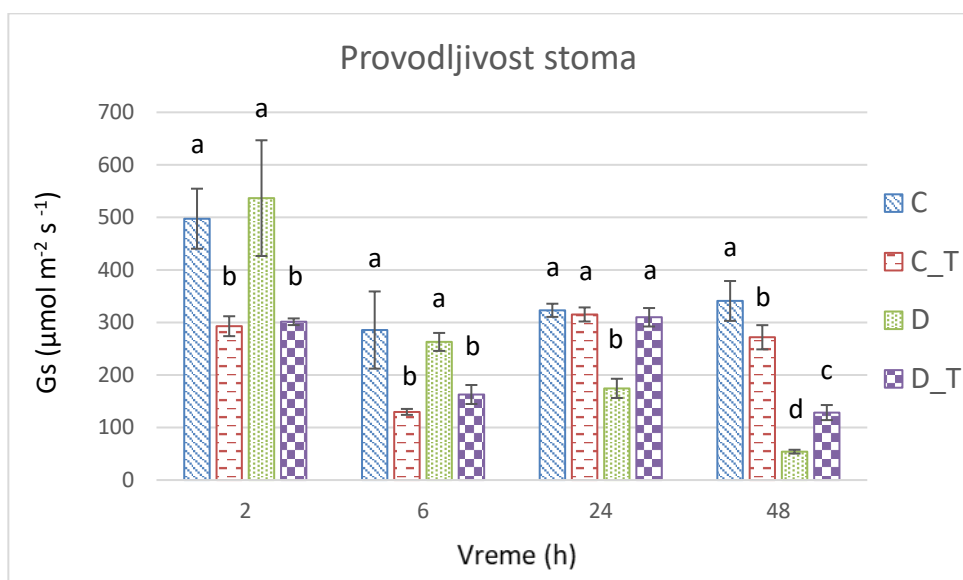
Za razliku od sadržaja hlorofila, u ovom ogledu je došlo do značajnog porasta epidermalnih flavonola za 47 %, već 2 h nakon dodatka *T. brevicompactum* kod optimalno zalivanih biljaka dok u tretmanu prestanka zalivanja biljaka nije bilo značajnih razlika. Nakon 6 h značajnih razlika u tretmanu sa *T. brevicompactum* nema, ali je prestanak zalivanja biljaka uticao na smanjenje epidermalnih flavonola za 11 %. Maksimalne vrednosti epidermalnih flavonola kod svih tretmanima su dostignute 24 h od primene tretmana. *T. brevicompactum* je delovala inhibitorno na epidermalne flavonole nakon 24 h i kod biljaka dobro snabdevenih vodom došlo je do pada od 42 %, a u tretmanu prestanka zalivanja biljaka od 48 %. Posle 48 h sadržaj epidermalnih flavonola, kod biljaka, kod kojih je zaustavljeno snabdevanje vodom bio je značajno niži za 17 % od kontrole. Tretman sa *T. brevicompactum* je imao stimulatивно delovanje, kod oba režima zalivanja, gde je zabeležen značajan porast Flav od 28% (Slika 29).



Slka 29. Sadržaj epidermalnih flavonola pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom merene u istom vremenskom periodu nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

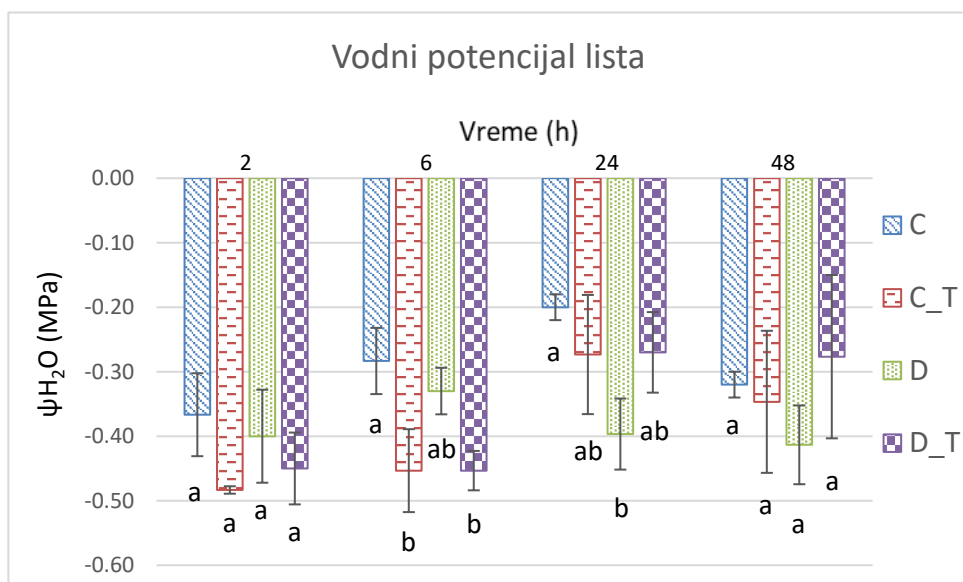
Što se tiče provodljivosti stoma došlo je do značajnog smanjenja već 2h nakon aplikacije *T. brevicompactum*, kod optimalno zalivanih biljaka za 41 %, a kod tretmana prestanka zalivanja biljaka za 44 %. Nakon 6 h razlike su iznosile 55 % i 38 %. Posle 24 h, otvorenost stoma kod biljaka koje su tretirane sa *T. brevicompactum* je na nivou optimalno zalivanih kontrolnih biljaka. Tako da biljke reaguju na nedostatak vode zatvaranjem stoma, što se ne dešava kod biljaka koje su istovremeno tretirane sa *T. brevicompactum*. U uslovima dobre opskrbljenosti vodom biljke su imale veću provodljivost stoma za 46 % od biljaka u tretmanu prestanka zalivanja vodom, dok je *T. brevicompactum* imala stimulatívni efekat od 77 % kod biljaka izloženih prestanku zalivanja, odnosno provodljivost stoma je bila na nivou kontrole. Nakon 48 h u svim tretmanima su primetne značajne razlike. Optimalno zalivane biljke imale su veću Gs za 84 % od biljaka izloženih tretmanu prestanka zalivanja. Uticaj izolata *Trichoderma* posle 48 h zavisio je od snabdevenosti biljaka vodom. *T. brevicompactum* izazvala smanjenje Gs kod dobro zalivanih biljaka za 21 %, u tretmanu prestanka zalivanja Gs je bila veća dva puta od tretmana gde je samo smanjena opskrbljenost biljaka sa vodom (Slka 30).



Slika 30. Provodljivost stoma pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom merene u istom vremenskom periodu nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

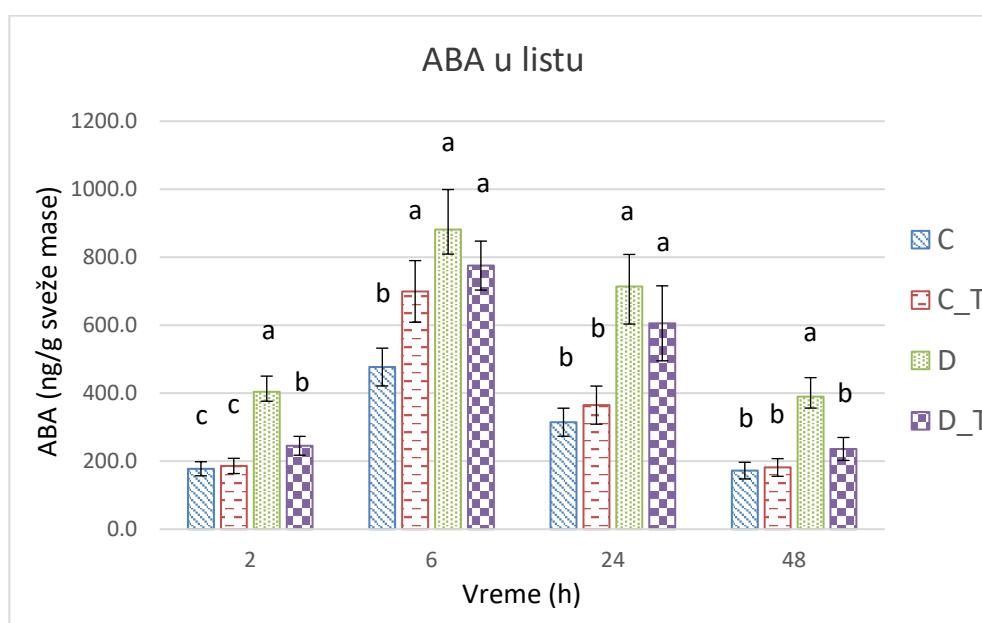
Vrednosti vodnog potencijala listova 2 h nakon inokulacije *T. brevicompactum* nisu se značajno razlikovale. Posle 6 h efekat *T. brevicompactum* se ispoljio u vidu smanjenja vodnog potencijala listova za 61 % u odnosu na kontrolu. Nakon 24 h ψ_{H_2O} dobro zalivanih biljaka je bio dva puta veća u odnosu na vrednost biljaka u tretmanu prestanka zalivanja. Na kraju ispitivanog perioda (48 h), nije bilo značajnih razlika između tretmana (Slika 31).



Slika 31. Vodni potencijal lista pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom merene u istom vremenskom periodu nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

Sadržaj ABA u listu i korenu tokom ispitivanog eksperimentalnog perioda je imao identičan trend, kod svih tretmana maksimalne vrednosti se dostižu 6h od primene tretmana. *T. brevicompactum* kod dobro zalivanih biljaka, 2 h nakon aplikacije nije imala značajne efekte na sadržaj ABA u listu, ali je u tretmanu prestanka zalivanja biljaka *T. brevicompactum* uzrokovala smanjenje ABA od 39 %, tako da je u odnosu na optimalno zalivane biljke sadržaj ABA u listu bio povećan. Prestanak zalivanja biljaka rezultovao je povećanjem vrednosti ABA u listu dva puta u odnosu na biljke dobro opskrbljene vodom. Nakon 6 h kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. brevicompactum* dolazi do stimulisanja ABA u listu za 47 %. Biljke izložene dejstvu prestanka zalivanja su u ovom vremenskom intervalu imale za 85 % veću vrednost ABA u odnosu na optimalno zalivane biljke. Posle 24 h efekti *T. brevicompactum* nisu značajni, ali efekat prestanka zalivanja biljaka stimulatивно utiče na sadržaj ABA u listu, čiji sadržaj je dva puta veći u poređenju sa optimalno zalivanim biljkama. Nakon 48 h prestanak zalivanja biljaka je doveo do toga da se dva puta povećao sadržaja ABA u listu u poređenju sa dobro zalivanim biljkama. Nije bilo značajnih razlika u sadržaju ABA u listu kod svih ostalih tretmana. (Slika 32).

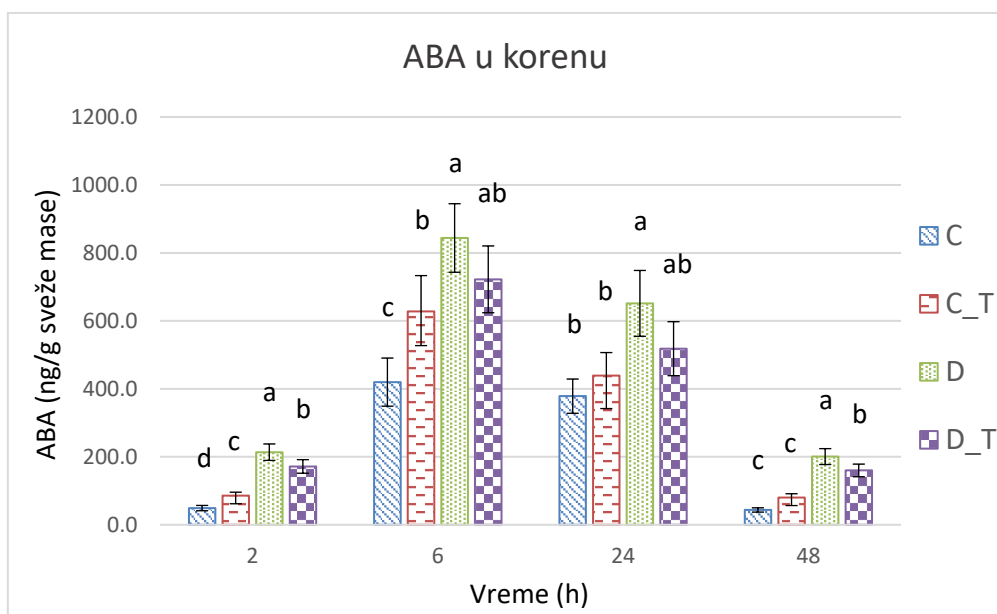


Slka 32. Relativni sadržaj ABA u listu pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom merene u istom vremenskom periodu nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

Vrednost sadržaja ABA u korenu 2 h nakon inokulacije *T. brevicompactum* značajno se razlikovala u svim tretmanima. Prestanak zalivanja biljaka četiri puta je povećao sadržaj ABA u korenu. Uticaj izolata *Trichoderma* u ovom vremenskom periodu zavisio je od snabdevenosti biljaka vodom. *T. brevicompactum* je kod optimalno zalivanih biljaka dovela do povećanja sadržaja ABA za 74 %, dok je u tretmanu prestanka zalivanja imala suprotan efekat, gde je sadržaj ABA porastao do 79% od vrednosti kod biljaka koje su bile izložene samo prestanku zalivanja. Nakon 6 h kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. brevicompactum* je dovela do povećanja ABA u korenu za 50 %. Biljke koje su bile u tretmanu prestanka zalivanja su u ovom vremenskom intervalu imale dva puta veću vrednost ABA u odnosu na optimalno zalivane biljke. Posle 24 h efekti *T. brevicompactum* nisu značajni, ali je primetan efekat prestanka zalivanja biljaka, koji stimulatивно utiče na sadržaj ABA u korenu čiji sadržaj je za 72 % veći u poređenju sa optimalno zalivanim biljkama. Nakon 48 h *T.*

brevicompectum je dovela do značajnog smanjenja vrednosti ABA kod biljaka u tretmanu prestanka zalivanja za 20 %. Ovaj tretman je povećao četiri i po puta sadržaj ABA u korenu u poređenju sa dobro zalivanim biljaka (Slika 33).



Slika 33. Relativni sadržaj ABA u korenu pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Vrednosti označene istim slovom, merene u istom vremenskom periodu, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.3 Uticaj gljiva roda *Trichoderma* na biohemijske i morfo-fiziološke parametre paradajza u uslovima suše

Biljke paradajza (sorta gruzanski zlatni), gajene su na platformi za fenotipizaciju biljaka u kontrolisanim uslovima. Kada su biljke bile u fazi tri listića uvedena su dva režima zalivanja, u kombinaciji sa dve vrste gljive *T. harzianum* i *T. brevicomctum*. Suspenzija gljiva je primenjena u zoni korena biljke.

4.3.1. Merenje sadržaja hlorofila u listu i polifenola u epidermisu lista

Rezultati merenja indeks hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeksa balansa azota pokazuju da nije bilo statistički značajnih razlika između tretmana u toku prvih 72 h nakon primene dve ispitivane vrste Tabela 8. Zabeležene negativne vrednosti indeksa epidermalnih flavonola na početku eksperimenta tj. 2h posle aplikacije gljiva su najverovatnije posledica premeštanja biljaka iz klima komore na platformu za fenotipizaciju. Intenzitet svetlosti u klima komori je iznosio 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, dok je na platformi za fenotipizaciju iznosio 700 $\mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Oporavak epidermalnih flavonola od 24 h do 72 h od momenta aplikacije gljiva bio je najsporiji kod biljaka koje su optimalno zalivane u prisustvu *T. brevicomcompactum*. U istom tretmanu indeks balansa azota je bio najveći, dok kod biljaka u suši u prisustvu *T. harzianum* bio najmanji. U svim ostalim slučajevima sadržaj hlorofila, indeks antocijana kao i indeks balansa azota se nisu značajno menjali između tretmana tokom ispitivanog perioda. Sve vrednosti NBI posmatrane u rasponu od tri dana, u svim tretmanima, su se smanjile što je posledica povećanja indeksa flavonola.

Tabela 8. Indeks hlorofila (SFR_G), epidermalnih flavonola (FLAV), antocijana (ANTH_RG) i indeks balansa azota (NBI_G) mereni optičkim senzorom Multiplex-3 pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicomcompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicomcompactum* (D_T2).

5 dan (2h pre početka inokulacije <i>Trichoderma</i>)				
Tretmani	SFR_G	FLAV	ANTH_RG	NBI_G
C	2.69 ± 0.37 ^a	-0.07 ± 0.09 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	6.06 ± 1.32 ^a
C_T1	2.57 ± 0.46 ^a	-0.14 ± 0.10 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	6.88 ± 1.97 ^a
C_T2	2.21 ± 0.50 ^a	-0.14 ± 0.15 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	5.80 ± 1.65 ^a
D	2.46 ± 0.49 ^a	-0.07 ± 0.11 ^a	0.29 ± 0.02 ^a	5.66 ± 1.39 ^a
D_T1	2.56 ± 0.40 ^a	-0.04 ± 0.13 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	5.62 ± 1.80 ^a
D_T2	2.56 ± 0.26 ^a	-0.13 ± 0.06 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	6.41 ± 0.79 ^a
6 dan (24 h nakon inokulacije <i>Trichoderma</i>)				
Tretmani	SFR_G	FLAV	ANTH_RG	NBI_G
C	2.60 ± 0.36 ^a	0.10 ± 0.11 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	4.23 ± 1.04 ^{ab}
C_T1	2.70 ± 0.28 ^a	-0.01 ± 0.12 ^b	0.30 ± 0.02 ^a	5.64 ± 1.68 ^a

6 dan (24 h nakon inokulacije <i>Trichoderma</i>)				
Tretmani	SFR_G	FLAV	ANTH_RG	NBI_G
C_T2	2.79 ± 0.29 ^a	0.04 ± 0.12 ^{ab}	0.30 ± 0.02 ^a	5.32 ± 1.73 ^{ab}
D	2.80 ± 0.57 ^a	0.06 ± 0.10 ^{ab}	0.30 ± 0.02 ^a	5.02 ± 2.02 ^{ab}
D_T1	2.50 ± 0.33 ^a	0.11 ± 0.10 ^{ab}	0.29 ± 0.02 ^a	3.90 ± 0.92 ^b
D_T2	2.58 ± 0.27 ^a	0.04 ± 0.10 ^{ab}	0.29 ± 0.01 ^a	4.79 ± 1.32 ^{ab}
7 dan (48 h nakon inokulacije <i>Trichoderma</i>)				
Tretmani	SFR_G	FLAV	ANTH_RG	NBI_G
C	2.68 ± 0.34 ^a	0.16 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	3.77 ± 0.77 ^a
C_T1	2.68 ± 0.19 ^a	0.18 ± 0.11 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	3.66 ± 1.02 ^a
C_T2	2.47 ± 0.19 ^a	0.18 ± 0.11 ^a	0.31 ± 0.01 ^a	3.42 ± 0.90 ^a
D	2.70 ± 0.35 ^a	0.15 ± 0.09 ^a	0.30 ± 0.02 ^a	3.91 ± 1.02 ^a
D_T1	2.71 ± 0.33 ^a	0.14 ± 0.12 ^a	0.30 ± 0.02 ^a	4.01 ± 1.05 ^a
D_T2	2.71 ± 0.41 ^a	0.09 ± 0.08 ^a	0.29 ± 0.01 ^a	4.30 ± 0.63 ^a
8 dan (72 h nakon inokulacije <i>Trichoderma</i>)				
Tretmani	SFR_G	FLAV	ANTH_RG	NBI_G
C	2.94 ± 0.29 ^a	0.19 ± 0.10 ^a	0.31 ± 0.01 ^a	3.94 ± 0.94 ^a
C_T1	2.81 ± 0.33 ^a	0.17 ± 0.14 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	3.93 ± 1.04 ^a
C_T2	2.83 ± 0.38 ^a	0.18 ± 0.09 ^a	0.31 ± 0.02 ^a	3.95 ± 1.19 ^a
D	2.79 ± 0.43 ^a	0.13 ± 0.12 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	4.29 ± 1.21 ^a
D_T1	2.97 ± 0.42 ^a	0.10 ± 0.09 ^a	0.30 ± 0.01 ^a	4.78 ± 1.07 ^a
D_T2	2.74 ± 0.32 ^a	0.09 ± 0.09 ^a	0.30 ± 0.02 ^a	4.43 ± 0.89 ^a

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.3.2. Parametri razmene gasova i fluorescencije hlorofila

Rezultati merenja parametra razmene gasova i fluorescencije hlorofila, mereni pomoću mobilnog sistema Li-6400XT, prikazani su u tabeli Tabeli 9. Prikazani su vrednosti za 23 i 41 dan, a odabrane su od ponavljanja koja su vršena 21, 22, 23, 41 i 44 dana. Rezultati svih merenja prikazani su u Prilogu 1. Prvi set merenja vršen je 21 dana kada je SWC opao na 15 %.

Takođe, pri vlažnosti zemljišta od 15% je sproveden i drugi set merenja 41 dana, kada su biljke bile u fazi formiranja prvih plodova. Kod biljaka koje su bile podvrgnute tretmanu suše došlo je do značajnog smanjenja većina izmerenih parametra razmene gasova.

Tretmani u kome su biljke bile izložene vodnom deficitu doveo je do značajnog opadanja provodljivosti stoma. U periodu kada je SWC opao na 15 % (23 dan) zatvaranje stoma je dovelo do

opadanja provodljivosti približno za 90 %, i smanjenje intenziteta fotosinteze za oko 80 %. Tokom perioda formiranja prvih plodova tj. 41. dana, provodljivost stoma, u suši je opala za približno 75 %. Zatvaranje stoma delovalo je inhibitorno na intenzitet transpiracije i fotosinteze za približno 70 %.

U periodu kada je nivo SWC opao na 15 % (23 dan) brzina linearnog elektronskog transporta (ETR), u uslovima suše, bila je inhibirana za 40 %. Inhibicija ETR 41 dana je iznosila 30 %.

Intracelularna koncentracija CO₂ u tretmanu suše, 23 dana je opala za približno 30 %, ali nakon formiranja prvih plodova nije bilo statistički značajnih razlika.

Parametri fluorescencije hlorofila, kao što su minimalni i maksimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila, maksimalan kvantni prinos fotohemije fotosistema II kao i nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila nisu se značajno menjali tokom trajanja ogleda. Sa druge strane *T. harzianum* i *T. brevicompactum* su manje uticale na vrednost ovih parametara od tretmana suše. Jedine značajne razlike javile su se 41 dana. *T. harzianum* je kod dobro zalivanih biljaka udvostručila provodljivost stoma, dok je intracelularnu koncentraciju CO₂ povećala za 16 %. *T. brevicompactum* je značajno uticala na nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila i dovela je do njegovog povećanja od 15 %.

U periodu kada je nivo SWC iznosio 15 % SWC (23 dan), trenutna efikasnost korišćenja vode (WUE) je imala veće vrednosti, za oko dva puta, kod biljaka koje su bile izložene dejstvu suše u odnosu na biljke dobro opskrbljene vodom. Tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imali statistički značajne efekte na ispitivani parametar, ali je *T. harzianum* pokazala blagi trend stimulacije za WUE u tretmanima suše. Vrednosti WUE 41 dana su bile veće kod optimalno zalivanih biljaka za 74 % u poređenju sa tretmanom suše. *T. brevicompactum* je stimulatивно delovala na WUE kod biljaka izloženih vodnom deficitu povećavši ga skoro tri puta.

Izračunavanjem unutrašnje efikasnosti korišćenja vode (WUE_i) dobijeni su identični trendovi kao i kod WUE. U periodu kada je nivo SWC opao na 15 % (23 dan) WUE_i biljaka izloženih dejstvu suše je bila od dva i po do četiri puta veća u poređenju sa kontrolom. Tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imali statistički značajnih efekata na WUE_i ali je *T. harzianum* imala blagi trend da stimuliše WUE_i u tretmanima suše. WUE_i je bio redukovano 41 dana u tretmanu suše za 60 % u poređenju sa kontrolom. *T. harzianum* je inhibitorno delovala na ispitivani parametar optimalno zalivanih biljaka smanjivši ga za 43 %, dok je u tretmanu suše *T. Brevicompactum* imala suprotan efekat, povećavši WUE_i čak tri puta.

Efikasnost karboksilacije optimalno zalivanih biljaka 23. dana bila je veća u proseku za oko 80 % u odnosu na biljke podvrgnute dejstvu suše. U ispitivanom periodu kod biljaka izloženih dejstvu suše *T. harzianum* i *T. brevicompactum* su stimulatивно delovale na ispitivani parametar, povećavši ga dva puta. Efikasnost karboksilacije je 41 dana bila veća kod biljaka dobro opskrbljenih vodom za 95 % u odnosu na biljke u suši. Tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imali statistički značajnih efekata ali su 41 dana pokazale blage stimulatívne efekte na ispitivani parametar.

Tabela 9. Parametri razmene gasova mereni pomoću mobilnog sistema Li-6400XT: E - intenzitet transpiracije, A - intenzitet fotosinteze, Ci - intracelularna koncentracija CO₂, NPQ - nefotohemijisko gašenje fluorescencije hlorofila, gs - provodljivost stoma, ETR - brzina linearnog elektronskog transporta kroz PS II, Fo - minimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila, Fm - maksimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila i Fv/Fm - maksimalan kvantni prinos fotohemije fotosistema II, WUE - trenutna efikasnost korišćenja vode (μmol CO₂ mmol⁻¹ H₂O), WUEi - unutrašnja efikasnost korišćenja vode (μmol CO₂ mol⁻¹ H₂O) i A/Ci - efikasnost karboksilacije. Parametri su mereni pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

23 dan (dostignut nivo od 15 % SWC)												
Tretmani	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	Gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Ci (μmol CO ₂ mol ⁻¹ l)	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR (μmol m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	WUE	WUEi	A/Ci × 10 ⁻²
C	17.23 ± 2.61 ^a	0.78 ± 0.08 ^a	339.27 ± 7.27 ^a	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.34 ± 0.08 ^b	132.70 ± 12.15 ^a	8.06 ± 0.60 ^a	2.19 ± 0.38 ^b	23.71 ± 2.71 ^b	5.23 ± 0.80 ^a
C_T1	17.69 ± 2.73 ^a	0.76 ± 0.11 ^a	339.20 ± 8.36 ^a	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.31 ± 0.12 ^b	136.65 ± 14.16 ^a	7.99 ± 0.54 ^a	2.26 ± 0.28 ^b	24.66 ± 3.29 ^b	5.21 ± 0.75 ^a
C_T2	17.06 ± 2.28 ^a	0.80 ± 0.06 ^a	343.45 ± 6.86 ^a	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.36 ± 0.11 ^b	133.63 ± 12.40 ^a	8.45 ± 0.77 ^a	2.01 ± 0.21 ^b	21.31 ± 2.97 ^b	4.94 ± 0.77 ^a
D	2.08 ± 0.80 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	256.06 ± 69.44 ^b	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.54 ± 0.11 ^a	73.46 ± 7.73 ^b	0.51 ± 0.21 ^b	4.55 ± 1.97 ^a	98.38 ± 46.34 ^a	0.92 ± 0.39 ^b
D_T1	2.91 ± 1.16 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	229.43 ± 44.68 ^b	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.60 ± 0.11 ^a	78.00 ± 8.61 ^b	0.61 ± 0.18 ^b	5.05 ± 1.54 ^a	104.23 ± 24.10 ^a	1.39 ± 0.59 ^b
D_T2	2.12 ± 1.21 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	255.00 ± 35.17 ^b	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.60 ± 0.14 ^a	77.89 ± 13.38 ^b	0.48 ± 0.21 ^b	4.70 ± 1.22 ^a	87.07 ± 19.50 ^a	0.89 ± 0.42 ^b
41 dan (formiranje prvih plodova)												
Tretmani	A (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	Gs (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Ci (μmol CO ₂ mol ⁻¹ l)	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR (μmol m ⁻² s ⁻¹)	E (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	WUE	WUEi	A/Ci × 10 ⁻²
C	8.75 ± 1.34 ^a	0.16 ± 0.04 ^b	280.78 ± 27.99 ^d	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.86 ± 0.33 ^{cd}	79.83 ± 10.01 ^a	3.48 ± 1.62 ^a	2.35 ± 0.74 ^a	51.48 ± 8.18 ^a	3.00 ± 0.37 ^a
C_T1	10.28 ± 1.89 ^a	0.35 ± 0.08 ^a	324.83 ± 16.49 ^{ab}	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.46 ± 0.23 ^e	84.01 ± 19.23 ^a	6.41 ± 2.85 ^a	1.77 ± 0.75 ^{ab}	29.42 ± 3.62 ^b	3.43 ± 0.40 ^a
C_T2	9.10 ± 1.97 ^a	0.20 ± 0.10 ^{ab}	300.35 ± 27.96 ^{bcd}	550.00 ± 0.00 ^a	3000.00 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.00 ^a	1.60 ± 0.30 ^{de}	75.79 ± 7.73 ^a	4.68 ± 2.60 ^a	2.10 ± 0.37 ^a	63.52 ± 14.64 ^a	3.18 ± 0.39 ^a

41 dan (formiranje prvih plodova)												
Tretmani	A ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Gs ($\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$)	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2}$ s^{-1})	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}$ s^{-1})	WUE	WUEi	A/Ci \times 10^{-2}
D	0.92 ± 0.86^b	0.03 ± 0.01^c	346.81 ± 29.61^a	550.00 ± 0.00^a	3000.00 ± 0.00^a	0.83 ± 0.00^a	2.15 ± 0.14^b	58.55 ± 7.38^b	0.93 ± 0.20^b	0.61 ± 0.12^c	20.44 ± 4.11^b	0.14 ± 0.06^b
D_T1	0.94 ± 0.43^b	0.03 ± 0.01^c	336.06 ± 42.55^{ac}	550.00 ± 0.00^a	3000.00 ± 0.00^a	0.83 ± 0.00^a	2.16 ± 0.14^{abc}	64.07 ± 18.79^{ab}	0.82 ± 0.41^b	0.89 ± 0.25^{bc}	28.81 ± 7.62^b	0.23 ± 0.10^b
D_T2	1.50 ± 0.91^b	0.02 ± 0.02^c	347.23 ± 63.23^a	550.00 ± 0.00^a	3000.00 ± 0.00^a	0.83 ± 0.00^a	2.48 ± 0.21^a	69.21 ± 7.67^{ab}	0.76 ± 0.61^b	1.73 ± 0.70^{ab}	62.62 ± 24.92^a	0.48 ± 0.29^b

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.3.3. Fotosintetički parametri

Rezultati merenja parametra fotosinteze i fluorescencije hlorofila, primenom portabl aparata MultispeQ V2.0, pokazuju da su efekti suše bili značajniji u odnosu na efekte *T. harzianum* i *T. brevicompactum* (Tabela 10).

Provodljivost za protone (gH^+) 27. dana (neposredno nakon opadanja SWC na 15 %), u tretmanu suše bila je niža za 60 % u odnosu na optimalno zalivane biljke. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale značajnih efekata kod dobro zalivanih biljaka, ali kod biljaka koje su bile podvrgnute dejstvu suše *T. harzianum* je dovela do povećanja gH^+ za 50 %. Provodljivost protona je stimulisana 41. dana (period formiranja prvih plodova), kod biljaka podvrgnutih suši za 44 %. Efekti izabranih sojeva gljiva kod optimalno zalivanih biljaka ni u ovom vremenskom intervalu nisu imali značajnih efekata, ali je *T. harzianum* u uslovima suše dovela do značajnog smanjenja gH^+ za 32 %.

Linearni elektronski transport (LEF) kod tretmana suše 27. dana, smanjen je za 36 % u odnosu na kontrolu. Izabrani izolati gljiva u ovom vremenskom intervalu nisu imali značajnih efekata na ispitivani parametar. Različiti režimi zalivanja 41. dana nisu značajno uticali na LEF. Jedine značajne razlike u ispitivanom vremenskom periodu primećene su u suši u tretmanu sa *T. harzianum* koja je prouzrokovala smanje LEF za 30 %.

Režimi zalivanja 27 dana u tretmanu suše, nisu imali značajnih efekata na elektrohromni pomeraj (ECSt) Sa druge strane *T. harzianum* je kod oba režima zalivanja dovela do smanjenja ECSt i to kod optimalno zalivanih biljaka za 24 % i za 17 % kod biljaka koje su bile podvrgnute suši. Tokom perioda formiranja plodova 41. dana došlo je do smanjenja ECTs kod biljaka koje su podvrgnute suši za 50 % u odnosu na kontrolu. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* u ovom vremenskom intervalu nisu imale značajnih efekata.

Na ostale ispitivane parametre poput nefotohemijskog gašenja fluorescencije hlorofila (NPQ), otvorenosti reakcionog centra fotosistema 1 (PS1) i relativnog sadržaja hlorofila (RC), izabrani izolati gljiva nisu imali značajnih efekata. Neposredno nakon dostizanja 15 % SWC (27 dan) u tretmanu suše nivo NPQt je bio viši za 58 %, otvorenost PS1 za 88 % i RC za 26 % u odnosu optimalno zalivane biljke. Za vreme perioda formiranja plodova (41 dan) nivo PS1 se povećao za 72 %, a RC za 28 % u odnosu na biljke dobro opskrbljene vodom. Nivo NPQt se nije značajno menjao između dva režima zalivanja.

Tabela 10. Parametri fotosinteze i fluorescencije hlorofila mereni primenom portabl aparata MultispeQ V2.0 pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

ECSt - elektrohromni pomeraj; gH^+ - provodljivost za protone; LEF - linearni elektronski transport; PS1 - otvorenost reakcionog centara fotosistema 1; NPQ - nefotohemijско gašenje fluorescencije hlorofila; RC - relativni sadržaj hlorofila.

27 dan						
Tretmani	ECSt (mAU)	gH^+	LEF	NPQt	PS1	RC
C	0.00112 ±	123.56 ±	124.99 ±	0.77 ±	1.87 ±	54.85 ±
	0.00015 ^{ab}	21.04 ^a	13.66 ^a	0.05 ^b	0.03 ^b	0.69 ^{bc}
C_T1	0.00085 ±	147.48 ±	127.27 ±	0.74 ±	1.81 ±	56.84 ±
	0.00001 ^c	17.55 ^a	6.43 ^a	0.07 ^b	0.31 ^b	1.28 ^b
C_T2	0.00107 ±	137.55 ±	125.03 ±	0.75 ±	1.67 ±	51.93 ±
	0.00007 ^b	12.65 ^a	4.62 ^a	0.05 ^b	0.87 ^b	1.79 ^c
D	0.00132 ±	48.90 ±	80.10 ±	1.22 ±	3.51 ±	69.17 ±
	0.00005 ^a	9.82 ^c	10.26 ^b	0.26 ^a	0.22 ^a	1.27 ^a
D_T1	0.00109 ±	73.10 ±	88.34 ±	0.98 ±	3.63 ±	70.09 ±
	0.00014 ^b	8.36 ^b	1.60 ^b	0.15 ^a	0.21 ^a	0.93 ^a
D_T2	0.00121 ±	58.52 ±	84.45 ±	1.16 ±	3.56 ±	70.03 ±
	0.00010 ^{ab}	12.56 ^{bc}	7.87 ^b	0.06 ^a	0.24 ^a	1.11 ^a
41 dan						
Tretmani	ECSt (mAU)	gH^+	LEF	NPQt	PS1	RC
C	0.00163 ±	73.39 ±	116.21 ±	1.11 ±	1.56 ±	55.31 ±
	0.00021 ^a	10.27 ^c	9.67 ^a	0.06 ^b	0.31 ^a	2.38 ^b
C_T1	0.00157 ±	84.80 ±	117.56 ±	1.25 ±	1.83 ±	53.26 ±
	0.00015 ^a	16.09 ^{bc}	13.06 ^{ab}	0.15 ^{ab}	0.43 ^a	1.95 ^b
C_T2	0.00135 ±	87.57 ±	119.74 ±	1.07 ±	1.47 ±	54.42 ±
	0.00008 ^a	5.30 ^{abc}	8.01 ^a	0.09 ^b	0.37 ^a	2.68 ^b
D	0.00081 ±	106.12 ±	115.62 ±	1.14 ±	2.68 ±	70.90 ±
	0.00012 ^b	18.24 ^{ab}	13.78 ^{ab}	0.08 ^b	0.29 ^b	0.55 ^a
D_T1	0.00074 ±	72.42 ±	81.08 ±	1.55 ±	4.98 ±	66.05 ±
	0.00039 ^b	6.94 ^c	7.00 ^c	0.18 ^a	0.70 ^a	11.08 ^a
D_T2	0.00077 ±	113.39 ±	99.63 ±	1.11 ±	3.09 ±	69.22 ±
	0.00011 ^b	3.83 ^a	5.60 ^b	0.14 ^b	0.17 ^b	3.07 ^a

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.3.4. Određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata

Koncentracije fotosintetičkih pigmenata su određivane i biohemijskom metodom, dvadeset i šestog dana kada su uzorci prikupljeni i pripremljeni za analiziranje. Režim zalivanja je imao veći uticaj nego sami tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* (Tabela 11).

Koncentracija svih fotosintetičkih pigmenata bile su veće kod biljaka koje su bile podvrgnute dejstvu suše. Koncentracija hlorofila a, hlorofila b, hlorofil a+b i karotenoida redom su bile veće za 41%, 21 %, 42 % i 18 % u odnosu na optimalno zalivane biljke.

Tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imali značajnih efekata na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata. Tretmani sa izabranim izolatima gljiva, kod biljaka dobro opskrbljenih vodom, doveli su do blagog trenda smanjenja koncentracije hlorofila b i karotenoida. Kod biljaka koje su bile izložene suši u tretmanu sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* primetan je trend povećanja koncentracije hlorofila b, dok je *T. harzianum* dovela i do blagog povećanja koncentracije karotenoida.

Tabela 11. Koncentracije fotosintetičkih pigmenata merene nakon I žetve pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

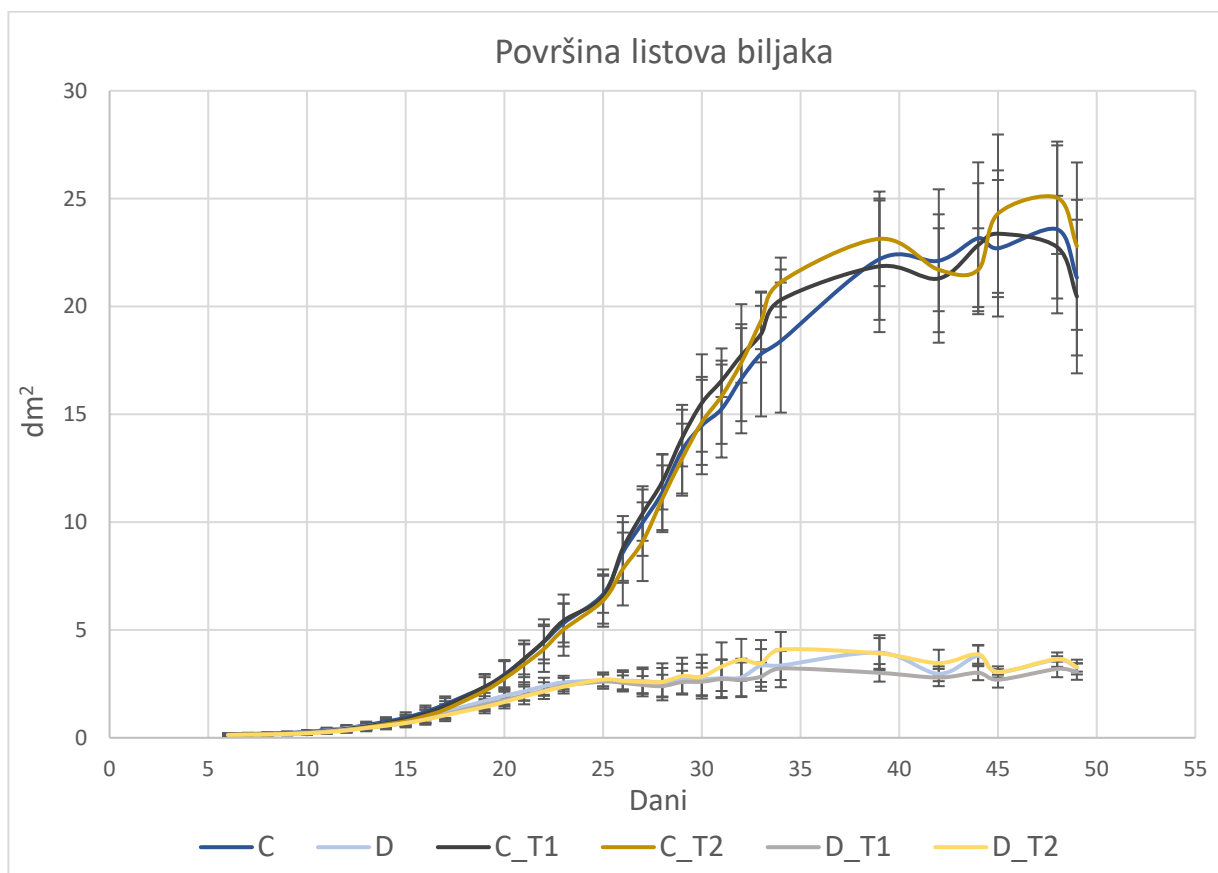
Tretmani	Hlorofil a (mg/m ²)	Hlorofil b (mg/m ²)	Hlorofil a+b (mg/m ²)	Karotenoidi (mg/m ²)
C	339.08 ± 32.63 ^b	129.78 ± 8.45 ^{bc}	459.95 ± 5.68 ^a	108.68 ± 4.61 ^a
C_T1	348.69 ± 13.72 ^b	93.63 ± 14.17 ^c	439.53 ± 14.30 ^a	106.11 ± 2.48 ^a
C_T2	324.07 ± 24.21 ^b	100.90 ± 22.69 ^c	428.23 ± 41.56 ^a	95.862 ± 7.55 ^a
D	477.08 ± 40.44 ^a	156.88 ± 25.57 ^{ab}	649.56 ± 31.23 ^b	127.90 ± 4.02 ^b
D_T1	495.68 ± 60.24 ^a	192.79 ± 26.21 ^a	677.19 ± 54.67 ^b	144.01 ± 8.53 ^b
D_T2	459.93 ± 67.44 ^a	167.54 ± 40.42 ^{ab}	630.49 ± 108.43 ^b	127.48 ± 13.94 ^b

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu (p<0.05).

4.3.5. Snimanje morfometrijskih parametara RBG kamerom

Morfometrijski parametri poput lisne površine biljaka, snimani su RGB kamerom pokazuju da je nedostatak vode doveo do smanjenje površine listova biljaka (Slika 34). U Prilogu 2. prikazani su testovi značajnosti. Kako je trajanje uticaja suše produženo ta razlika se povećavala da bi na kraju ogleđa iznosila i do 85 %. Biljke koje su bile podvrgnute dejstvu suše od 21 dana tj. od perioda kada je SWC opao na 15 %, pa do kraja ogleđa nisu uspele da udvostruče lisnu površinu, za razliku od optimalno zalivanih biljaka koje su i do deset puta uvećale lisnu površinu. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale značajne efekte na površinu listova biljaka, ali je primećen trend blagog stimulativnog efekta *T. brevicompactum* na površinu listova kod oba režima zalivanja od 33 dana tj. od momenta početka cvetanja. Nakon 42 dana, odnosno početkom formiranja prvih

plodova, javlja se trend blagog smanjenja površine listova u određenim tačkama merenja, kod biljaka koje su dobro snabdevene vodom. Ovo je verovatno posledica dostignute veličine biljaka, zbog čega je dolazilo do njihovog oštećenja na platformi za fenotipizaciju, usled čega je i eksperiment ubrzo morao da bude prekinut.



Slika 34. Lisna površina biljaka snimana RGB kamerom pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

4.3.6. Automatska detekcija fluorescencija hlorofila na platformi za fenotipizaciju

Rezultati snimanja maksimalnog kvantnog prinosa fotohemije PS II, nefotohemijskog gašenja fluorescencije hlorofila, maksimalnog kvantnog prinosa PS II u mraku, koeficijenta fotohemijskog gašenja, stvarne fotohemijske efikasnosti i fluorescencija hlorofila u ravnotežnom stanju, ukazuju, da je režim zalivanja imao veće efekte na ispitivane parametre, nego tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. U Prilogu 2. prikazani su testovi značajnosti.

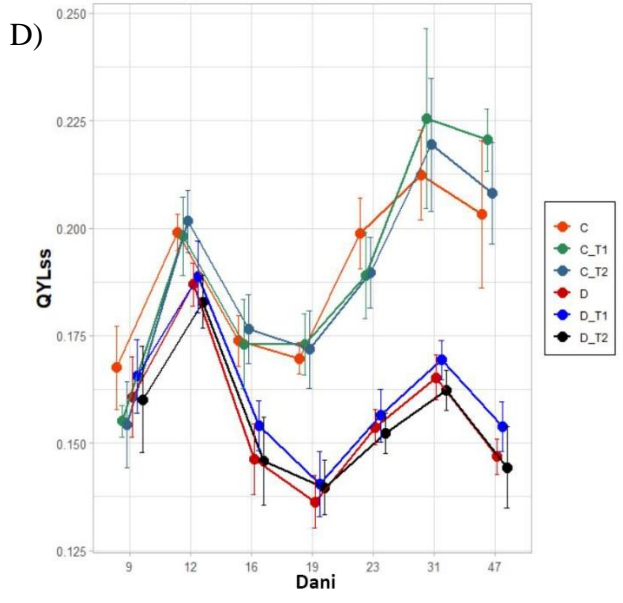
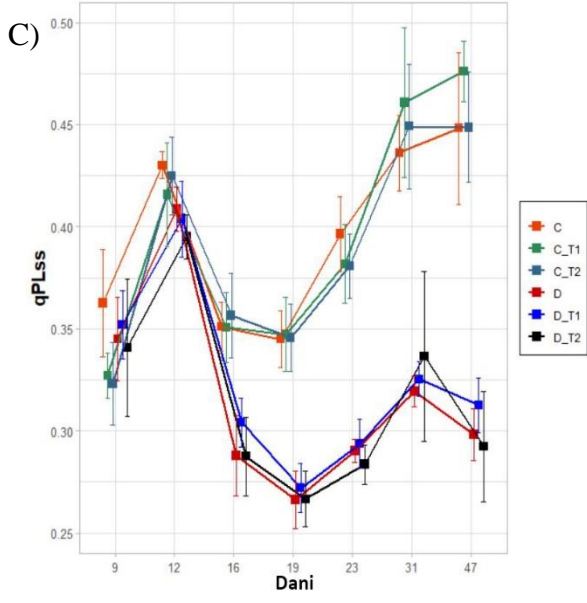
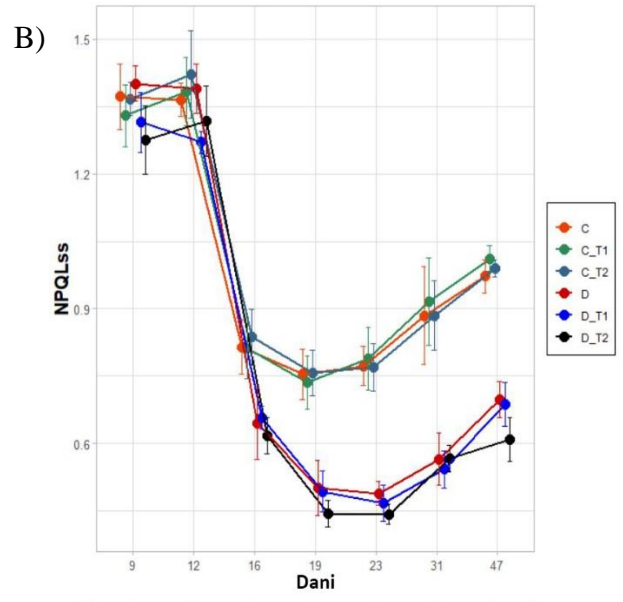
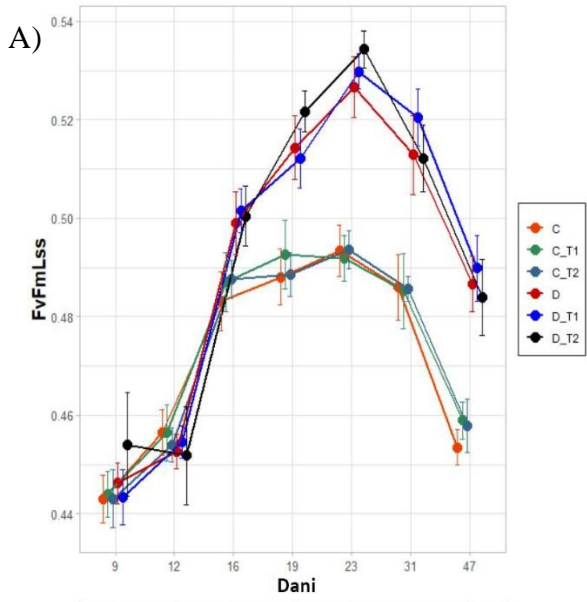
Prve razlike maksimalnog kvantnog prinosa PS II (Fv/Fm_{lss}) javljaju se nakon 16 dana od momenta prebacivanja biljaka na platformu (Slika 35a). Biljke koje su bile izložene suši imale su za oko 5 % veće vrednosti ispitivanog parametra u odnosu na optimalno zalivane biljke. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale značajne efekte na parametar Fv/Fm_{lss}.

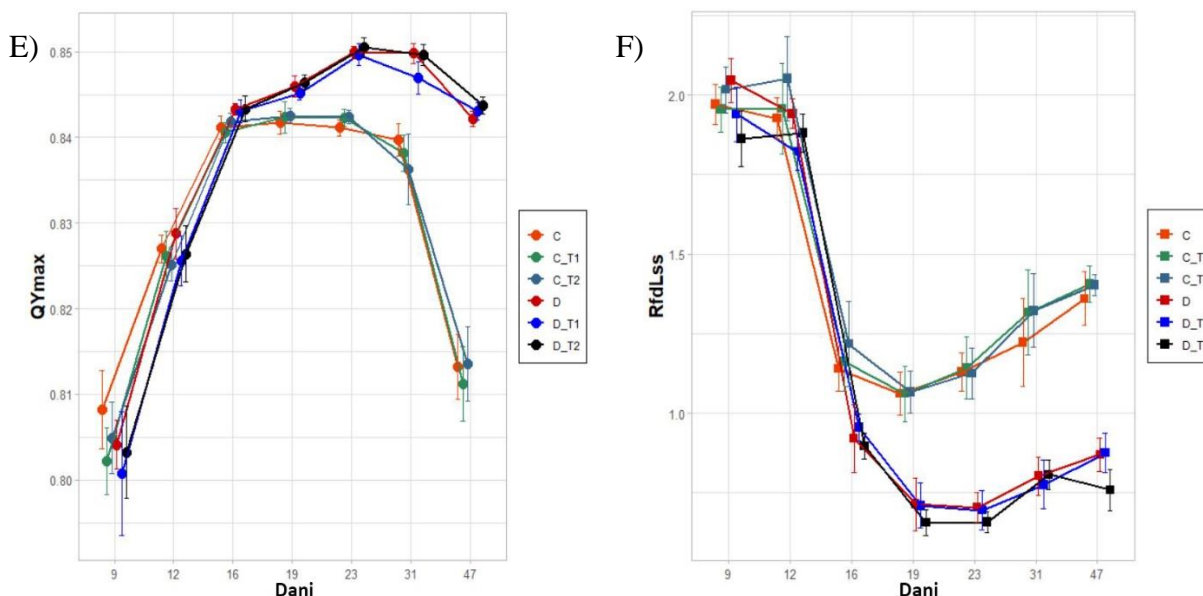
Značajni efekti gljiva *Trichoderma* na nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila (NPQ_{Lss}) su se pojavili nakon devet dana (Slika 35b). *T. harzianum* i *T. brevicompactum* u uslovima suše su dovele do smanjenja vrednosti NPQ_{Lss} za 10 %. Dvanaestog dana jedina značajna razlika se primećuje u tretmanu suše u prisustvu *T. harzianum* koja je smanjila ispitivanu vrednost za 12 %. Nakon 14 dana javljaju se statistički značajne razlike između dva režima zalivanja, dok efekti gljiva *Trichoderma* više nisu statistički značajni. Od dvanaestog dana sve do kraja ogleđa nivo NPQ_{Lss} je bio niži kod biljaka podvrgnutih suši u odnosu na optimalno zalivane biljke. Inhibicija se kretala u rasponu od približno 20 % pa sve do 35 %.

Parametri, koeficijent fotohemijskog gašenja (qP_{lss}) i stvarna fotohemijska efikasnost (Qy_{lss}) imali su identičan trend (Slika 35c, d). Devetog dana od momenta prebacivanja biljaka na platformu, značajne razlike vrednosti qP_{lss} i Qy_{lss} postojale su u tretmanu sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* kod optimalno zalivanih biljaka. Izabrani izolati gljiva su imali inhibitorni efekat na ispitivane parametre, čiju vrednost su smanjili za 11 % u odnosu na kontrolu. Značajne razlike, nakon dvanaestog dana, postojale su samo između dva režima zalivanja. Biljke izložene suši imale su do 28 % niže vrednosti qP_{lss} i Qy_{lss} u odnosu na optimalno zalivane biljke tokom trajanja ogleđa.

Sve razlike između tretmana u nivou maksimalnog kvantnog prinosa PS II u mraku (QY_{max}) bile su ispod 5 % (Slika 35e).

Fluorescencije hlorofila u ravnotežnom stanju (Rfd_{lss}) zabeležena je devetog dana u tretmanu sa *T. brevicompactum* kod biljaka koje su bile podvrgnute suši (Slika 35f). *T. brevicompactum* je inhibitorno delovala na ispitivani parametar, čiju vrednost je smanjila za 8 %. Od šesnaestog dana trajanja ogleđa biljke koje su bile izložene suši u odnosu na kontrolu imale su niže vrednosti Rfd_{lss} od 17 % do 35 %.





Slika 35. Maksimalan kvantni prinosa PS II u mraku - Fv/Fm_{lss} (A), nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila - NPQ (B), koeficijent fotohemijskog gašenja - qP_{lss} (C), stvarna fotohemijska efikasnost - Qy_{lss} (D), maksimalan kvantni prinos PS II u mraku - QY_{max} (E) i fluorescencija hlorofila u ravnotežnom stanju - Rfd_{lss} (F) snimani pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

4.3.7. Hiperspektralne analize

Hiperspektralne analize sprovedene VNIR kamerom, takođe pokazuju, da je suša imala značajnije efekte na ispitivane parametre od efekata *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. U Prilogu 2. prikazani su testovi značajnosti.

Indeks antocijana (ANTH) se nije značajno menjao između tretmana do 23 dana (Slika 36a). Međutim, 23 dana, kada je SWC opao na 15 %, u tretmanu suše dolazi do značajnog povećanja ANTH u odnosu na biljke dobro opskrbljene vodom. Najveća razlika zabeležena je dvadeset šestog dana i iznosila je 52 %. Pred cvetanje biljaka, ova razlika polako počinje da se smanjuje, do samog kraja ogleada. Blaga stimulacija sa *T. harzianum* primećena je trideset prvog i četrdesetog dana kod biljaka koje su bile izložene suši, međutim *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale značajnih efekata na ispitivani parametar.

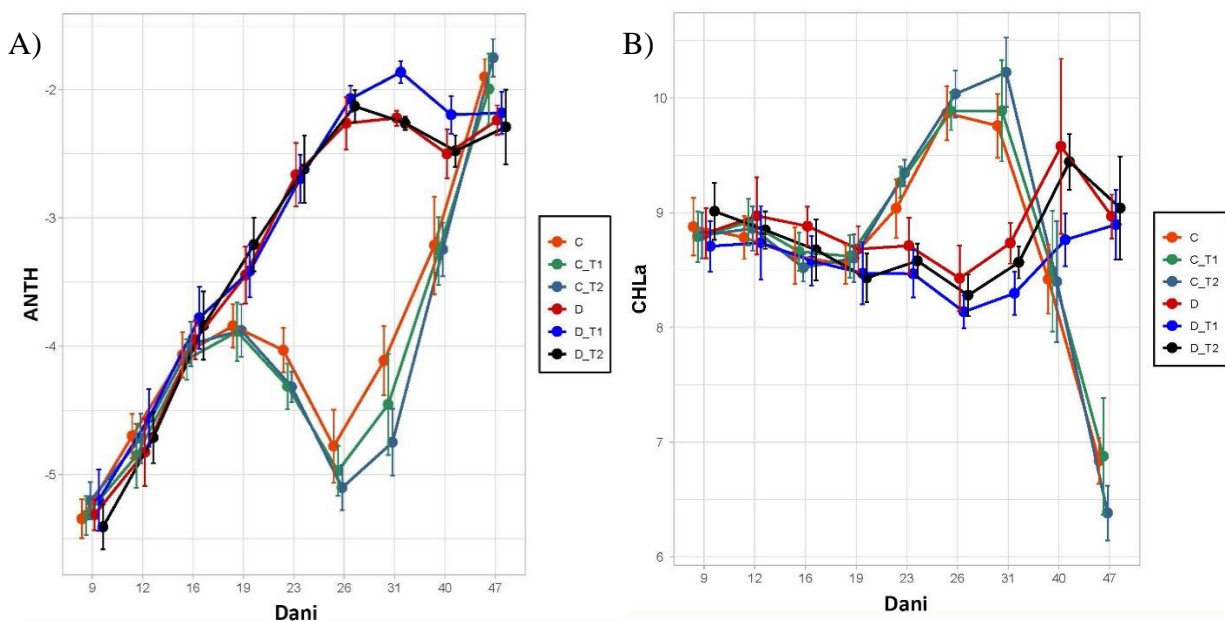
Do značajnog smanjenja indeksa refleksije hlorofila a (CHLa), koji je dostizao do 13 % kod biljaka izloženih suši, došlo je u periodu od dvadeset trećeg do trideset prvog dana. Tretmani sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu značajno uticali CHLa (Slika 36b).

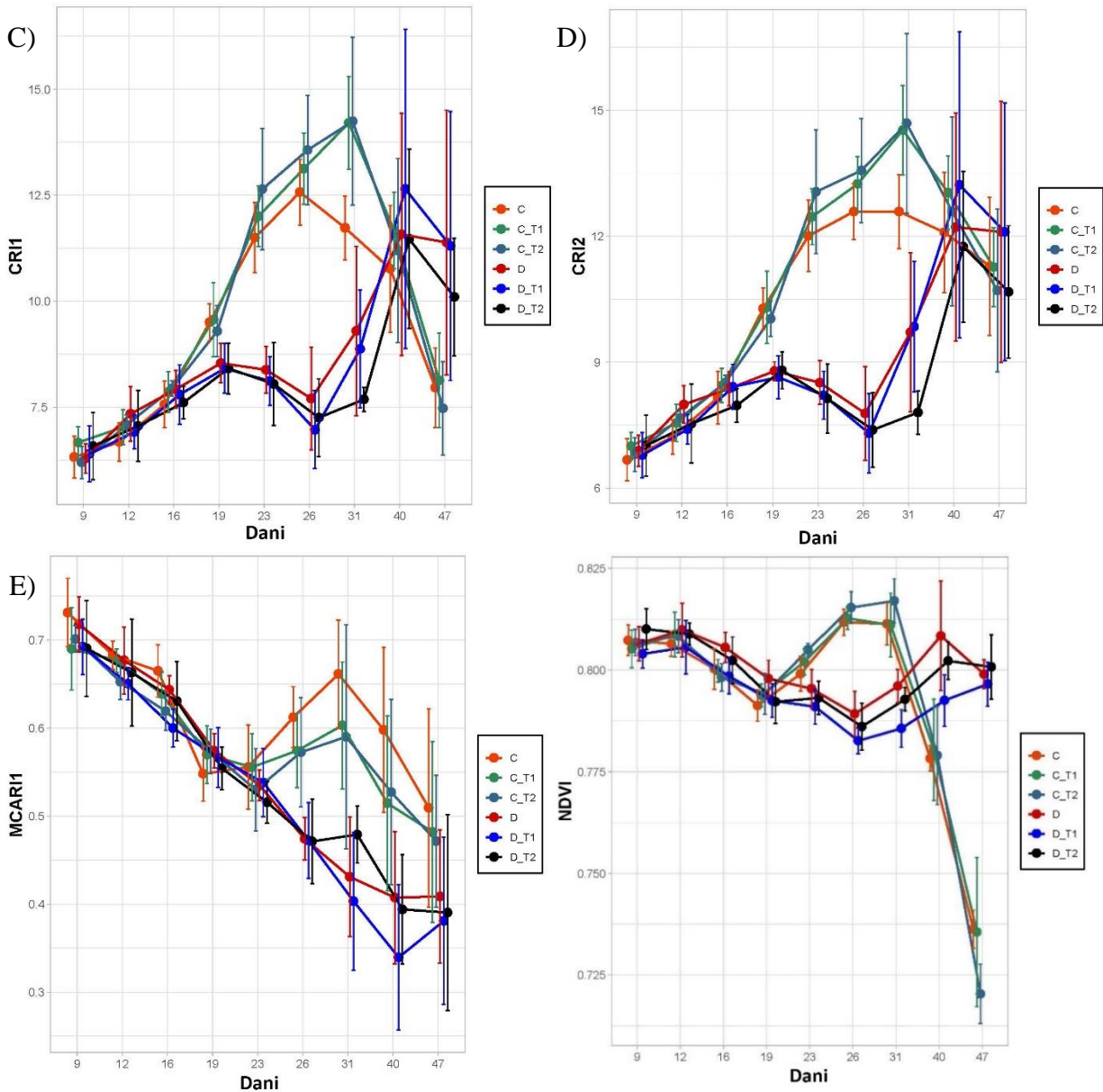
Indeksi refleksije karotenoida I (CRI1) i II (CRI2) su imale identične trendove u svim tretmanima (Slika 36c, d). Niže vrednosti zabeležene su kod biljaka izloženih suši. Ove promene zabeležene su u periodu od devetnaestog do trideset prvog dana. CRI1 i CRI2 u spomenutom vremenskom

intervalu su opadali u suši od 15 % do 37 % u poređenju sa kontrolom. Jedina blaga stimulacija *T. brevicompactum* primećena je trideset prvog dana, međutim značajnih razlika u tretmanima sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nije bilo.

Prve značajne razlike modifikovanog indeksa odnosa apsorpcije hlorofila I (MCARI1) su utvrđene dvadeset šestog dana između dva režima zalivanja. Biljke podvrgnute suši imale su niže vrednosti MCARI1 približno za 23 % do kraja oglea (Slika 36e). Tretmani sa izabranim izolatima gljiva nisu imali statistički značajne efekte na ispitivani parametar, ali od šesnaestog dana su ipak primećeni blagi efekti *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. *T. harzianum* je inhibitorno delovala na parametar MCARI1 kod biljaka izloženih suši, dok je *T. brevicompactum* izazivala isti efekat, ali kod optimalno zalivanih biljaka.

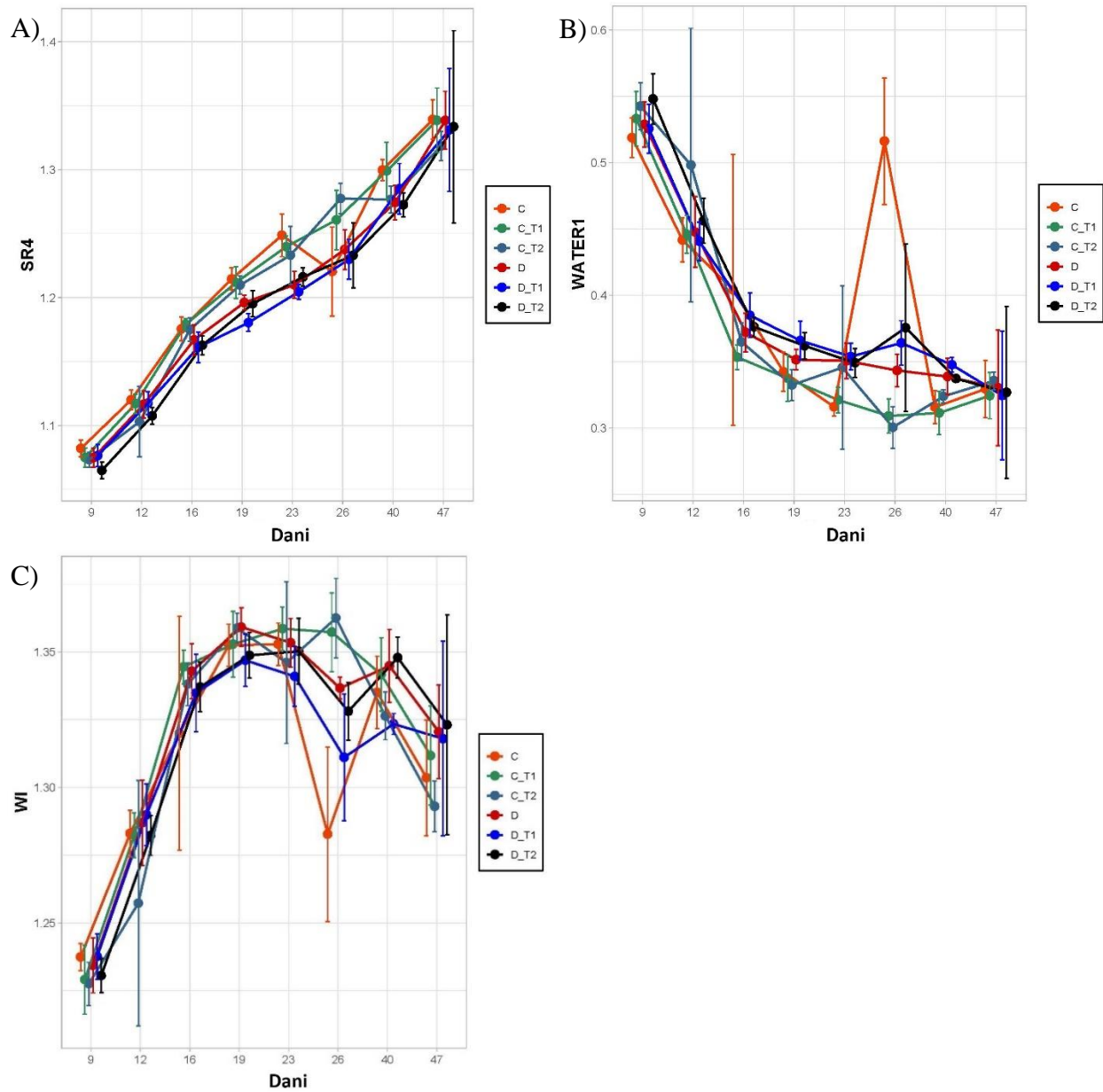
Između svih tretmana modifikacije za vegetacijski indeks normalizovanih razlika (NDVI) nisu iznosile više od 5 % (Slika 36f). Parametar NDVI je od dvadeset šestog dana sve do kraja oglea imao tendenciju opadanja kod svih biljaka koje su tretirane sa *T. harzianum*.





Slika 36. Parametri snimani VNIR kamerom indeks antocijana - ANTH (A), indeks refleksije hlorofila a - CHLa (B), indeks refleksije karotenoida I - CRI-1 (C), indeks refleksije karotenoida II - CRI-2 (D) i modifikovani indeks odnosa apsorpcije hlorofila I - MCARI1 (E), vegetacijski indeks normalizovanih razlika - NDVI (F) pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

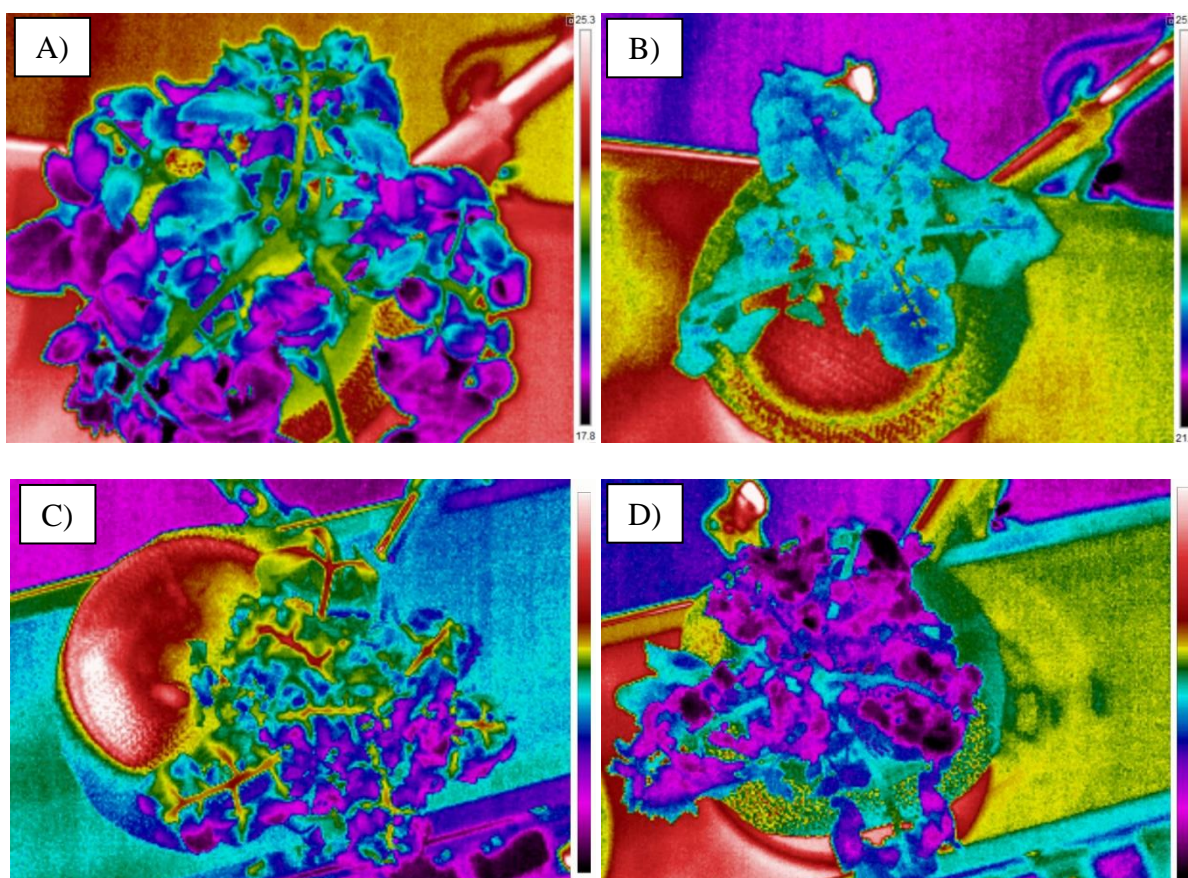
Hiperspektralne analize sprovedene SWIR kamerom pokazuju da različiti tretmani nisu statistički značajno uticali na ispitivane parametre poput jednostavni indeks odnosa vode, indeksa refleksije vode-1 i indeksa vode (Slika 37). Dinamika promena između svih tretmana tokom ispitivanog perioda nije iznosila više od 5 %.



Slika 37. Parametri snimani SWIR kamerom jednostavni indeks odnosa vode - SR4 (A), indeks refleksije čiste vode - WATER1 (B) i indeks refleksije vode u zavisnosti od sadržaja vode u biljkama - WI (C) pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

4.3.8. Snimanje termalnom kamerom

Rezultati snimanja temperature lista termalnom kamerom (Slika 38) pokazuju da nije bilo statistički značajnih razlika između tretmana petog dana (2h pre početka inokulacije *Trichoderma*) kao ni šestog dana (24 h nakon inokulacije *Trichoderma*) Tabela 12. Značajne razlike su uočene 26 dana (I žetva) kod biljaka podvrgnutih dejstvu suše čija temperatura je bila za oko 17 % viša u odnosu na optimalno zalivane biljke. Nakon 47 dana (II žetva) značajne razlike su takođe prisutne kod biljaka izloženih suši, čija temperatura je viša za oko 10 % u odnosu na optimalno zalivane biljke. U navedenom vremenskom periodu primećeno je da *T. harzianum* u tretmanu suše značajno snižava temperaturu biljaka za 2.5 procenta, u odnosu na tretman suše bez dodatka gljiva roda *Trichoderma*.



Slika 38. Snimanje biljaka pomoću termalne kamere FLIR E60. Termalna fotografija optimalno zalivane biljke snimljena 26 dana A); termalna fotografija biljke izložene dejstvu suše snimljena 26 dana B); termalna fotografija biljke izložene dejstvu suše snimljena 47 dana C); termalna fotografija biljke izložene dejstvu suše koja je tretirana sa *T. harzianum* snimljena 47 dana D).

Tabela 12. Temperature lista merene termalnom kamerom pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

5 dan (2h pre početka inokulacije <i>Trichoderma</i>)	
Tretmani	Temperatura lista (°C)
C	21.25 ± 0.59 ^a
C_T1	21.04 ± 0.62 ^a
C_T2	21.32 ± 0.34 ^a
D	21.05 ± 0.39 ^a
D_T1	21.16 ± 0.68 ^a
D_T2	21.43 ± 0.78 ^a
6 dan (24 h nakon inokulacije <i>Trichoderma</i>)	
Tretmani	Temperatura lista (°C)
C	20.01 ± 0.49 ^a
C_T1	19.92 ± 0.48 ^a
C_T2	20.25 ± 0.53 ^a
D	20.09 ± 0.49 ^a
D_T1	20.01 ± 0.68 ^a
D_T2	20.44 ± 0.66 ^a
26 dan (I žetva)	
Tretmani	Temperatura lista (°C)
C	19.66 ± 0.67 ^b
C_T1	19.65 ± 0.64 ^b
C_T2	19.63 ± 0.77 ^b
D	23.07 ± 0.23 ^a
D_T1	23.07 ± 0.49 ^a
D_T2	23.15 ± 0.20 ^a
47 dan (II žetva)	
Tretmani	Temperatura lista (°C)
C	22.29 ± 0.67 ^d
C_T1	22.16 ± 0.92 ^d
C_T2	22.88 ± 0.80 ^c
D	24.47 ± 0.56 ^a
D_T1	23.87 ± 0.27 ^b
D_T2	24.46 ± 0.54 ^a

4.3.9. Sveža i suva masa listova, stabla i korena

Sveža masa listova nakon 26 dana (I žetva) u tretmanu šuše iznosila je oko 85 % od vrednosti kod optimalno zalivanih biljaka (Tabela 13). Step en redukcije sveže masa stabla i korena kod biljka izloženih vodnom deficitu iznosio je 75 % u poređenju sa kontrolom. Suva masa listova kod biljaka dobro opskrbljenih vodom je bila za 80 % veća u poređenju sa tretmanom šuše, dok su suva masa stabla i korena bile veće za 55 % i 65 %. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale statistički značajne efekte na ispitivane parametre. Primećeno je blago stimulatивно delovanje *T. harzianum* na većinu ispitivanih parametara, ali je iznosilo manje od 5 %. Sa druge strane *T. brevicompactum* je delovala blago inhibitorno na većinu ispitivanih parametara.

Nakon 47 dana (II žetve) sveža masa listova u tretmanu šuše je bila inhibirana za oko 80 % u poređenju sa kontrolom, dok su sveže mase stabla i korena redukovane za 90 %. Step en inhibicije suve mase listova, stabla i korena kod biljaka izloženih suši iznosio je oko 85 % u poređenju sa kontrolom (Tabela 13).

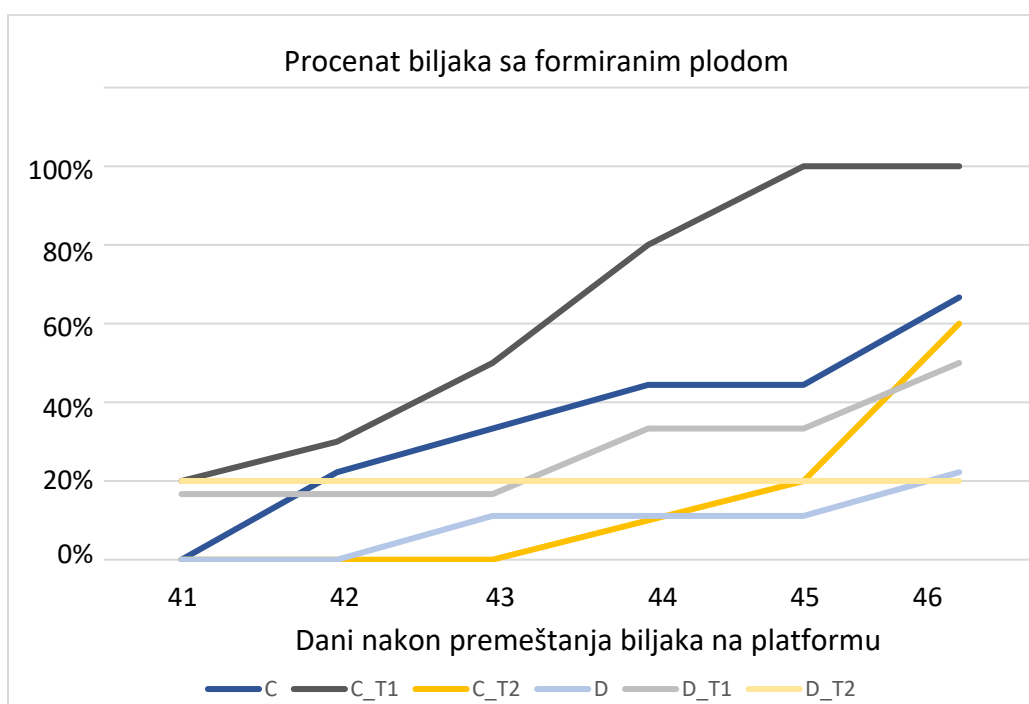
Tabela 13. Sveža i suva masa listova, stabla i korena nakon I i II žetve, određena pri različitim tretmanima optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

26 dan (I žetva)						
Tretmani	Sveža masa lista (g)	Sveža masa stable (g)	Sveža masa korena (g)	Suva masa lista (g)	Suva masa stable (g)	Suva masa korena (g)
C	144.50 ± 19.74 ^a	21.08 ± 1.48 ^a	11.04 ± 1.24 ^a	14.18 ± 1.05 ^a	1.46 ± 0.19 ^a	0.82 ± 0.02 ^a
C_T1	150.78 ± 7.44 ^a	22.20 ± 0.98 ^a	11.96 ± 1.71 ^a	13.69 ± 1.69 ^a	1.53 ± 0.06 ^a	0.88 ± 0.07 ^a
C_T2	129.65 ± 12.55 ^a	21.29 ± 1.77 ^a	9.53 ± 1.35 ^a	10.61 ± 1.12 ^a	1.41 ± 0.07 ^a	0.72 ± 0.09 ^a
D	21.59 ± 1.29 ^b	5.71 ± 0.34 ^b	3.17 ± 0.20 ^b	3.02 ± 0.25 ^b	0.64 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.03 ^b
D_T1	20.80 ± 1.14 ^b	5.81 ± 0.18 ^b	3.71 ± 0.64 ^b	2.86 ± 0.28 ^b	0.64 ± 0.05 ^b	0.29 ± 0.09 ^b
D_T2	18.23 ± 1.16 ^b	4.94 ± 0.37 ^b	2.76 ± 0.41 ^b	2.66 ± 0.13 ^b	0.58 ± 0.04 ^b	0.23 ± 0.05 ^b
47 dan (II žetva)						
Tretmani	Sveža masa lista (g)	Sveža masa stable (g)	Sveža masa korena (g)	Suva masa lista (g)	Suva masa stable (g)	Suva masa korena (g)
C	226.99 ± 21.22 ^a	122.77 ± 12.41 ^a	64.64 ± 5.38 ^a	21.86 ± 2.76 ^a	8.72 ± 0.83 ^a	4.79 ± 0.25 ^a
C_T1	209.24 ± 26.32 ^a	112.75 ± 10.71 ^a	77.39 ± 22.96 ^a	22.09 ± 1.87 ^a	8.31 ± 0.54 ^a	5.23 ± 0.21 ^a
C_T2	211.27 ± 16.80 ^a	115.53 ± 5.81 ^a	74.46 ± 11.24 ^a	20.19 ± 2.04 ^a	7.88 ± 0.67 ^a	5.06 ± 0.18 ^a
D	38.61 ± 3.03 ^b	10.33 ± 1.43 ^b	8.75 ± 1.24 ^b	5.26 ± 0.55 ^b	1.08 ± 0.15 ^b	0.74 ± 0.06 ^b
D_T1	35.04 ± 5.13 ^b	10.38 ± 1.85 ^b	8.23 ± 3.30 ^b	4.84 ± 0.47 ^b	1.15 ± 0.11 ^b	0.68 ± 0.08 ^b
D_T2	38.70 ± 2.54 ^b	10.78 ± 0.76 ^b	8.87 ± 1.69 ^b	5.40 ± 0.51 ^b	1.21 ± 0.14 ^b	0.82 ± 0.09 ^b

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.3.10. Brzina formiranja plodova

Brzina formiranja plodova je ispitivani parametar na koji su odabrani izolati gljiva roda *Trichoderma* imala najveći uticaj u sprovedenom ogledu (Slika 39). Prvi plodovi kod biljaka su se pojavili nakon četrdeset jednog dana, kod biljaka koje su optimalno zalivane u prisustvu *T. harzianum* i kod biljaka koje su bile izložene destvu suše u prisustvu *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. U navedenim tretmanima kod oko 20 % biljaka su se pojavili mali plodovi. Prvi plodovi u kontroli se javljaju dan kasnije, a u suši dva dana kasnije, a kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. brevicompactum* tri dana kasnije. Nakon četrdeset pet dana sve optimalno zalivane biljke tretirane sa *T. harzianum* su imale plodove. Kontrola je imala 44 % biljaka sa plodovima, a kod biljaka u tretmanu suše tretiranih sa *T. harzianum* 33 % biljaka je imalo plodove. Procenat biljaka sa plodom u prisustvu *T. brevicompactum* bio je isti kod oba režima zalivanja i iznosio je 20 %. Svega 11 % biljaka izloženih suši imalo je plodove.



Slika 39. Brzina formiranja plodova pri različitim tretmanima optimalno zalivanih biljaka (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

4.3.11. Mikrobiološka analiza zemljišta

Mikrobiološkom analizom zemljišta koja je sprovedena nakon 26 dana (za vreme I žetve) i 47 dana (za vreme II žetve) od momenta postavljanja biljaka na platformu za fenotipizaciju uočene su razlike u broju mikroorganizama (Tabela 14 i Tabela 15).

Nakon 26 dana (Tabela 14) broj amonifikatora u zemljištu, kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. brevicompactum* bio je, približno, dva puta veći u poređenju sa kontrolom. Brojnost amonifikatora u ostalim tretmanima se nije značajno menjala. U tretmanu suše *T. harzianum* je utrostručila brojnost sporogenih bakterija u odnosu na tretman suše bez dodatka gljiva. Kod drugih tretmana nije bilo značajnih razlika u pogledu sporeogenih bakterija. Značajne razlike u ukupnom broju bakterija bile su samo kod zemljišta u kome su biljke bile izložene dejstvu suše u tretmanu sa *T. brevicompactum*. Ovo zemljište je imalo do sedam puta manji broj bakterija u odnosu na druge tretmane. Broj gljiva varirao je u zavisnosti od režima zalivanja i bio je manji približno petnaest puta kod kontrole u odnosu na tretman suše. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* statistički značajno nisu uticale na povećanje broja gljiva u zemljištu u kome su biljke bile optimalno zalivane. Sa druge strane, kod zemljišta u kome su biljke bile podvrgnute dejstvu suše *T. harzianum* je dovela do smanjenja broja gljiva približno tri puta, dok je *T. brevicompactum* smanjila broj gljiva približno jedanaest puta.

Tabela 14. Broj mikroorganizama (CFU/g) nakon 26 dana od momenta postavljanja biljaka na platformu za fenotipizaciju pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Tretman	Amonifikatori $\times 10^7$	Sporogene bakterije $\times 10^6$	Ukupan broj bakterija $\times 10^8$	Gljive $\times 10^5$
C	1.07 ± 0.21^{bc}	6.43 ± 4.27^b	3.67 ± 0.68^a	2.86 ± 1.24^b
C_T1	2.36 ± 1.02^{ab}	5.90 ± 2.92^b	4.85 ± 0.69^a	22.7 ± 11.56^{ab}
C_T2	2.82 ± 0.40^a	2.35 ± 0.01^b	4.79 ± 0.65^a	28.2 ± 18.36^{ab}
D	0.90 ± 0.45^{bc}	6.87 ± 2.27^b	5.01 ± 0.65^a	44.6 ± 1.38^a
D_T1	0.77 ± 0.40^c	21.2 ± 1.06^a	5.06 ± 0.50^a	15.8 ± 10.8^b
D_T2	1.17 ± 0.39^{bc}	3.88 ± 0.07^b	0.68 ± 0.18^b	3.94 ± 0.04^b

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

Nakon 47 dana (Tabela 15) broj amonifikatora u zemljištu u kome su bile optimalno zalivane biljke bio je približno sedamdeset tri puta veći u odnosu na zemljište u kojem su biljke bile izložene suši. Kod dobro zalivenog zemljišta *T. harzianum* je inhibitorno delovala na brojnost amonifikatora kao i *T. brevicompactum*. *T. harzianum* je dovela do smanjenja od 59 %, a *T. brevicompactum* 72%. U tretmanu suše *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu dovele do statistički značajnih razlika. Na brojnost sporogenih bakterija, kod oba režima zalivanja, prisustvo *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nije značajno uticalo. Brojnost sporogenih bakterija bila je sedamnaest puta veća

kod zemljišta u kojem su biljke optimalno zalivane u poređenju sa tretmanom suše. Ukupan broj bakterija bio je petnaest puta veći kod zemljišta u kome su biljke dobro zalivane u odnosu na zemljište koje je bilo podvrgnuto suši. *T. harzianum* je kod zemljišta dobro snabdevenog vodom smanjila ukupan broj bakterija za 68 %, a *T. brevicompactum* za 79 %. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu dovele do statistički značajnih razlika u tretmanu suše. Broj gljiva se menjao u zavisnosti od režima zalivanja ali *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale značajnih efekata. U tretmanu suše zemljište je imalo za 72 % manje gljiva od kontrole.

Tabela 15. Broj mikroorganizama (CFU/g) nakon 47 dana od momenta postavljanja biljaka na platformu za fenotipizaciju pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Tretman	Amonifikatori $\times 10^7$	Sporogene bakterije $\times 10^6$	Ukupan broj bakterija $\times 10^8$	Gljive $\times 10^5$
C	138 \pm 26.5 ^a	46.13 \pm 26.61 ^a	69.17 \pm 7.70 ^a	144.6 \pm 12.50 ^a
C_T1	56.0 \pm 7.53 ^b	16.00 \pm 8.00 ^{ab}	22.32 \pm 1.05 ^b	162.6 \pm 29.8 ^a
C_T2	38.6 \pm 6.06 ^b	17.5 \pm 6.06 ^{ab}	14.64 \pm 1.31 ^{bc}	153.6 \pm 24.10 ^a
D	1.88 \pm 0.49 ^c	2.68 \pm 0.14 ^b	4.67 \pm 2.25 ^c	40.9 \pm 3.10 ^b
D_T1	1.45 \pm 0.87 ^c	4.75 \pm 1.65 ^b	7.84 \pm 5.72 ^c	27.3 \pm 19.9 ^b
D_T2	4.18 \pm 0.87 ^c	2.72 \pm 0.10 ^b	6.48 \pm 0.69 ^c	39.2 \pm 2.50 ^b

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

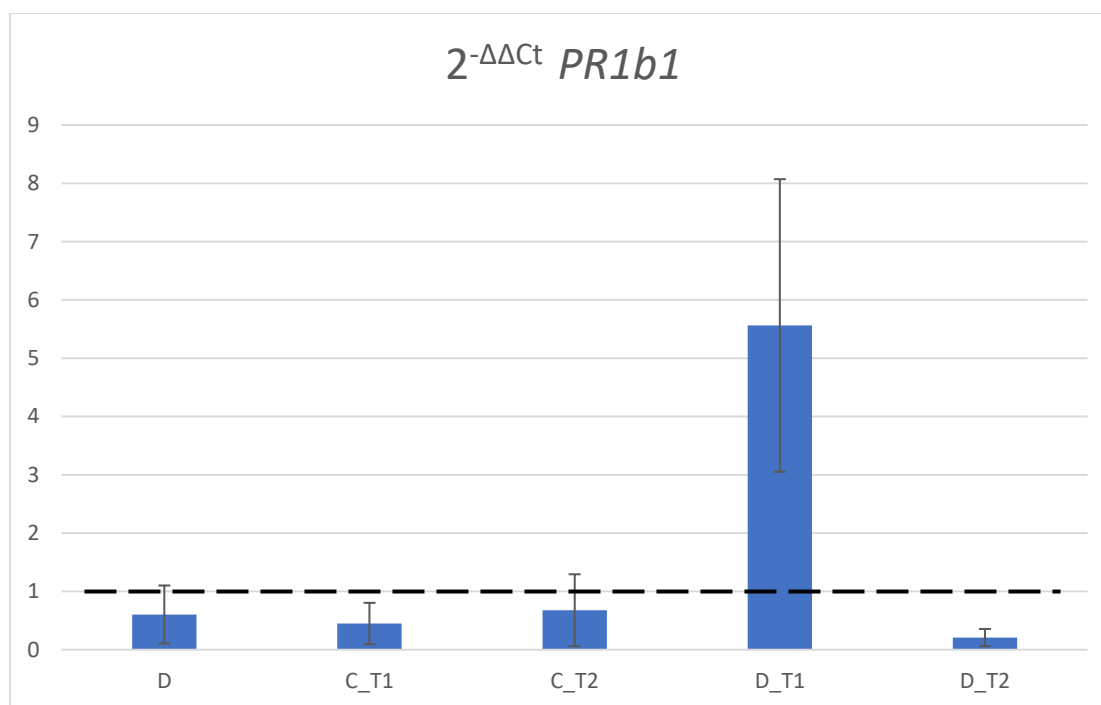
4.4. Molekularni mehanizmi odgovora biljke na sušu i dodatak suspenzije gljiva roda *Trichoderma*

4.4.1. Promene ekspresije gena paradajza u uslovima suše i interakciji sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*

Ekspresija sedam gena ispitana je u listu paradajza (sorta gružanski zlatni), gajenog na platformi za fenotipizaciju u kontrolisanim uslovima. Nakon prve žetve (26 dan) prikupljeni su, a potom i liofilizovani listovi paradajza sa biljaka koje su bile izložene režimu dva zalivanja u kombinaciji sa dve vrste gljive, *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. Analiza ekspresije gena sprovedena je metodom qRT-PCR. Analizirani su markeri signalnih puteva salicilne (*SA-PR1b1*) i jasmonske kiseline (*JA-PINII*), kao i geni koji učestvuju u sintezi ABA (*NCED1*), flavonoida (*FLS*) antocijana (*SIJAF13*), kefene i 5-O-kafeoil-hinske kiseline (*C3H*), lignina i suberina (*TPX1*). Relativne ekspresije gena prikazane su na grafikonima kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrednost.

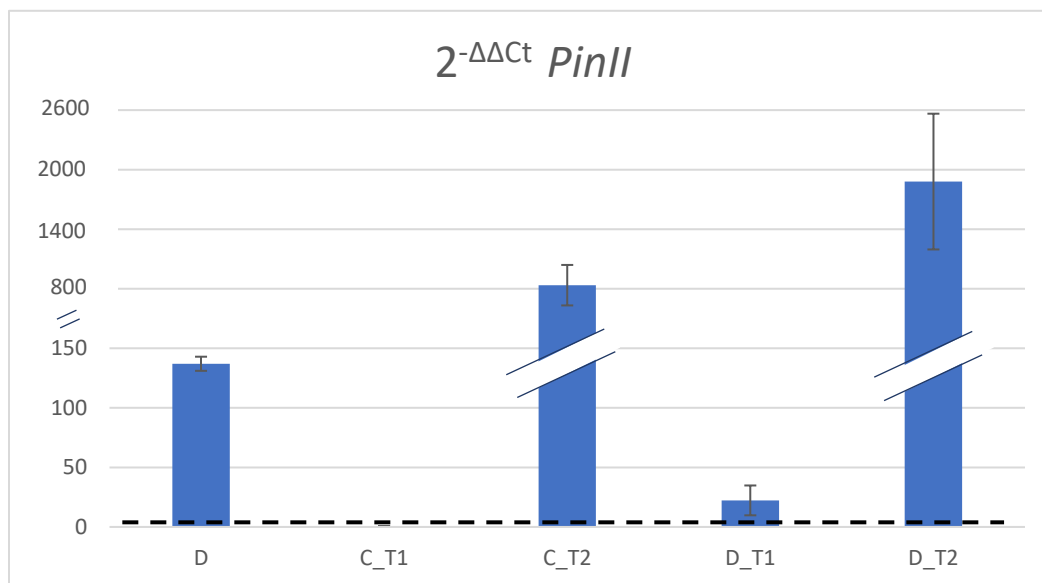
Povećana ekspresija *PR1b1* gena od pet i po puta u odnosu na kontrolu detektovana je u listu biljaka koje su bile izložene dejstvu suše u tretmanu sa *T. harzianum*. Sa druge strane kod biljaka podvrgnutih vodnom deficitu u prisustvu *T. brevicompactum* smanjena je ekspresija ovog gena za

oko pet puta. Trend smanjenje ekspresije *PR1b1* gena primećen je kod biljaka izloženih suši kao i kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* (Slika 40).



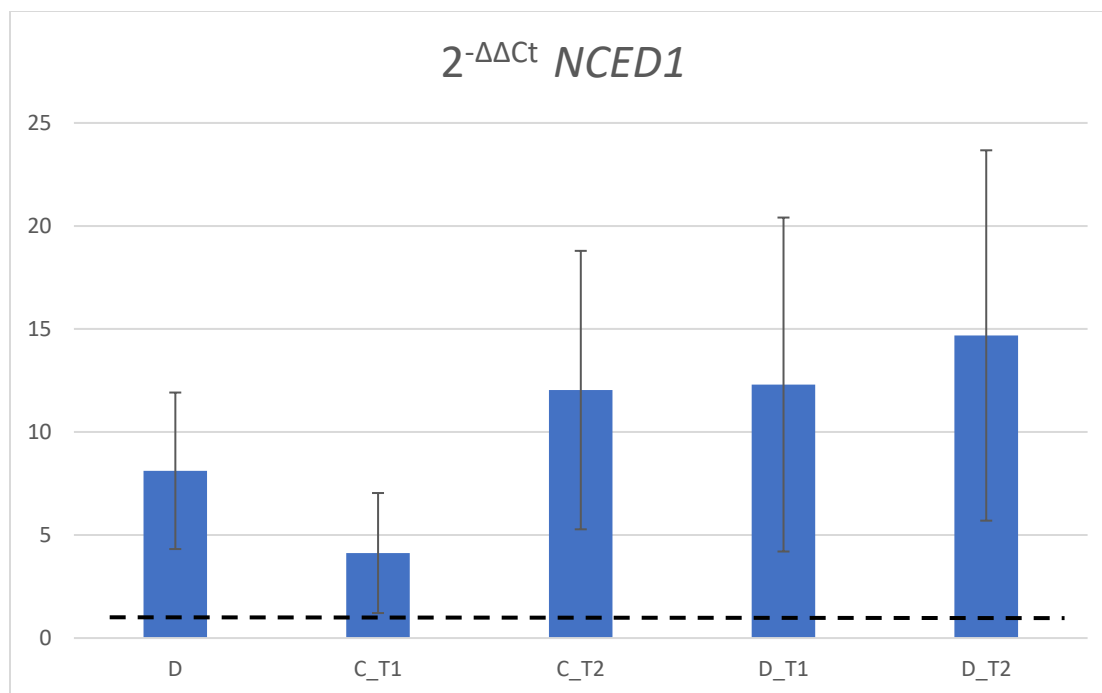
Slika 40. Ekspresija *PR1b1* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Ekspresija *PINII* gena je povećana u tretmanu sa *T. brevicompactum*. Kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu *T. brevicompactum* nivo ekspresije ovog gena je povećan za oko osamsto puta, a kod biljaka podvrgnutih suši za oko hiljadu osamsto puta u odnosu na kontrolu. Na nivo relativne ekspresije *PINII* gena kod biljaka podvrgnutih vodnom deficitu uticala je i *T. harzianum* povećavši ekspresiju za oko dvadeset i dva puta u odnosu na kontrolu, dok je tretman suše povećao nivo ekspresije ispitivanog gena za oko sto trideset puta (Slika 41).



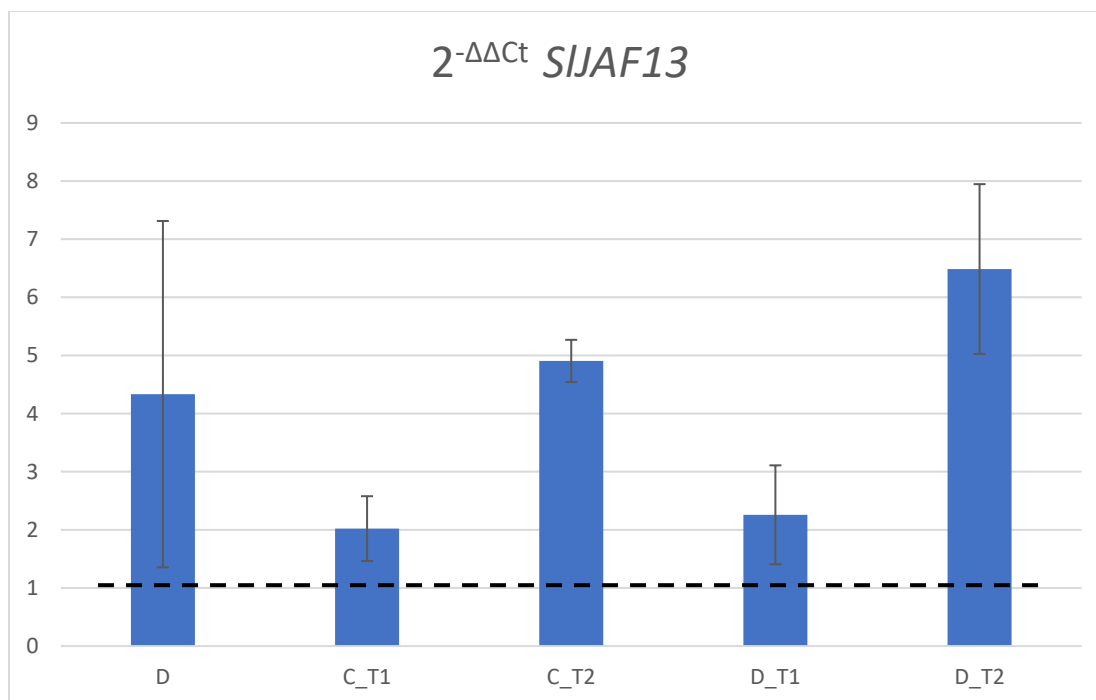
Slika 41. Ekspresija *PINII* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Biljke paradajza optimalno opskrbljene vodom u tretmanu sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* pokazale su trend povećanog nivoa ekspresije *NCEDI* gena u odnosu na kontrolu. U tretmanu suše primećena je povećana ekspresija *NCEDI* gena u odnosu na kontrolu. *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu statistički značajno uticale na relativnu ekspresiju gena kod biljaka podvrgnutih vodnom deficitu u poređenju sa biljkama koje su bile izložene suši (Slika 42).



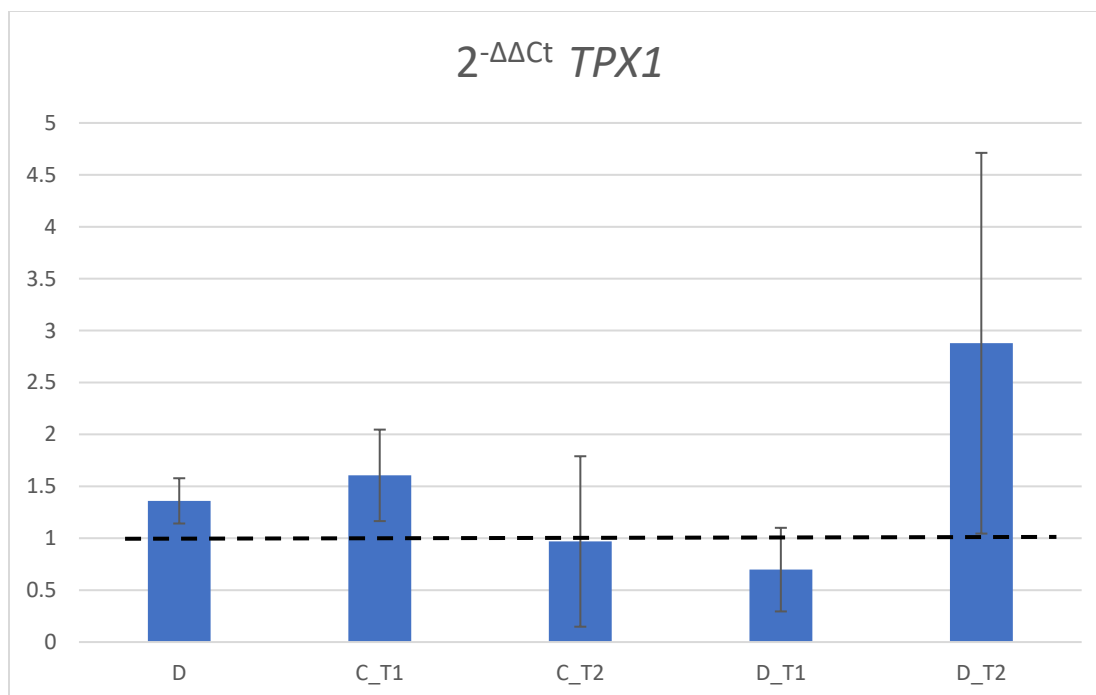
Slika 42. Ekspresija *NCED1* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

U odnosu na referenti gen, zabeležena je povećana ekspresija *SIJAF13* gena u svim tretmanima. Kod optimalno zalivanih biljaka *T. brevicompactum* je uticala na povećanje nivoa ekspresije *SIJAF13* gena za oko pet puta, dok je kod biljaka izloženih suši stimulisala ekspresiju spomenutog gena za oko šest i po puta u odnosu na kontrolu. Sa druge strane *T. harzianum* je pokazala trend da stimuliše nivo ekspresije *SIJAF13* gena kako kod optimalno zalivanih biljaka tako i kod biljaka izloženih vodnom deficitu. Trend da je gen *SIJAF13* povećano eksprimiran u poređenju sa kontrolom zabeležen je i kod biljaka koje su bile podvrgnute suši (Slika 43).



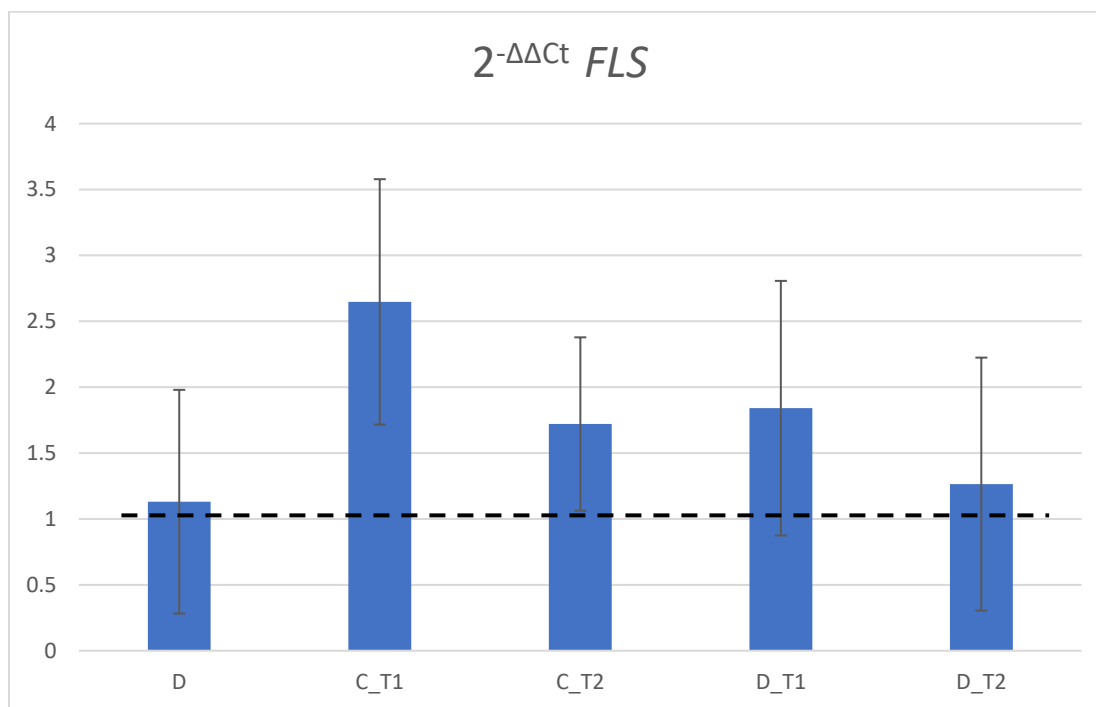
Slika 43. Ekspresija *SIJAF13* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Povećana ekspresija *TPX1* gena u listu paradajza detektovana je kod biljaka koje su bile dobro opskrbljene vodom u tretmanu sa *T. harzianum* i to za oko 60 % u odnosu na kontrolu. U tretmanu suše povećano je ekspimiran *TPX1* gen za oko 35 %, dok je u istom režimu zalivanja *T. brevicompactum* pokazala trend da povećava nivo ekspresije *TPX1* gena u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu nisu primećene kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. brevicompactum* kao ni kod biljaka koje su bile podvrgnutih vodnom deficitu u tretmanu sa *T. harzianum* (Slika 44).



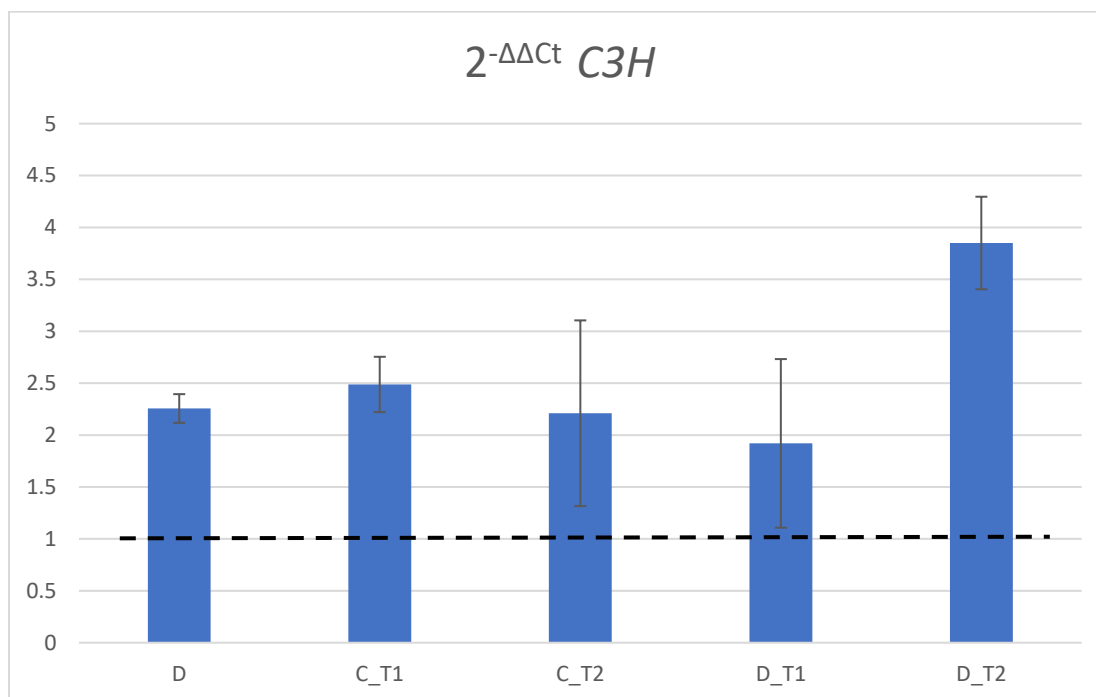
Slika 44. Ekspresija *TPX1* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Analizom relativne ekspresije *FLS* gena, utvrđeno je da je on povećano eksprimiran u listovima optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. harzianum* za oko dva i po puta, dok je *T. brevicompactum* pokazala trend stimulacije ispitivanog gena u poređenju sa kontrolom (Slika 45). Biljke izložene vodnom deficitu nisu imale izmenjen nivo ekspresije *FLS* gena u odnosu na kontrolu, dok je u istom režimu zalivanja *T. harzianum* pokazala trend da povećava nivo ekspresije ispitivanog gena.



Slika 45. Ekspresija *FLS* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Ekspresija *C3H* gena je povećana u svim tretmanima. Utvrđeno je da *T. harzianum* kod biljaka koje su optimalno opskrbljene vodom stimuliše ekspresiju *C3H* gena za oko dva i po puta u poređenju sa kontrolom. U istom režimu zalivanja *T. brevicompactum* pokazuje trend stimulacije ekspresije ispitivanog gena. Tretman suše je udvostručio nivo ekspresije gena, dok je u istom režimu zalivanja *T. harzianum* pokazala trend stimulacije ekspresije *C3H* gena. *T. brevicompactum* je kod biljaka podvrgnutih vodnom deficitu povećala nivo ekspresije ispitivanog gena čak za tri i po puta (Slika 46).



Slika 46. Ekspresija *C3H* gena izražena kao $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednost pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

4.4.2. Promene sadržaja ABA i fenolnih jedinjenja pod uticajem suše i interakcije sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*

Sadržaj ABA i 12 fenolnih jedinjenja (4 flavonoidna glikozida, 4 fenilpropanske kiseline, 2 derivata benzojeve kiseline, jedne cikloheksan karboksilne kiseline i jednog kumarina) u ekstraktima listova paradajza utvrđen je primenom visoko selektivne LC-MS-MS tehnike. Ekstrakcija je urađena iz liofilizovanih listova paradajza gajenog na platformi za fenotipizaciju u kontrolisanim uslovima. Materijal je prikupljen nakon prve žetve (26 dan) sa biljaka koje su bile izložene režimu dva zalivanja u kombinaciji sa dve vrste gljive *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. Sadržaj kvantitativnih jedinjenja prikazan je u Tabeli 16.

Sadržaj ABA kod optimalno zalivanih biljka u listu paradajza bio je statistički značajno povišen u tretmanu sa *T. harzianum* za oko tri i po puta u odnosu na kontrolu. Suša je takođe uticala na povećanje sadržaja ABA u listu paradajza za oko tri puta, dok su biljke u istom tretmanu u prisustvu *T. brevicompactum* imale viši sadržaj ABA za oko tri i po puta u odnosu na kontrolu.

Dvostruko niži kvantitativni sadržaj hinske kiseline zabeležen je kod optimalno zalivanih biljaka u prisustvu *T. harzianum* u odnosu na kontrolu. Statistički značajno smanjenje sadržaja hinske kiseline primećeno je i u tretmanu suše za oko dva i po puta, dok je *T. brevicompactum* u suši inhibirala sadržaj hinske kiseline za oko tri i po puta u odnosu na kontrolu.

Ispitivani derivati benzojeve kiseline pokazali su identičan trend promene sadržaja u svim tretmanima. Suša je izazvala povećanje sadržaja p-OH-benzojeve kiseline za 40 % a siriginske kiseline za oko osam i po puta u odnosu na kontrolu. U tretmanu suše *T. brevicompactum* je imala stimulatívni efekat na p-OH-benzojevu kiselinu čiji sadržaj je udvostručila, dok je sadržaj siriginske kiseline skoro šest puta povećala u odnosu na kontrolu. U uslovima dobre opskrbljenosti vodom biljke tretirane sa *T. harzianum* su imale za oko 44 % viši sadržaj p-OH-benzojeve kiseline u odnosu na kontrolu.

Tri od ukupno četiri fenilpropanske kiseline su imale identičan trend sadržaja u listu paradajza u svim tretmanima. Suša je stimulatívno delovala na sadržaj ferulne, sinapinske i kafene kiseline povećavši ga redom za oko tri puta, dvadest i dva puta, i za oko dvadeset puta u odnosu na kontrolu. Kod 5-O-kafeoil-hinske kiseline zabeležena je inhibicija od oko četiri puta. Biljke koje su bile podvrgnute vodnom deficitu i tretirane sa *T. brevicompactum* imale su viši sadržaj ferulne kiseline za oko četiri puta, sinapinske za oko dvadeset i šest puta, a kafene kiselina za oko dvadeset i četiri puta u odnosu na kontrolu. Kod 5-O-kafeoil-hinska kiselina zabeležena je inhibicija od oko osam i po puta u odnosu na kontrolu. *T. harzianum* statistički značajno nije uticala na sadržaj fenilpropanskih kiselina kod biljaka izloženih suši. Međutim kod optimalno zalivanih biljaka *T. harzianum* je dovela do povećanja sadržaja sinapinske i kafene kiseline za oko dest puta, a ferulne kiseline za oko 76 %, dok je sadržaj 5-O-kafeoil-hinske kiseline inhibirala za oko četiri puta u odnosu na kontrolu.

U klasi flavonoidnih glikozida razlike između tretmana detektovane su kod kemferol-3-O-glukozida i luteolin-7-O-glukozida, dok kod kvercetin-3-O-glukozida i kvercetin-3-O-rutinozida nije bilo statistički značajnih razlika između tretmana i kontrole. Optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* imale su za oko 55 % niži sadržaj kemferol-3-O-glukozida u odnosu na kontrolu. Biljke izložene vodnom deficitu imale su za oko 68 % niži sadržaj kemferol-3-O-glukozida, dok je u istom režimu zalivanja u prisustvu *T. brevicompactum* inhibicija bila još izraženija u odnosu na kontrolu sa oko 72 %. Kod optimalno zalivanih biljaka *T. harzianum* je stimulatívno uticala na sadržaj luteolin-7-O-glukozida povećavši ga za oko dva i po puta u odnosu na kontrolu. U uslovima vodnog deficita *T. harzianum* i *T. brevicompactum* su povećale sadržaj ispitivanog flavonoid glikozid za oko 63 % odnosno za oko 74 %.

Kvantitatívni sadržaj eskuletina u odnosu na kontrolu statistički značajno bio je promenjen jedino kod biljaka izloženih suši u prisustvu *T. brevicompactum*. Stimulacija je iznosila oko 48 %.

Tabeli 16. Sadržaj ABA i fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu lista paradajza pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Tretmani	Cikloheksan karboksilna kiselina	Derivati benzoeve kiseline		Fenilpropanske kiseline				Flavonoidi glikozidi				Kumarini	Terpenoidi
	Hinska kiselina (mg/g)	p-OH-benzoeva kiselina (µg/g)	Siringinska kiselina (µg/g)	Ferulna kiselina (ng/g)	Sinapinska kiselina (ng/g)	Kafena kiselina (µg/g)	5-O-kafeoil-hinska kiselina	Kemferol-3-O-glukozid (ng/g)	Luteolin-7-O-glukozid (ng/g)	Kvercetin-3-O-glukozid (µg/g)	Kvercetin-3-O-rutinozid (mg/g)	Eskuletin (ng/g)	ABA (ng/g)
C	0.82	0.95	20.21	729.37	334.63	36.03	4.14	20158.15	27.62	74.10	7.41	1089.31	925.07
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
C_T1	0.06 ^a	0.04 ^c	4.08 ^c	117.99 ^c	31.32 ^d	7.03 ^d	0.48 ^a	997.17 ^a	1.27 ^c	1.65 ^{ab}	0.17 ^{ab}	144.98 ^{bc}	124.72 ^{cd}
	0.41	1.37	36.88	1284.52	3619.63	385.97	1.05	9077.03	66.53	40.92	4.09	885.05	3407.73
C_T2	0.03 ^b	0.10 ^b	9.98 ^c	164.23 ^{bc}	230.28 ^c	63.16 ^c	0.28 ^b	591.88 ^b	3.14 ^a	1.82 ^b	0.18 ^b	153.90 ^{bc}	146.86 ^a
	0.78	0.86	56.88	841.69	614.44	66.34	4.01	18516.96	37.98	72.19	7.22	701.47	665.39
D	0.08 ^a	0.05 ^c	3.76 ^c	122.0 ^c	66.79 ^d	13.73 ^d	0.55 ^a	2159.35 ^a	1.50 ^{bc}	8.22 ^{ab}	0.82 ^{ab}	70.53 ^c	24.22 ^d
	0.35	1.33	176.18	2215.09	7544.79	741.43	0.98	6407.36	37.49	30.44	3.04	745.18	2861.62
D_T1	0.02 ^b	0.02 ^b	41.99 ^a	114.00 ^{ab}	522.32 ^b	61.23 ^b	0.01 ^b	374.54 ^b	2.21 ^{bc}	4.11 ^b	0.41 ^b	76.07 ^c	47.04 ^b
	0.77	1.00	21.80	996.93	688.16	70.73	4.34	22087.12	45.16	81.75	8.17	1242.60	1031.98
D_T2	0.20 ^a	0.14 ^{bc}	4.26 ^c	124.04 ^c	130.41 ^d	12.47 ^d	1.11 ^a	7617.63 ^a	10.45 ^b	24.21 ^a	2.42 ^a	171.26 ^{ab}	123.10 ^c
	0.24	1.86	118.18	2908.80	8730.37	883.22	0.47	5551.77	48.14	34.79	3.48	1618.43	3240.73
D_T2	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.03 ^b	0.31 ^a	19.60 ^b	393.06 ^a	126.95 ^a	27.99 ^a	0.16 ^b	586.72 ^b	10.23 ^b	3.29 ^b	0.33 ^b	215.11 ^a	181.39 ^a

4.5. Uticaj odabranog izolata *Trichoderma* na biohemijske, morfo-fiziološke i agronomске parametre paradajza gajenog u plasteniku

Biljke dve sorte paradajza (gružanski zlatni i narvik), uzgajane su u plasteniku u organskim uslovima. Navodnjavane su sistemom kap po kap, dok je suspenzija gljva *T. harzianum* primenjena u zoni korena biljke dok su se nalazile u fazi cvetanja.

4.5.1. Enzimска karakterizacija izolata

Rezultati enzimske aktivnosti izolata *T. harzianum* SZMC 20660 dobijeni su primenom semikvantitativne metode, zasnovane na detekciji hidrolitičkih enzima, pomoću API ZIM testa. Kod izolata *T. harzianum* SZMC 20660 je uočena visoka aktivnost N-acetil- β -glukozaminidaze, naftol-as-bi-fosfohidrolaze i kisele fosfataze. Zabeležena je niska aktivnost sledećih enzima: alkalne fosfataze, esteraze (C4), esteraze lipaze (C8). Aktivnost preostalih enzima navedenih u Tabele 17 nije detektovana.

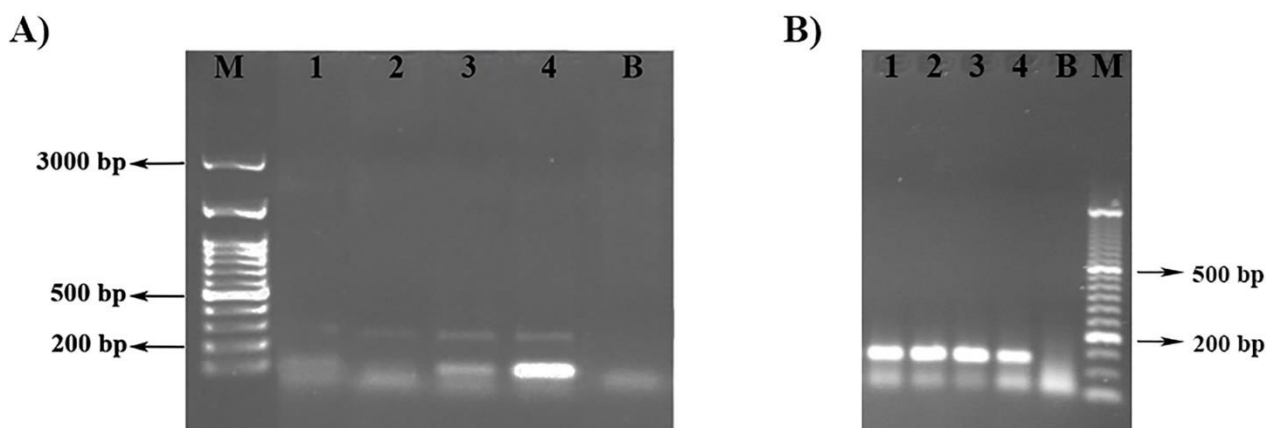
Tabela 17. Enzimска karakterizacija izolata *T. harzianum* SZMC 20660

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
<i>T.harzianum</i> SZMC 22660	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	3	0	0

A - alkalna fosfataza; B- esteraza (C4); C - esteraza lipaza (C8); D - lipaza (C14); E - leucin-arilamidaza; F - valin-arilamidaza; G - cistin-arilamidaza; H – tripsin; I - α -himotripsin; J - kiselа fosfataza, K - naftol-AS-BI-fosfohidrolaza; L - α -galaktozidaza; M - β -galaktozidaza; N - β -glukuronidaza; O - α -glukozidaza; P - β -glukozidaza; Q - N-acetil- β -glukozaminidaza; R - α -manozidaza i S - α -fukozidaza.

4.5.2. Analiza ekspresije svolenin gena

Stopa uspešnosti kolonizacija korena dve sorte paradajza (GZ i N) od strane *T. harzianum* ispitana je analizom ekspresije svolenin gena (Slika 47). Smanjena ekspresija je zabeležena u korenu paradajza narvik u odnosu na paradajz gružanski zlatni.



Slika 47. Ekspresija svolenin gena (A) i β -aktin referentnog gena (B) u korenu paradajza narvik (pozicije na gelu 1 i 2 predstavljaju ponavljanja, odnosno rezultate dobijene na dva grupna uzorka) i paradajza gruzanski zlatni (pozicija na gelu 3 i 4 predstavljaju ponavljanja, odnosno rezultate dobijene na dva grupna uzorka). Na prvoj slici slovom M označen je standard od 100 bp (DNA Ladder H3 RTU 50 μ g / 500 μ l), dok je na drugoj slici slovom M označen standard od 50 bp (50bp DNA Ladder MWD50 50 μ g / 500 μ l). Slvom B označena je slepa proba.

4.5.3. Hemijske analiza zemljišta

Hemijskom analizom zemljišta na kome su gajene biljke u plasteniku, utvrđeno je da se ono svrstava u umereno humozno, slabo karbonatno i slabo alkalno zemljište (Belić i sar., 2014), sa visokim sadržajem fosfora i optimalnim sadržajem kalijuma. Na osnovu sadržaja azota se svrstava u klasu zemljišta srednje obezbeđenih azotom (Manojlović i sar., 1995). (Tabela 18).

Tabela 18. Hemijske osobine ispitivanog zemljišta

Dubina (cm)	CaCO ₃ (%)	Humus (%)	Ukupan N (%)	P ₂ O ₅ (mg/100 g)	K ₂ O (mg/100 g)	pH (H ₂ O)
0 - 30	1.41 ± 0.01	2.9 ± 0.28	0.15 ± 0.01	29 ± 0.49	23 ± 1.48	7.9 ± 0.01

4.5.4. Rastenje i razviće biljaka

Prema većini ispitanih morfoloških parametara stabla i plodova nije bilo značajnih statističkih razlika između sorti paradajza, kao ni između tretmana sa *T. harzianum* i kontrole. Jedina razlika je primećena u broju plodova između sorti paradajza. Sorta gruzaski zlatni je imala približno dva puta više plodova od sorte narvik (Tabela 19).

Tabela 19. Morfološke karakteristike biljke (prečnik stabljike u osnovi, prečnik stabljike u sredini) i ploda (širina ploda, visina ploda, broj plodova, masa ploda) pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gruzanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gruzanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Tretman	Prečnik stabljike u osnovi (cm)	Prečnik stabljike u sredini (cm)	Širina ploda (cm×10 ⁻²)	Visina ploda (cm×10 ⁻²)	Broj plodova	Masa ploda (g)
G1C	16.36 ± 0.76 ^a	10.6 ± 1.11 ^a	60.03 ± 2.44 ^a	57.8 ± 3.87 ^a	12 ± 2 ^b	130 ± 9.29 ^a
G1T	16.7 ± 1.31 ^a	12.36 ± 1.01 ^a	61.96 ± 2.05 ^a	61.3 ± 2.87 ^a	11 ± 1 ^b	143 ± 3.78 ^a
G2C	13.87 ± 1.45 ^{ab}	11.6 ± 1.05 ^a	59.5 ± 4.37 ^a	57.1 ± 1.42 ^a	21 ± 3 ^a	133 ± 4.57 ^a
G2T	11.4 ± 0.87 ^b	10.3 ± 0.81 ^a	61.3 ± 3.61 ^a	60.6 ± 1.57 ^a	20 ± 1 ^a	141 ± 11.35 ^a

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.5.5. Sadržaj vode u zemljištu i relativni sadržaj vode u listovima paradajza

Sadržaj vode u zemljištu koje je navodnjavano sistemom kap po kap, kao i i sadržaj vode u listovima nije se statistički značajno menjao u različitim tretmanima (Tabela 20).

Tabela 20. Sadržaj vode u zemljištu (SWC) i sadržaj vode u listovima (RWC) pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gruzanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gruzanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Tretman	SWC (%)	RWC (%)
G1C	24.50 ± 2.4 ^a	49.32 ± 3.7 ^a
G1T	27.33 ± 3.0 ^a	48.73 ± 4.7 ^a
G2C	30.75 ± 0.8 ^a	50.18 ± 4.3 ^a
G2T	30.95 ± 1.1 ^a	54.67 ± 2.6 ^a

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.5.6. Sadržaj hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeks balansa azota

Praćenjem fizioloških parametara u listovima *in vivo*, nedestruktivnom metodom, utvrđeno je da je uticaj primenjenih tretmana varirao u zavisnosti od sorte paradajza (Tabela 21). Sorte gruzanski zlatni imala je veći saržaj hlorofila za 30 % i indeks balansa azota veći za 44 % od sorte narvik, dok je sadržaj epidermalnih flavonoida i antocijana bio niži za 22 % i 27 %. Praćenjem sadržaja hlorofila u listovima, primećeno je da paradajz gruzanski zlatni tretiran sa *T. harzianum* ima za 13 % niži sadržaj hlorofila za razliku od sorte narvik kod koje nije bilo statistički značajnih promena. Za razliku od hlorofila sadržaj epidermalnih flavonola kod sorte narvik je opao za 12 % dok je kod sorte gruzanski zlatni porastao za 25 %. Shodno tome, indeks balansa azota (predstavlja odnos Chl/Flav) je smanjen za 21 % kod sorte gruzanski zlatni, dok kod sorte narvik nije bilo statistički značajnih razlika. Kod

obe sorte paradajza tretman sa *T. harzianum* nije imao statistički značajne efekte na sadržaj antocijana.

Tabela 21. Indeks hlorofila (Chl), epidermalnih flavonola (Flav), antocijana (Anth) i indeks balansa azota (NBI) mereni *in vivo* nedestruktivnom metodom pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gružanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gružanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Tretman	Chl	Flav	NBI	Anth
G1C	29.1 ± 1.8 ^c	0.67 ± 0.03 ^a	43.15 ± 1.2 ^c	0.11 ± 0.005 ^a
G1T	26.4 ± 1.2 ^c	0.59 ± 0.02 ^b	48.23 ± 3.8 ^c	0.12 ± 0.008 ^a
G2C	41.7 ± 1.1 ^a	0.52 ± 0.03 ^c	77.5 ± 1.5 ^a	0.08 ± 0.008 ^b
G2T	36.53 ± 1.2 ^b	0.65 ± 0.03 ^{ab}	61.25 ± 4.6 ^b	0.09 ± 0.008 ^b

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.5.7. Sadržaj ukupnih polifenola, rastvorljivih šećera, ukupnih flavonoida i skroba u plodovima paradajza

Sadržaj ukupnih polifenola u plodovima sorte gružanski zlatni bio je veći za 18 % u odnosu na sortu narvik, dok je kod obe sorte u tretmanu sa *T. harzianum*, u odnosu na kontrolu, značajno smanjen i to za 14 %. Značajan opadanje sadržaja flavonoida od 26 % izmeren je u tretmanu sa *T. harzianum* kod sorte Narvik, međutim kod sorte gružanski zlatni primećen je porast flavonoida za 49 %. Kod iste sorte, uticaj *T. harzianum* je rezultovao smanjenjem sadržaja skroba za 37 %, dok značajnih razlika između sorti nije bilo. Značajno niži sadržaj rastvorljivih šećera zabeležen je između dve sorte paradajza, ali značajnih razlika u tretmanu sa *T. harzianum* nije bilo (Tabela 22).

Tabela 22. Biohemijske karakteristike ploda merene pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gružanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gružanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Tretman	Ukupni polifenoli (mg GEA/100 g)	Ukupni flavonoidi (mg/100 g)	Skrob (mg/g)	Rastvorni šećeri (mg/g)
G1C	1632.41 ± 68.74 ^b	455.56 ± 47.13 ^b	30.61 ± 3.81 ^{ab}	225.18 ± 14.96 ^{bc}
G1T	1408.29 ± 45.21 ^c	333.26 ± 9.51 ^c	37.65 ± 2.01 ^a	192 ± 31.57 ^c
G2C	2001.77 ± 52.61 ^a	368.14 ± 29.02 ^c	36.52 ± 4.62 ^a	337.07 ± 34.51 ^a
G2T	1710.63 ± 33.31 ^b	548.41 ± 30.66 ^a	22.74 ± 4.09 ^b	284.09 ± 4.26 ^{ab}

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.5.8. Sadržaj makroelemenata u plodu paradajza

Određivanjem sadržaja makroelemenata u plodu paradajza (Tabela 23) utvrđeno je da sorta gružanski zlatni ima oko dva puta veći sadržaj azota od sorte narvik. Za razliku od paradajza narvik kod kog nije bilo značajnih razlika u tretmanu sa *T. harzianum*, sadržaja azota kod paradajza gružanski zlatni

je smanjen za 28 %. Sadržaj fosfora se kretao od 0.715 ± 0.045 % do 0.79 ± 0.02 % i nije se značajno menjao između sorti, kao ni između tretmana sa *T. harzianum*. Sadržaj kalijuma se takođe nije značajno menjao, ni između sorti, a ni između tretmana sa *T. harzianum* i kretao se od 2.78 ± 0.28 ppm do 2.98 ± 0.14 ppm.

Tabela 23. Sadržaj makroelementa u plodovima paradajza pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gruzanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gruzanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Tretmani	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
G1C	1.28 ± 0.03^c	0.79 ± 0.02^a	2.85 ± 0.28^a
G1T	1.27 ± 0.02^c	0.765 ± 0.015^a	2.98 ± 0.14^a
G2C	2.21 ± 0.18^a	0.715 ± 0.045^a	2.78 ± 0.28^a
G2T	1.59 ± 0.08^b	0.735 ± 0.035^a	2.80 ± 0.00^a

Vrednosti označene istim slovom u istoj koloni nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

4.5.9. Sadržaj mikronutrijenata i teških metala u plodovima paradajza, zemljištu i indeks bioakumulacije

Na osnovu određenog sadržaja mikronutrijenata i teških metala u plodovima paradajza, ustanovljeno je da je sorta gruzanski zlatni sadržala veće koncentracije gvožđa, cinka i nikla. Veću koncentraciju mangana sadržala je sorta narvik, dok se koncentracije bakra, hroma, olova i kobalta nisu značajno menjale između sorti (Tabela 24). Tretman sa *T. harzianum* imao je različit efekat na dve sorte paradajza u odnosu na koncentraciju mangana. Kod paradajza narvik je došlo do smanjenja, dok je kod paradajza gruzanski zlatni došlo do povećanja koncentracije mangana. Navedene razlike su bile ispod 10 %. Koncentracija gvožđa i hroma bila je značajno veća kod obe sorte paradajza u tretmanu sa *T. harzianum*, ali ipak nešto niža kod paradajza narvik u odnosu na paradajz gruzanski zlatni. Koncentracije gvožđa i hroma povećane su za 23 % i 59 % kod paradajza narvik, a kod paradajza gruzanski zlatni za 72 % i 100 %. Tretman sa *T. harzianum* nije statistički značajno uticao na koncentracije bakra, cinka i kobalta. Koncentracije nikla su smanjene kod obe sorte paradajza nakon interakcije sa *T. harzianum* i to kod paradajza narvik za 20 % a kod paradajza gruzanski zlatni za 50 %. Koncentracija olova značajno se menjala u tretmanu sa *T. harzianum* samo kod sorte narvik gde je doslo do smanjenja od 50 %.

Tabela 24. Sadržaj mikronutrijenata i teških metala u plodovima paradajza i zemljištu pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gruzanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gruzanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Plod								
Tretmani	Mn	Fe	Cu	Zn	Ni	Cr	Pb	Co
G1C	7.5 ± 0.1 ^c	34.6 ± 1.0 ^b	9.33 ± 0.15 ^a	12.61 ± 0.61 ^a	1.32 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.005 ^b	0.032 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a
G1T	7.1 ± 0.05 ^d	42.79 ± 0.11 ^a	10.79 ± 1.55 ^{ab}	12.79 ± 0.45 ^a	1.08 ± 0.0 ^b	0.89 ± 0.09 ^a	0.0176 ± 0.03 ^b	0.069 ± 0.02 ^a
G2C	7.8 ± 0.1 ^b	22.52 ± 1.00 ^c	8.85 ± 0.02 ^{ab}	11.16 ± 0.04 ^b	0.995 ± 0.005 ^b	0.48 ± 0.09 ^b	0.030 ± 0.004 ^a	0.05 ± 0.0005 ^a
G2T	8.05 ± 0.1 ^a	38.77 ± 2.81 ^a	8.11 ± 0.36 ^b	11.45 ± 0.79 ^{ab}	0.49 ± 0.1 ^c	0.99 ± 0.005 ^a	0.0257 ± 0.045 ^a	0.051 ± 0 ^a
Zemljište								
	496.2 ± 3.9	13685 ± 176.77	43.55 ± 1.21	39.13 ± 1.20	23.69 ± 0.59	23.07 ± 0.99	13.77 ± 0.94	9.043 ± 0.01

Vrednosti označene istim slovom, u istoj koloni, nisu statistički značajno različite prema Tukey's testu ($p < 0.05$).

Indeks bioakumulacije (BI) za mangan, nikl i hrom se kretao od 1.43 do 5.57 (Tabela 25). Najniži indeks bioakumulacije < 1 utvrđen je kod gvožđa, olova i kobalta. Visoke vrednosti ovog indeksa, izračunate su za bakar i cink i kretale su se u rasponu od 18.5 do 33. Vrednosti BI u tretmanu bez dodatka gljive bile su slične kod obe sorte paradajza. Međutim u tretmanu sa *T. harzianum* indeks bioakumulacije sorte gruzanski zlatni bio je veći kod gvožđa i hroma, a niži kod nikla u odnosu na sortu narvik. Kod obe sorte, kao odgovor nakon aplikacije *T. Harzianum*, došlo je do smanjenja BI olova.

Tabela 25. Indeks bioakumulacije pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gruzanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gruzanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T).

Tretmani	Mn	Fe	Cu	Zn	Ni	Cr	Pb	Co
G1C	1.51	0.25	21.42	32.23	5.57	2.43	0.23	0.55
G1T	1.43	0.32	24.78	32.69	4.56	3.86	0.12	0.76
G2C	1.57	0.17	20.32	28.52	4.20	2.08	0.21	0.55
G2T	1.62	0.29	18.62	29.26	2.07	4.29	0.19	0.56

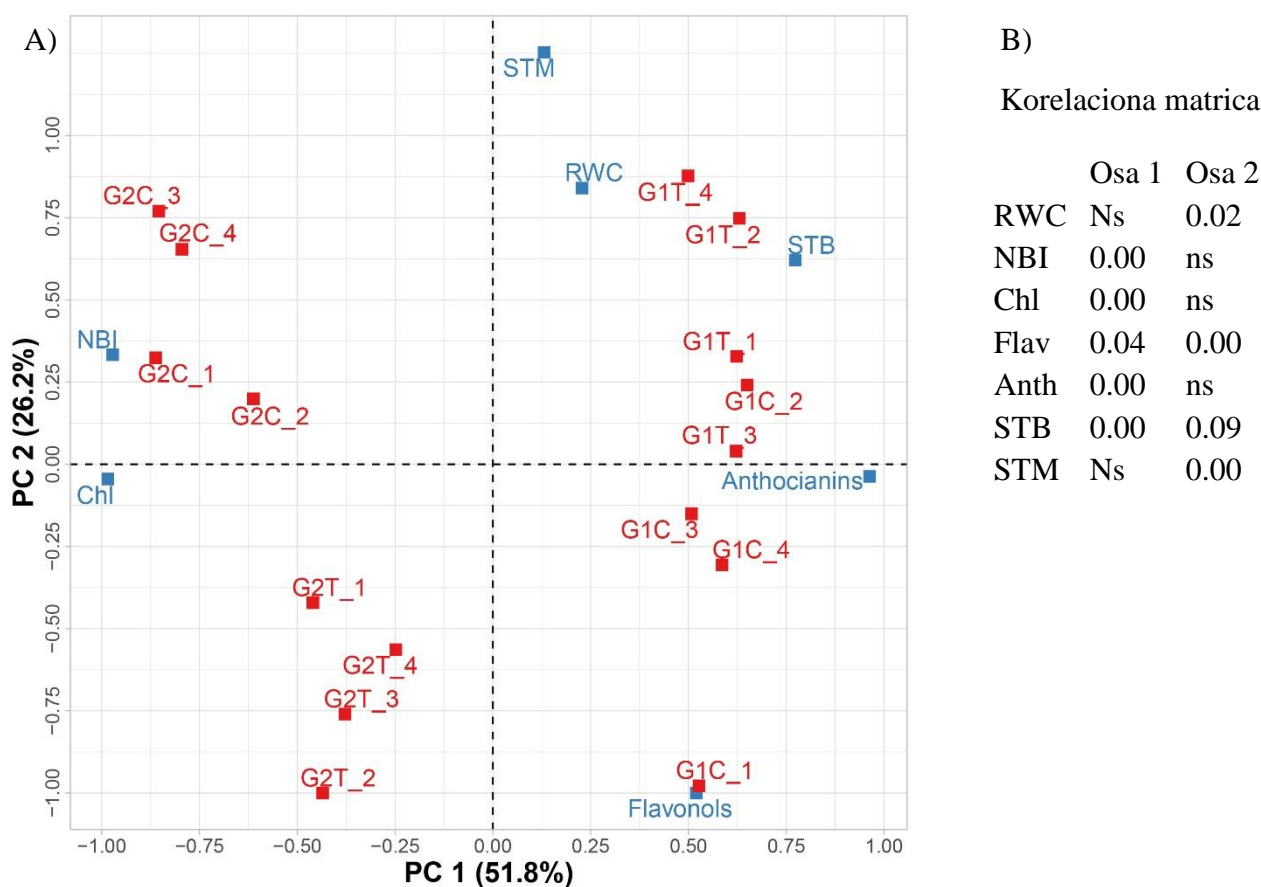
4.5.10. Uporedna analiza morfološko-hemijskih parametara

Efekte primene *T. harzianum* na dve sorte paradajza vizuelno su predstavljeni analizom glavnih komponenti (PCA) koja je odvojeno sprovedena na nadzemnim delovima biljke (Slika 48) i na plodu paradajza (Slika 49).

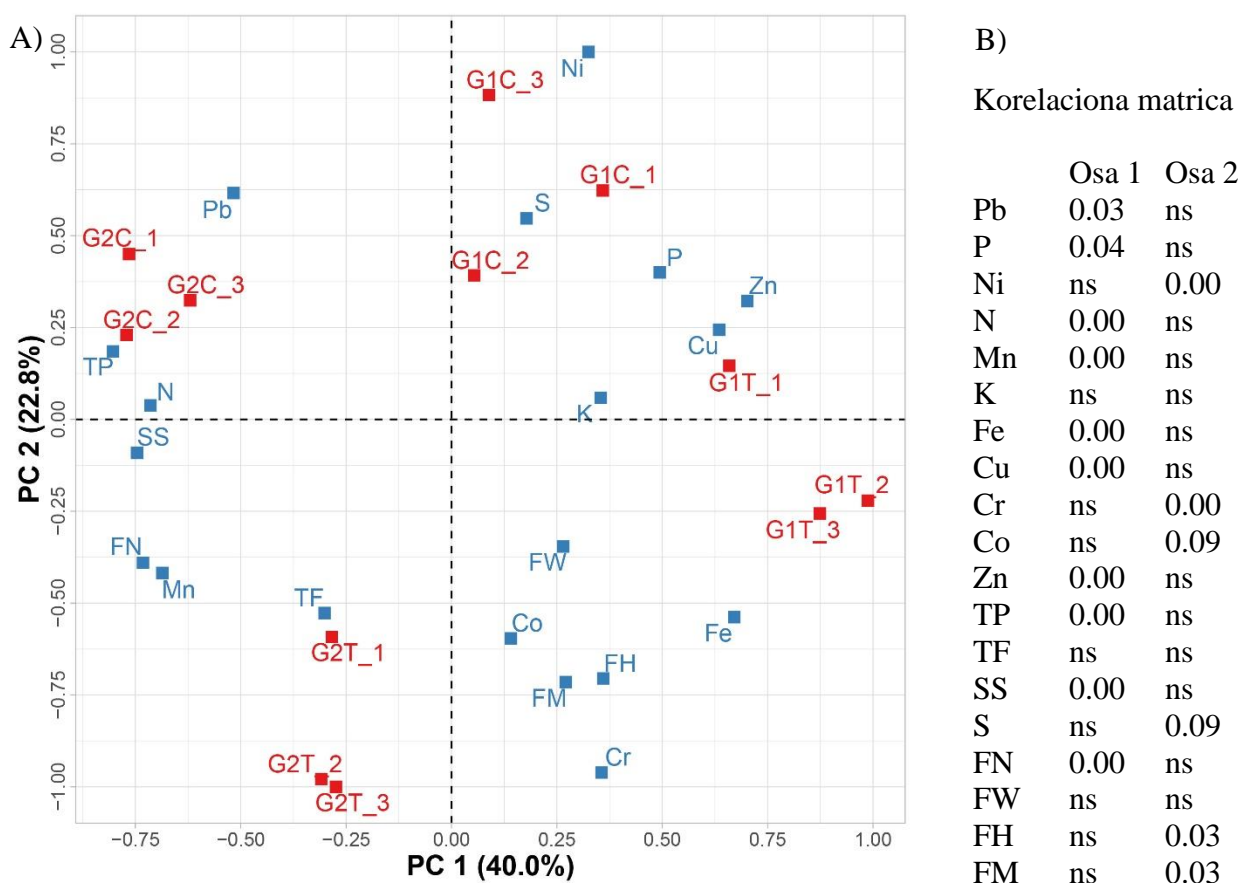
Analizom glavnih komponenti nadzemnih delova biljke objašnjeno je ukupno 78 % varijabilnosti (PC1 51.8 %; PC2 26.2%). PC1 jasno izdvaja dve ispitivane sorte paradajza. Od sedam testiranih

parametara pet (NBI, Chl, Flav, Anth i prečnik stabljike u osnovi) ima značajnu korelaciju sa osom 1. Od ispitivanih parametara četiri (RWC, Flav, prečnik stabljike u osnova i prečnik stabljike u sredini) imaju značajnu korelaciju sa osom 2 koja razdvaja sve tretmane, izuzev jednog kontrolnog uzorka sorte Nrvik koji je svrstan u grupu uzoraka kod kojih su biljke tretirane sa *T. harzianum* (Slika 48).

Analizom glavnih komponenti ploda objašnjeno je ukupno 62.8 % varijabilnosti (PC1 40 %; PC2 22,8 %). PC1 jasno izdvaja dve ispitivane sorte paradajza, kao i u predhodnom slučaju. Od devetnaest testiranih parametara, devet (Pb, P, N, Mn, Fe, Cu, Zn, ukupni polifenoli, rastvorni šećeri, broj plodova) ima značajnu korelaciju sa osom 1. Od ispitivanih parametara šest (Ni, Cr, Co, S, FH, FM) ima značajnu korelaciju sa osom 2 (Slika 49).



Slika 48. PCA analiza sedam testiranih parametara Chl, Flav, Anth, NBI, RWC (%), STB (prečnik stabljike u osnovi (cm)) i STM (prečnik stabljike u sredini (cm)) na dve sorte paradajza, pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gružanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gružanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T) (A). Korelaciona matrica (Pearson-ov produkt koeficijent korelacije) sa pridruženim *p* vrednostima između glavnih komponenti i analiziranih varijabli (B).



Slika 49. PCA analiza devetnaest testiranih parametara FW (širina ploda ($\text{cm } 10^{-2}$)), FH (visina ploda ($\text{cm } 10^{-2}$)), FN (broj plodova), FM (masa ploda (g)), TP (ukupni polifenoli ($\text{mg GEA}/100 \text{ g}$)), TF (ukupni flavonoidi ($\text{mg}/100 \text{ gDW}$)), S (skrob ($\text{mg}/\text{g DW}$)), SS (rastvorni šećeri ($\text{mg}/\text{g DW}$)), makroelementi N (%), P (ppm), K (ppm) i teški metali (ppm) Mn, Fe, Cu, Zn, Ni, Cr, Pb i Co. Analiza je sprovedena na dve sorte paradajza pri različitim tretmanima: kontrola narvik (G1C), kontrola gružanski zlatni (G2C), narvik u prisustvu *T. harzianum* (G1T), gružanski zlatni u prisustvu *T. harzianum* (G2T) (A). Korelaciona matrica (Pearson-ov produkt koeficijent korelacije) sa pridruženim *p* vrednostima između glavnih komponenti i analiziranih varijabli (B).

DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

5.1. Brzi odgovori

5.1.1. *Trichoderma* kao stimulatori klijanja

U cilju razumevanja mehanizama signalizacije proučavani su brzi odgovori biljaka paradajza u interakciji sa gljivama roda *Trichoderma*. Efekat gljiva roda *Trichoderma* na klijanje semena dve sorte paradajza gruzanski zlatni i narvik u ovom radu je ispitivan *in vitro* na MS podlogama dok još nije ostvaren fizički kontakt između gljive i semena. Pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) utvrđeno je da tokom prvih 48 h uzgajanja semena paradajza u kokulturi sa gljivama nije došlo do njihovog fizičkog kontakta.

Uticaj *Trichoderma* na rast i razvoj biljaka, iako sa njima nisu ostvarile fizički kontakt, pokazali su González-Pérez i sar. (2018). Spomenuti autori su istraživali *in vitro* uticaj *T. atroviride* i *T. virens* na biljke arabidopsisa. Biljke i gljive su uzgajane u istim Petri posudama, međusobno razdvojene pregradom, koja je sprečavala fizički kontakt. Biljke su rasle na MS podlogama, a gljive na PDA podlogama. Naučnici su utvrdili da su gljive u periodu 3 do 5 dana stimulisale rast biljaka. Zaključili su, da su biljke u prisustvu gljiva imale veći sadržaj auksina u korenu koji je bio stimulisan od strane lako isparljivih organskih jedinjenja (VOC) među kojima dominiraju seskviterpeni. Brojni drugi radovi potvrđuju da se primenom gljiva iz roda *Trichoderma* može pospešiti klijanje semena različitih vrsta biljaka. Konappa i sar. (2020) su u laboratorijskim uslovima sprovedli test klijavosti na semenima paradajza (Arka Meghali) koja su bila tretirana sa osam vrsta gljiva *Trichoderma*. Rezultati u ovoj disertaciji, kao i kod spomenutih istraživača, potvrdili su da su sve vrste gljiva *Trichoderma* stimulatивно delovale na klijanje semena. *T. harzianum* UNS35, *T. longibrachiatum* UNS11, *T. asperellum* T8 kao i *T. viride* UNS35 stimulisali su povećanje klijavosti semena paradajza za 9 %, u poređenju sa kontrolom, dok je taj procenat bio nešto niži kod *T. viride* UNS42 (8%), *T. longibrachiatum* UNS28 (7%), *T. asperellum* T4 (6%) i *T. harzianum* UNS10 (5%). Efekat stimulacije klijavosti semena od strane gljiva *Trichoderma* ovi autori povezuju sa mogućom povećanom sintezom biljnih hormona giberelina koji iniciraju klijanje i enzima amilaze koji ubrzava asimilaciju skroba. Jogaiah i sar. (2018) povećanje klijavosti semena različitih ispitivanih biljnih vrsta, kao i parametara rasta biljaka tretiranih sa *T. virens* povezuju sa efikasnijim unosom hranljivih materija i indukcijom indol sirćetne kiseline (IAA). Istraživanja sprovedena u laboratorijskim uslovima takođe su pokazala da sva tri ispitivana izolata *T. hrazianum* stimulišu klijavost nakon 48 h za oko 15 % (Anjum i sar., 2020). Eksperiment, koji su sprovedli u saksijama sa zemljištem, pokazao je još bolje rezultate, gde je klijanje semena povećano za oko 45 % u odnosu na kontrolu. Efekat stimulacije klijanja semena paradajza od strane gljiva roda *Trichoderma* You i sar. (2016) su pripisali fitohormona, koji su produkovani od strane ove gljive, kao što su giberelini i brasinosteroidi. Produkcija giberelina i brasinosteroida od strane gljiva roda *Trichoderma* primećena je i u studiji Chowdappa i sar. (2013).

Rezultati iz ove disertacije su u saglasnosti sa rezultatima iz prethodno citiranih radova. Klijanje semena obe sorte paradajza bilo je stimulirano od strane svih ispitivanih gljiva roda *Trichoderma*. Stimulacija klijanja semena se kretala od 10,23 % do 15,73 %. Semena paradajza gruzanski zlatni su najviše stimulirana od strane *T. hrazianum* u poređenju sa kontrolom, dok je klijanje semena paradajza narvik najviše stimulirano od strane *T. brevicompactum*. Za potrebe sprovođenja ovog oglada korišćena su visoko kvalitetna semena sa velikom energijom klijanja, međutim, primećeno je da gljive iz roda *Trichoderma* ostvaruju veći stepen efikasnosti pri stimulaciji klijanja starih semena,

kao i onih koja nisu na odgovarajući način skladištena. Buduća istraživanja treba usmeriti na ispitivanje semena sa malom energijom klijanja, jer ona predstavljaju veliki problem u poljoprivredi.

Poznato je da pod uticajem gljiva iz roda *Trichoderma* dolazi do promena u sastavu ćelijskog zida u korenu biljaka. Ćelijski zid biljaka se sastoji od veoma kompleksnih strukturnih elemenata čija kvantitativna zastupljenost se menja pod uticajem uslova spoljašnje sredine. Ćelijski zid je struktura koja se sastoji od polisaharida kao što su celuloza, hemiceluloza, pektin, polimera poput lignina uz prisustvo enzimskih i strukturnih proteina (Keegstra 2010).

Kako bi se okarakterisala stimulacija klijanja nakon 48h rasta u ko-kulturi sa gljivama roda *Trichoderma* primenjena je FTIR sprektroskopija kojom se prate biohemijske i promene funkcionalnih grupa jedinjenja, koja ulaze u sastav ćelijskog zida radikula semena paradajza. Na osnovu rezultata FTIR sprektroskopije, ustanovljeno je da se najveće promene u hemijskom sastavu radikula semena paradajza gruzanski zlatni i paradajza narvik, koja su klijala u kokulturi sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*, dešavaju u proteinskom delu spektra.

Intenzitet pikova proteinskih traka Amid I i Amid II kod sorte gruzanski zlatni i narvik je niži u tretmanu sa *T. brevicompactum* i *T. harzianum* u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati govore da su promene izražene u proteinskim metabolitima. Ovo ukazuje da je u interakciji sa gljivama doslo do opadanja ukupnog sadržaj proteina u radikulama semena paradajza

Pehlivan i sar. (2017) su primenom Bradford-ove metode ustanovili da semena i koren kukuruza koji su tretirani sa *T. lixii* imaju veći sadržaj rastvornih proteina. Alhomodi i saradnici su 2021. godine ispitivali uticaj *T. reesei* na nutritivni sastav klijanaca repice i došli do istog zapažanja kao i Pehlivan i sar. (2017). Primenom analizatora azota/proteina ustanovili su da *T. reesei* utiče na povećanje sadržaja proteina kod klijanaca repice. Tokom kolonizacije biljaka od strane gljiva roda *Trichoderma* dolazi do proteomskih promena u korenu i nadzemnim delovima biljke (Alfiky i sar., 2021.). Međutim, molekularni mehanizmi delovanja ovih gljiva na sadržaj proteina u korenu biljaka kada fizički kontakt nije ostvaren nisu dovoljno proučeni. Najverovatnije su za to zadužena isparljiva jedinjenja i/ili ekstraćelijski metaboliti gljiva koji mogu da migriraju kroz zemljište i hranljive podloge.

Dekonvolucijom proteinske trake Amid I, kod paradajza gruzanski zlatni, primećeno je da se udeo zaokreta u tretmanu sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* smanjuje za 15.7 % i 9.8 % u odnosu na kontrolu. Udeo α heliksa se povećao za 5.2 % u tretmanu sa *T. harzianum* i za 3.5 % u tretmanu sa *T. brevicompactum* u odnosu na kontrolu. Udeo β nabrane ravni se povećao u tretmanu sa *T. harzianum* za 14.6 %, dok se u tretmanu sa *T. brevicompactum* uvećao za 10.4 %. Dekonvolucijom proteinske trake Amid I, kada je u pitanju udeo zaokreta i β nabrane ravni, kod paradajza narvik primećeni su suprotni efekti gljiva, u odnosu na paradajz gruzanski zlatni. Udeo zaokreta kod paradajza narvik u tretmanu sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* se povećao za 6.8 % i 8.7 % u odnosu na kontrolu, dok se udeo β nabrane ravni smanjio u tretmanu sa *T. harzianum* za 23.9 %, a u tretmanu sa *T. brevicompactum* za 5.9 %. Udeo α heliksa u tretmanu sa *T. harzianum* se povećao kod paradajza narvik za 17.1 %, dok je u tretmanu sa *T. brevicompactum* došlo do blage inhibicije od 2.7 %.

Dekonvolucijom proteinske trake Amid II utvrđeno je da se udeo uređene i neuređene strukture proteina u tretmanima nije značajno promenio kod paradajza gruzanski zlatni. Međutim na osnovu dekonvolucije proteinske trake Amid II kod paradajza narvik, primećeno je da se udeo uređene strukture smanjuje uz paralelno povećanje neuređene strukture proteina u tretmanima sa *T. harzianum* za 18.2 % i 6.7 % kod *T. Brevicompactum*, u poređenju sa kontrolom. Ovi rezultati ukazuju da postoji razlika između dva sorte paradajza u finim strukturnim promenama nosintetisanih proteina indukovanih gljivom.

Na osnovu trake karakteristične za glikozidnu vibraciju polisaharida pektina i hemiceluloze ksiloglukana može se zaključiti da su gljive inhibitorno delovale na sadržaj pektina ili ksiloglukana u radikulama semena paradajza gruzanski zlatni i narvik. Istraživanja na korenu jare i ozime sorte pšenice u interakciji sa *T. cremeum* i *T. atroviride* takođe pokazuju da je sastav ćelijskog zida izmenjen (Basińska-Barczak i sar., 2020). Uočena je akumulacije lignina i reorganizacija pektina, što između ostalog upućuje da se testirane vrste gljiva mogu koristiti u zaštiti od patogena. U primarnom ćelijskom zidu biljaka, koje se nalaze u fazi razvoja, dolazi do povećanja u sadržaju celuloze, hemiceluloze i pektina (Keestra, 2010). S obzirom da su Rangel Pedersen i sar. 2021. godine dokumentovali da *T. reesei* luči enzime esterazu, ksiloglukanazu i β -1.4 endoglukanazu koje razgrađuju strukturu ksiloglukana, moguće je da se neki od spomenutih enzima nakupljaju u hranljivim podlogama i da su odgovorni za moguće smanjenje sadržaja ksiloglukana u radikulama semena paradajza koja su rasla u kokulturi sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*.

Prihvaćeno je mišljenje da su uspešni fitopatogeni mikroorganizmi razvili strategije zasnovane na efektorima kako bi izbegli odbrambene odgovore biljaka (Romero-Contreras i sar., 2019). Danas se LysM motivi intenzivno proučavaju zbog njihove uloge u interakciji biljka-patogen. LysM efektore koriste i simbiotske gljive kako bi unapredile interakciju sa biljkama. Ovi efektori imaju $\beta\alpha\beta$ sekundarnu strukturu, gde se oba α heliksa nalaze na istoj strani dve antiparalelne β nabrane ravni. Kod biljaka LysM motivi se nalaze u delu receptora, koji prepoznaje GlcNAc oligosaharide koji potiču od fitopatogenih gljiva. GlcNAc aktivira signalne kaskade posredovane MAP kinazama, uključujući i povećanu regulaciju kod nekoliko transkripcionih faktora, što dovodi do sinteze jedinjenja koja imaju odbrambenu funkciju (Romero-Contreras i sar., 2019). Moguće je da dve ispitivane sorte paradajza gruzanski zlatni i narvik sadrže različite proteine od kojih zavisi uspešnost vezivanja različitih efektor gljiva roda *Trichoderma*. Na osnovu ovakve pretpostavke moguće je izvesti zaključak da se jedan od faktora kojim gljive roda *Trichoderma* stimulišu klijanje semena biljaka zasniva na odnosu protein - efektor.

5.1.2. Vodni deficit i *Trichoderma*

Rane reakcije paradajza ailsa craig nastale u interakciji sa *T. brevicompactum* su ispitivane u cilju što boljeg shvatanja signalnih mehanizama u uslovima stresa suše. Istraživanja su sprovedena tokom 48 h od momenta aplikacije gljiva na biljke paradajza.

Odgovor mladih biljaka paradajza ailsa craig na prisustvo gljiva *T. brevicompactum* ispoljio se u vidu značajnog smanjenja provodljivost stoma od oko 40 % u odnosu na kontrolu, već nakon 2 h od momenta aplikacije gljive. Smanjenje provodljivosti stoma je bilo povezano sa paralelnim smanjenjem vodnog potencijala i povećanim sadržajem ABA u listu i korenu. U istom vremenskom periodu, biljke koje nisu zalivane imale su dvostruko veći sadržaj ABA kako u korenu, tako i u listu.

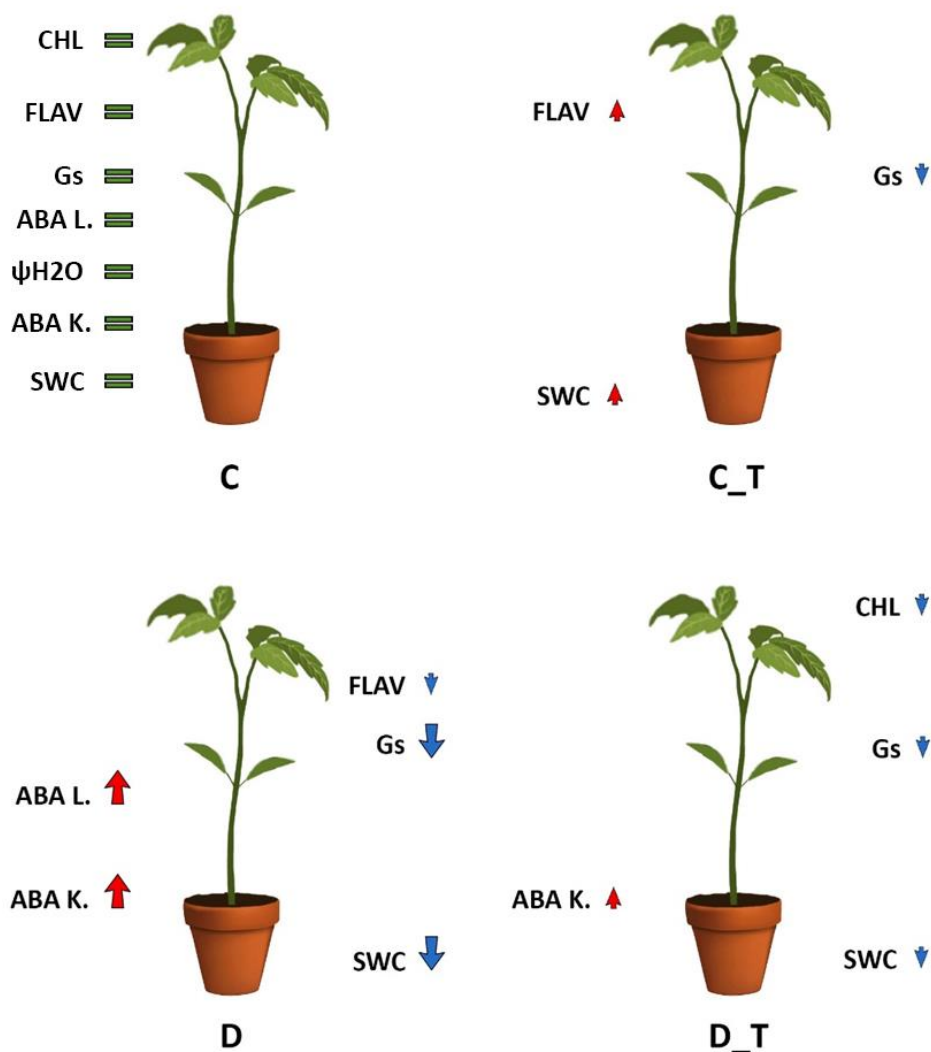
Aplikacija gljiva roda *Trichoderma* kod biljaka *Arabidopsis* dovodi do smanjenja provodljivosti stoma i transpiracije (Contreras-Cornejo i sar., 2015). Autori ovaj efekat pripisuju povećanoj koncentraciji ABA. Zaključak do kojeg su došli, ipak se može primeniti i na rezultate iz ove disertacije u uslovima primene samo gljive. Međutim kada su biljke istovremeno pod delovanjem suše, postoje dva signala od kojih je jedan prestanak zalivanja a drugi je tretman sa gljivom. Pojedinačno, oba signala su dovela do povećanja ABA, ali zajedno kada deluju ostvareni porast je manji od onog koji se dobija prostim zbirom pojedinačnih signala. Primećeno je da u tretmanu u kome biljke nisu bile zalivane *T. brevicompactum* inhibitorno deluje na sadržaj ABA u listu i korenu (Slika 50). Zatvaranje stoma ne mora da bude regulisano samo sadržajem ABA, već da na to mogu da utiču i drugi hemijski signali. Poznato je da pored ABA i drugi biljni hormoni poput salicilne

kiseline i etilena, zatim metabolita (prolin, poliamini i H₂S), kao i jona Ca²⁺ i prisustvo azot monoksida utiču na zatvaranje stoma (Agurla i sar., 2018). Gljive roda *Trichoderma* mogu da indukuje etilen kod biljaka paradajza (Leonetti i sar., 2017), a takođe je poznato da etilen može da inhibira sintezu ABA (She i Song 2012).

Veća provodljivost stoma zabeležena je kod biljaka koje su zalivane u odnosu na biljke kod kojih je obustavljeno snabdevanje vodom, takođe *T. brevicompactum* je stimulatивно delovala na provodljivost stoma biljaka kod kojih je obustavljeno zalivanje. Nakon 24 h *T. brevicompactum* je povećala provodljivost stoma za 77 %, a nakon 48 h provodljivost stoma je udvostručena. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa višim vodnim potencijalom i nižim vrednostima ABA u listu i korenu u poređenju sa biljkama koje nisu bile tretirane sa gljivom (Slika 50).

Sadržaj epidermalnih flavonola raste već nakon 2 h od početka aplikacije sa *T. brevicompactum*. Nakon prolaznog opadanja koje se desilo 24 h od momenta aplikacije, sadržaj epidermalnih flavonola je uvek povišen u tretmanu sa *T. brevicompactum*. Flavonoli kao bioaktivna jedinjenja iz porodice flavonoida imaju različitu ulogu kod biljaka poput zaštite od UV zračenja, deluju kao pigmenti, antioksidanti, regulatori transporta auksina, signalni su molekuli u simbiozi i imaju odbrambenu ulogu od patogena. Brotman i sar. (2013) su primetili da su geni biljaka koji posreduju u sintezi i metabolizmu sekundarnih jedinjenja nakon 24 h od momenta aplikacije gljiva roda *Trichoderma* smanjeno eksprimirani. Spomenuti autori smatraju da se ovim putem omogućava uspešna kolonizacija korena biljaka od strane gljiva *Trichoderma*. Na ovaj način može se objasniti opadanje indeksa epidermalnih flavonola u rezultatima iz ove disertacije koji se desio nakon 24 h, da bi već nakon 48 h epidermalni flavonoli statistički značajno bili veći kod biljaka tretiranih sa *T. brevicompactum*.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su epidermalni flavonoli i ABA uključeni u signalizaciju interakcije sa *T. brevicompactum*, a da biljke koje su izložene stersu suše u prisustvu *T. brevicompactum* imaju bolje adaptivne karakteristike. Kod biljaka u spomenutom tretmanu zabeležen manji porast ABA i veća provodljivost stoma, što utiče na povećanje intenziteta fotosinteze i rasta biljaka. Primećeno je da biljke paradajza u interakciji sa *T. brevicompactum* imaju niži sadržaj ABA u korenu (Racić i sar., 2018). Visok sadržaj ABA u korenu povezan je sa inhibicijom rasta biljaka, dok niži sadržaj ABA u korenu manje inhibira rast, što zapravo predstavlja adaptivnu prednost biljaka (Shi i sar., 2015).



Slika 50. Šematski prikaz rane reakcije paradajza nastale u interakciji sa *T. brevicompactum* nakon 48 h pri različitim tretmanima: optimalno zalivanje (C), optimalno zalivanje sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (C_T), prestanak zalivanja (D), prestanak zalivanja sa prisustvom izolata *T. brevicompactum* (D_T).

Mereni parametri: sadržaj hlorofila (CHL), sadržaj epidermalnih flavonola (FLAV), provodljivosti stoma (Gs), sadržaj apscisinske kiseline u listu (ABA L.), vodni potencijal lista (ψ H₂O), sadržaja apscisinske kiseline u korenu (ABA K.), sadržaj vode u zemljištu (SWC).

Veličinom crvenih strelica predstavljen je stepen stimulacije, dok je veličinom plavih strelica predstavljen stepen inhibicije ispitivanih parametara u odnosu na kontrolu koja je obeležena zelenim znakom jednakosti.

5.2. Dugoročni efekti

5.2.1. Suša i *Trichoderma*

5.2.1.1. Fotosintetski parametri i parametri rasta

U cilju definisanja molekularno-fizioloških pokazatelja pozitivnog odgovora biljaka na primenu gljiva iz roda *Trichoderma*, proučavani su efekti gljiva koji nastaju u dužim vremenskim intervalima kod biljaka paradajza u uslovima suše. Kako bi se povećala otpornost biljaka na sušu, biljke paradajza gruzanski zlatni tretirane su sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. Bilje paradajza gajene su sedam nedelja na platformi za fenotipizaciju u kontrolisanim uslovima. Posmatrani su i proučavani nastali dugoročni efekti gljiva na biohemijskom, morfo-fiziološkom i molekularnom nivou kod biljaka paradajza. Mnogi radovi govore o sposobnosti ovih gljiva da utiču na proces fotosinteze i povećaju efikasnost korišćenja vode, naročito kada su biljke izložene biotičkim ili abiotičkim vrstama stresa (Oljira i sar., 2020; Harman i sar., 2019; Fu i sar., 2018; Vitti i sar., 2016). U većini radova je primećeno da efekti gljiva roda *Trichoderma* koji nastaju prilikom interakcije sa biljkama pre svega zavise od njihovih genotipa.

Razvoj nedestruktivnih metoda i njihova primena u oblasti istraživanja fiziologije biljaka su doprinela razvoju tzv. platformi za fenotipizaciju gde se na ne-invazivan način daljinski mere i beleže morfološki i fiziološki parametri, automatski i to sa visokom vremenskom rezolucijom i preciznošću. Ovakva merenja se zasnivaju na različitim tehnikama snimanja kao što su: digitalno RGB snimanje, lasersko 3D skeniranje, toplotno infracrveno (IR), multi- i hiperpektralno snimanje, snimanje fluorescencije itd.

U ovoj tezi su primenjene nedestruktivne metode merenja indeksa hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeks balansa azota. Većina literaturnih podataka pokazuje da vodni deficit utiče na smanjenje sadržaja hlorofila u listu (Li i sar., 2019; Yuan i sar., 2016; Guller i sar., 2016). Takođe, tokom stresa suše kod biljaka dolazi i do nakupljanja sekundarnih metabolita flavonola (Shojaie i sar., 2016), koji imaju zaštitnu ulogu u raznim vrstama abiotičkog i biotičkog stresa (Tohge i sar., 2016). S obzirom da je većina istraživanja o uticaju vodnog deficita na biljke usmerena ka primarnom metabolizmu, u literaturi ima srazmerno malo podataka o ulozi flavonola na stres izazvan sušom (Fàbregas i sar., 2019). Flavonoli i antocijani pripadaju grupi flavonoidnih pigmenta. Poznato je da suša indukuje biosintezu antocijana mnogih biljaka ali molekularni mehanizmi i dalje u potpunosti nisu razjašnjeni (An i sar., 2020; Hinojosa-Gómez i sar., 2020). Rezultati iz ove disertacije su dobijeni na osnovu merenja koja su sprovedena 72 h od momenta postavljanja biljaka na platformu za fenotipizaciju. Iako je prestalo zalivanje biljaka u tremanu suše relativni sadržaj vode u zemljištu je jos bio na nivou kontrole, tako da u prvim merenjima, biljke jos nisu mogle da registruju sušu. Međutim prestanak zalivanja biljaka kao i efekti dodavanja *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu značajno uticali na indeks hlorofila. Vrednosti flavonola prvog dana merenja bile su negativne, što se objašnjava gajenjem biljaka bez prisustva UV zračenja pre prebacivanja na platformu, kao i na samoj platformi. Jedna od uloga flavonoida je i da štite biljke od UV zračenja. Kao posledica ovakvog načina gajenja u našem ogledu, nekada su vrednosti FRF_UV veće od FRF_R, što se u prirodi ne događa (Guidi i sar., 2016). Oporavak flavonola započeo je nakon što su biljke provele 5 dana na platformi, tj. započeo je onog dana kada je izvršena aplikacija gljive *Trichoderma*. Oporavak flavonola od 24 h do 72 h bio je najsporiji u suši, kod biljaka koje su bile tretirane sa *T. brevicompactum*. Vrednosti za indeks balansa azota u ispitivanom periodu do 72 h od momenta aplikacije gljiva su se smanjivale, zbog povećanog indeksa flavonola. Sadržaj antocijana se nije značajno menjao između tretmana u navedenom vremenskom intervalu. Međutim rezultati hiperspektralne analize, koje su pratile i dugoročne efekte suše, pokazuju da od momenta kada je SWC opao na 15 % , sadržaj antocijana kod biljaka izloženih suši raste u poređenju sa biljkama koje su optimalno zalivane, što je potvrđeno i na osnovu ekspresije *SIJAF13* gena. *T. harzianum* je kod biljaka izloženih vodnom počevši od momenta

kada je SWC opao na 15 % pa sve do početka formiranja plodova pozitivno uticala na sadržaj indeksa antocijana. Literaturni podaci su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima i govore da gljive roda *Trichoderma* mogu da utiču na povećanje koncentracije antocijana kod biljaka koje su izložene različitim vrstama stresa (Iula i sar., 2021). Gljive roda *Trichoderma* mogu da utiču i na povećanje antocijana u listu paradajza čak i kada se biljke gaje u optimalnim uslovima u stakleniku (23/20 °C; 65–70% vlažnosti vazduha) (Elkelish i sar., 2020). Povećan sadržaj antocijana može da predstavlja adaptivnu prednost za biljke. Antocijani mogu da povećaju otpornost biljnih tkiva na mehanička oštećenja, štite biljke od patogenih mikroorganizama i UV zračenja, a privlačenjem insekata doprinose oprašivanju i raznošenju semena (Liu i sar., 2018). U našem ogledu antocijani su mogli da učestvuju u inaktivaciji reaktivnih kiseoničnih formi i da na taj način obezbede adaptivnu prednost biljkama koje su bile izložene suši.

Smanjenje intenziteta razmene gasova, jedan je od osnovnih uticaja suše na biljke. Prilagođavanje biljka, u cilju sprečavanja prekomernog odavanja vode, najčešće se ogleda u vidu zatvaranja stoma, što je regulisano od strane ABA transdukcionog signalnog mehanizma (Hasanagić i sar., 2020). Negativna strana ovog procesa je narušavanje odnosa CO₂ / O₂, što se direktno odražava na proces fotosinteze (Lehmann i Or 2015). Zbog sposobnosti regulacije nivoa gasova (CO₂ i O₂) i sprečavanja odavanja vode, stome se smatraju najbitnijim činiocem, koji utiče na rast biljaka i na njihovu toleranciju na sušu. Promena broja i gustine stoma kao i smanjenje njihove veličine su efikasni načini za sprečavanje preteranog odavanja vode kod biljaka (Zahao i sar., 2015). Istraživanje Hasanagić i sar. (2020) na biljkama paradajza, podvrgnutih dejstvu suše, pokazala su da je prvi rani odgovor biljaka na sušu zatvaranje stoma, a da se nakon petnaest dana dimenzije stoma paradajza smanjuju za 20 %. Provodljivost stoma se reguliše otvaranjem i zatvaranjem stoma, pri čemu je smanjenje provodljivosti stoma uglavnom praćeno i smanjenjem transpiracije, te se na ovaj način postiže održavanje vodnog režima biljaka. Prihvaćeno je mišljenje, da je smanjenje provodljivosti stoma, pod uticajem stresa suše, izazvano hemijskom signalizacijom, koja se kreće od korena do izdanka (Wei i sar., 2020). Promene fotosinteze i provodljivost stoma, usled dejstva suše, mogu biti uzročno – posledičnog karaktera, ali to ne znači da je intenzitet fotosinteze limitiran samo provodljivošću stoma. Nestomatalno ograničavanje fotosinteze izazvano je biohemijskim promenama u listovima biljaka, koje se dešavaju usled fotofosforilacije, aktivnosti Rubisco, regeneracije RuBP, kao i sinteze ATP (Pan i sar., 2020). Nestomatalno smanjenje efikasnosti fotosinteze u suši uzrokovano je smanjenjem nivoa enzima koji su uključeni u Kalvinov ciklus (Pinheiro and Chaves 2011). Naime, nedostatak CO₂ narušava ravnotežu između apsorbovane i potrošene svetlosne energije što se obično ispoljava u vidu prekomerne proizvodnje reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS), koja dovode do oštećenja biomolekula (Sharma i sar., 2012). Smanjena koncentracije CO₂ i narušena regeneracija NADP⁺ dovode do pojačanog „curenja” elektrona kiseonika dejstvom Mehlerove reakcija, čiji su proizvod superoksid anjonski radikali i vodonik peroksid (Noctor i sar., 2002).

Očekivano, rezultati iz ove disertaciji pokazuju da su intenzitet fotosinteze, provodljivost stoma i intenzitet transpiracije smanjeni pod uticajem vodnog deficita. Inbicija intenziteta fotosinteze uticala je na povećanje temperature biljaka paradajza podvrgnutih stresu suše. Zabeleženo je i progresivno povećanje intracelularne koncentracije CO₂, tokom trajanja ogleda, kod biljaka izloženih vodnom deficitu, nasuprot optimalno zalivanim biljkama kod kojih je došlo do blagog smanjenja ispitivanog parametra. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa radovima čija istraživanja su sprovedena na biljkama paradajza u uslovima suše. Dokazano je da tokom postepenog napredovanja suše u listovima paradajza intenzitet fotosinteze i transpiracije opadaju i to skoro sinhrono istom brzinom (Liang i sar., 2020; Hasanagić i sar., 2020; Zhang i sar., 2019). Smanjenje fotosintetičkih parametara u uslovima vodnog deficita zabeleženo je kod različitih genotipova paradajza u brojnim radovima (Liang i sar., 2020; Hasanagić i sar., 2020; Sivakumar i sar., 2014).

U rezultatima iz ove disertacije, primećeno je da *T. harzianum* u tretmanu suše blago stimuliše intenzitet fotosinteze i brzinu linearnog elektronskog transporta kroz PS II, dok kod optimalno zalivanih biljaka stimuliše provodljivost stoma i intracelularnu koncentraciju CO₂. Kod optimalno zalivanih biljaka prisustvo *T.brevicompectum* je blago stimulisala provodljivost stoma i intenzitet

transpiracije ali ne i intenzitet fotosinteze. Stimulacija intenziteta fotosinteze od strane *T. harzianum* u tretmanu suše dovela je do statistički značajnog smanjenja temperature biljaka. Navedene promene ukazuju da *T. harzianum* ublažava efekte suše. Povećanje efikasnosti intenziteta fotosinteze od strane gljiva roda *Trichoderma* zabeležena je u brojnim istraživanjima. Alexandru i sar. (2013) su sprovedli istraživanje o uticaju šest vrsta gljiva iz roda *Trichoderma* na intenzitet fotosinteze u listovima paradajza. Rezultati spomenutih naučnika su pokazali da *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. tomentosum*, *T. viride* povećavaju efikasnost fotosinteze. Intenzitet fotosinteze najviše je bio stimulisan od strane *T. harzianum* i bio je povećan čak osam i po puta. Jedino, prisustvo *T. virens* nije dovela do značajnog povećanja ispitivanog parametra. Gljive iz roda *Trichoderma* mogu pozitivno da utiču na efikasnost intenziteta fotosinteze u uslovima stresa poput suše (Harman i sar., 2019; Shukla i sar., 2015), patogena (Alexandru i sar., 2013) ili povećane koncentracije soli u zemljištu (Oljira i sar., 2020; Fu i sar. 2018). Trend stimulacije efikasnosti fotosinteze i provodljivost stoma od strane *T. harzianum* u uslovima vodnog deficita zabeležena je i u istraživanju Shukla i sar. (2015) sprovedenom na pšenici. Fiorini i sar. (2016) ističu da *T. harzianum* T6776 utiče na stomatalne i nestomatalne faktore koji doprinose stimulaciji efikasnosti fotosinteze. Vargasa i sar. (2009) su stimulaciju efikasnosti fotosinteze od strane *T. virens* na biljke kukuruza pripisali povećanoj aktivnosti Rubisco enzima. Do sličnog zaključka došli su Shores i Harman (2008) koji su primetili povećanu ekspresiju gena Rubisco i PSII O₂ECP2 proteina (oslobađajući kompleks protein 2) kod kukuruza tretiranog sa *T. harzianum* T-22. Mustori i sar. su 2012 pokazali da je *T. harzianum* T-22 povećala ekspresiju gena glutation-askorbatnog ciklusa i da je povećala nivo enzima zaduženih za uklanjanje ROS iz hloroplasta. Na ovaj način može da se objasni povećanje efikasnosti fotosinteze biljaka do koje dovode gljive roda *Trichoderma*. Harman i sar. (2019) takođe, potvrđuju da gljive roda *Trichoderma* povećavaju efikasnost fotosinteze utičući na regulatorne mehanizme koji su odgovorni za ekspresiju gena.

Nefotohemijско gašenje fluorescencije hlorofila (NPQ) odražava nivo odavanja energije u obliku toplote sa antena PS2. Aktiviranje NPQ je zaštitni mehanizam kojim se odaje višak svetlosne energije u vidu toplote (Huang i sar., 2012). Istraživanja Grieco i sar. (2020) na pšenici, Karlusich i sar. (2020) na krompiru, Fernández-Calleja i sar. (2020) na ječmu, pokazuju da NPQ raste u suši. Istraživanja Zhou i sar. (2019) su takođe pokazala da u listovima paradajza dolazi do blagog porasta vrednosti NPQ. Nefotohemijско gašenje fluorescencije hlorofila se u rezultatima iz ove disertacije progresivno povećavalo kod biljaka koje su bile izložene suši. Paralelno sa povećanjem NPQ došlo je do smanjenja brzine linearnog elektronskog transporta kroz PS II (ETR). Povećanje NPQ izazvano stresom ukazuje na njegovu važnu ulogu u ublažavanju štetnih efekata po biljku i njenu adaptaciju na uslove stresa (Kuhlgert i sar., 2016). NPQ je neophodan za postizanje homeostaze u toku raspodele energije koja se troši za rasu biljaka i na odgovor na stres regulisanjem fotoinhibicije i fotozaštite (Yang i sar., 2020). Smanje vrednosti ETR bilo je veće kod optimalno zalivanih biljaka, kako je eksperiment odmicao, nego kod biljaka podvrgnutih vodnom deficitu. Smanjenje ETR kod biljaka, pod dejstvom suše, uglavnom je izazvano nedostatkom CO₂ unutar listova, tj. zatvaranjem stoma (Brestic i Zivcak 2013). Reultati iz ove disertacije su u saglasnosti sa podacima u radu Shamim i sar. (2013), koji su sprovedli istraživanje na petnaest vrsta paradajza koji su se nalazili pod dejstvom suše. Zaključak, do kojeg su došli, da genotipovi paradajza koji su otporniji na vodni stres imaju veću razliku između NPQ i ETR. Do ove razlike dolazi usled smanjenja vrednosti ETR uz paralelno povećavanje vrednosti NPQ. Na ovaj način biljke se štite i od fotoinhibicije i fotodegradacije.

Merenjem fluorescencije hlorofila dobijaju se podaci koji govore o efikasnosti PS II i oni ukazuju na eventualne poremećaje u transportu elektrona (Badr i Brueggemann, 2020). Informacije o PS II predstavljaju pouzdan pokazatelj otpornosti biljaka na razne vrste stresa, to je ujedno i jedna od najosetljivijih komponenti na vodni deficit (Liu i sar., 2018). Jedan od najčešće korišćenih i najvažnijih parametara u fiziološkim istraživanjima, koji govori o efikasnosti fotosinteze je maksimalan kvantni prinos fotohemije fotosistema II (Fv/Fm) (Brestic i Zivcak 2013). Međutim ovaj parametar nije osetljiv na stomaterne efekte, kao ni na bilo koje druge efekte koji se javljaju u umerenom stresu suše. Vrednosti Fv/Fm su izuzetno stabilne i počinju da opadaju tek na nivou stresa

koji dovodi do uvenuća biljka. Međutim merenje vrednosti Fv/Fm tokom suše svakako ima smisla jer može da ukaže na udruženo delovanje više stresogenih faktora (toplota, fotoinhibicija, povećana koncentracija soli u zemljištu...) ili na pojavu rane faze starenja listova (Brestic i Zivcak 2013). Odnos Fv/Fm zdravih biljka iznose približno 0.83, međutim on u manjoj meri može da varira između biljnih vrsta (Badr i Brueggemann, 2020). Odnosi Fv/Fm u svim tretmanima, tokom celog trajanja oglada, nisu se menjali i iznosili su tačno 0.83 što je u skladu sa prethodnu citiranim radovima. Suša je značajno redukovala druge parametre fluorescencije hlorofila kao što su fluorescencija hlorofila u ravnotežnom stanju (Rfd_1ss), stvarna fotohemijska efikasnost (Qy_1ss) i koeficijent fotohemijskog gašenja (qP_1ss). Parametari fluorescencije hlorofila pokazuju da je efikasnost PS II ostala nepromenjena što govori o tome da opadanje ŠWC na 15 % kod biljka nije dovelo do pojave ekstremnog stresa suše. Dugoročno posmatrano, *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu ispoljile efekte na ispitivane parametre fluorescencije hlorofila, ali je zabeleženo da obe ispitivane gljive utiču na smanjenje parametara Rfd_1ss, Qy_1ss i qP_1ss kod optimalno zalivanih biljaka ali samo do petog dana od momenta njihove inokulacije. Različita istraživanja govore da efikasnost PS II neće biti narušena sve do pojave ekstremne suše (Tezara i sar., 1999; Flagella i sar., 1998).

Parametri efikasnosti korišćenja vode (WUE i WUEi) su važan pokazatelj otpornosti biljaka na vodni deficit. Biljke sa visokom efikasnošću iskorišćavanja vode, uopšteno, otpornije su na uslove suše. Efikasnost korišćenja vode sa agronomskog aspekta se definiše kao količina proizvedene biomase po jedinici zapremine potrošene vode (Cantero-Navarro i sar., 2016). Sa fiziološke strane gledišta razlikujemo trenutnu efikasnost korišćenja vode (WUE) i unutrašnju efikasnost korišćenja vode (WUEi). WUE se definiše kao odnos neto fotosinteze i brzine transpiracije, dok WUEi predstavlja odnos neto fotosinteze i provodljivost stoma. Smatra se da je glavni regulator koji utiče na WUE u uslovima stresa, etilen i njegov prekursor 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina (ACC) koji uzrokuje starenje, epinastiju, apcisiju i rast listova (Cantero-Navarro i sar., 2016). Efekat ACC je verovatno delimično posredovan i interakcijom sa ABA, koja održava rast lišća suzbijanjem biosinteze etilena (Sharp i LeNoble 2002). U rezultatima iz ove disertacije parametri WUE i WUEi imale su sličan trend u svim tretmanima. U listovima paradajza u tretmanu suše od momenta opadanja SWC na 15 %, sve do perioda formiranja prvih plodova vrednosti WUE su bile veće oko dva puta u poređenju sa kontrolom, dok su vrednosti WUEi bile veće do četiri puta u poređenju sa kontrolom. Rezultati su očekivani, s obzirom da se u uslovima suše povećava efikasnost korišćenja vode, što je uzrokovano smanjenom provodljivost stoma (Franks i sar., 2015). Slične rezultate dobili su i Zsögön i sar. (2017) koji su pratili uvenuće paradajza izazvano sušom. Kroz radove Zheng i sar. (2013) i Patané i sar. (2011) koji su istraživanja sprovedli na paradajzu kao i Kang i sar. (2002) koji su istraživanje sprovedli na ozimoj pšenici, dokazano je da uticaj suše optimizuje i povećava efikasnost korišćenja vode. Međutim, statistički značajne razlike između dva režima zalivanja izgubile su se tokom perioda formiranja prvih plodova. Ispoljeni efekat se može objasniti time što fiziološke osnove otpornosti biljaka na sušu i povećanje vrednosti WUE ne moraju u svim fenofazama da prate ovaj obrazac i neretko je potrebno pristupiti ispitivanju ovog parametra kao zasebnog problema (Zsögön i sar., 2017). Rezultati iz ove disertacije pokazuju da *T. harzianum* blago stimuliše unutrašnju i trenutnu efikasnost korišćenja vode kod biljaka podvrgnutih suši. Međutim tokom perioda formiranja prvih plodova *T. brevicompactum* je u tretmanu suše, značajno smanjila unutrašnju efikasnost korišćenja vode za 20 %. Razumevanje fizioloških mehanizama, koji dovode do poboljšanja trenutne i unutrašnje efikasnosti korišćenja vode paradajza, imalo bi velike pozitivne ekološke i ekonomske efekte (Zsögön i sar., 2017; Cantero-Navarro i sar., 2016). Primera radi, povećanje od svega 10 % WUE kod paradajza, koji se gaji u plastenicima i staklenicima širom Mediterana, dobila bi se ušteda od 1.1 hm³ vode (ekvivalentno godišnjoj potrošnji vode 20000 ljudi) (Isendahl i Schmidt 2006). Ostali ispitivani parametri razmene gasova u tretmanima sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu se značajno menjali. Vitti i sar. (2016) su zabeležili slične trendove. U njihovom istraživanju *T. harzianum* T22 nije ostvarila značajne efekte na intracelularnu koncentraciju CO₂ i stomatalnu provodljivost biljaka paradajza, koje su bile stare dva meseca i dobro opskrbljene vodom.

Tokom stresa suše, kod biljaka, dolazi do smanjene aktivnosti adenzinotribofosfataze (ATP-aze), što se direktno odražava na smanjene transporta protona (fluksa H^+) kroz tilakoidnu membranu, što direktno utiče na povećanje NPQ (Yang i sar., 2020). Povećana provodljivost protona preko ATP sintetaze (gH^+) predstavlja i jednu vrstu adaptacije biljaka na visoke temperature (Kohzuma i sar., 2009). Smanjenje gH^+ u suši primetili su i Zivcak i sar. (2014), prilikom istraživanja sprovedenih na pšenici. Do istog zapažanja došli su i Dahal i Vanlerberghe (2018) prilikom istraživanja koja su sprovedena na biljkama duvana. Vrednosti provodljivosti ATP sintetaze za protone, u ogledu iz ove disertacije u periodu kada je SWC opao na 15 % su niže u tretmanu suše što je u saglasnosti sa prethodno citiranim radovima. Međutim u periodu formiranja plodova više vrednosti gH^+ su zabeležene u tretmanu suše. *T. harzianum* je statistički značajno uticala na povećanje gH^+ kod biljaka izloženih suši u periodu kada je SWC opao na 15 %, međutim u periodu formiranja plodova *T. harzianum* je smanjila gH^+ . Sa druge strane *T. brevicompactum* pokazuje trend stimulacije ispitivanog parametara kod oba režima zalivanja u svim vremenskim tačkama.

Zatvaranje stoma uzrokovano sušom dovodi do smanjenja linearnog elektronskog transporta (LEF) koji reguliše fluks protona oko PS1 (Kohzuma i sar., 2009). Nakon sedmodnevne izloženosti dejstvu suše biljke *Citrullus lanatus* imaju smanjenu vrednost LEF za 50 % (Kohzuma i sar., 2009). U rezultatima iz ove disertacije vrednosti LEF su bile niže u tretmanu suše, dok je najveća razlika od oko 65 % zabeležena između dva režima zalivanja nakon pada SWC na 15 %. Efekti gljiva iz roda *Trichoderma* nisu statistički značajno uticali na LEF. Signal elektrohromnog pomeraja (ECSt) odražava promene u električnom polju pobuđene tilakoidne membrane, što se reflektuje u vidu nagomilavanja tilakoidne proton - motorne sile (PMF) dejstvom fotohemijskih reakcija i ATP-aze (Kuhlgert i sar., 2016). ECSt kontroliše fluks protona kroz lumen tilakoida, ukazujući na promene u apsorbanci unakrsnih membranskih karotenoidnih pigmenata (Pleban i sar., 2020). Parametar ECS se koristi za ispitivanje regulacije tilakoidne PMF, koji veliki broj autora smatra glavnim regulatornim intermedijerom, koji ko-reguliše svetlu i tamnu fazu fotosinteze (Kohzuma i sar., 2013). Parametar ECSt je veoma osetljiv na uslove iz spoljašnje sredine, pogotovo na one koji utiču na unutrašnji nivo CO_2 kao što je abiotski stres suše, te stoga može biti veoma koristan pokazatelj zdravstvenog stanja biljaka i njihovog fotosintetičkog regulatornog kapaciteta (Kuhlgert i sar., 2016). Rezultati iz ove disertacije pokazuju da do statistički značajnog smanjenja ECSt dolazi u tretmanu suše kada su biljke u fazi formiranja plodova. Rezultati pokazuju da *T. harzianum* statistički značajno u oba režima zalivanja smanjuje ECSt u momentu kada SWC iznosi 15 %. Međutim kada su biljke paradajza u fazi formiranja plodova *T. harzianum* i *T. brevicompactum* ne dovode do statistički značajnih razlika između tretmana. Ukoliko su biljke izložene nekoj vrsti stresa, naročito suši, očekivano je smanjenje ECSt i LEF do kojeg dolazi usled smanjenja intracelularne koncentracije CO_2 , koja uzrokuje smanjenje kapaciteta ATP sintaze (Ben-Jabeur i sar., 2021; Kuhlgert i sar., 2016). Prikazani rezultati u ovoj tezi pokazuju da je došlo do opadanja vrednosti parametara ECSt i LEF u suši, što je u saglasnosti sa prethodno navedenim radovima. Smanjenjem vrednosti ECSt i LEF redukuje se sposobnost biljaka da iskoriste energiju NADP i ATP koja je proizvod LEF. Ovaj vid regulacije na uslove stresa je najverovatnije posledica prilagođavanja efikasnosti PS2 kako bi se sinteza NADPH i ATP podudarala sa smanjenom asimilacijom CO_2 , kao i metaboličkom potrošnjom ATP i NADPH u Kalvinovom ciklusu i drugim anaboličkim procesima unutar hloroplasta (Ben-Jabeur i sar., 2021).

Sadržaj hlorofila u listovima određuje kapacitet fotosinteze odnosno rast biljaka, tako je u uslovima dobre opskrbljenosti vodom sadržaj hlorofila uglavnom veći. Postoje studije koje potvrđuju ovu hipotezu i u kojima je utvrđeno da stres izazvan sušom, kod biljaka paradajza, dovodi do opadanja sadržaja hlorofila a, hlorofila b i karotenoida. Kod optimalno zalivanih biljaka paradajza dolazi do progresivnog povećanja sadržaja hlorofila od faze klijanaca pa sve do faze potpune zrelosti plodova, u poređenju sa biljkama koje su bile izložene vodnom deficitu (Yuan i sar., 2016). Opadanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata Sánchez-Rodríguez i sar. (2012) su objasnili kao mehanizam kojim biljke reagovanju na sušu, kako bi se umanjila apsorpcija svetlosti od strane hloroplasta. Međutim postoje i istraživanja koja pokazuju da da pri naglom nastanu vodnog deficita ne dolazi do promene u sadržaju fotosintetičkih pigmenata (Zgalla i sar., 2006). Takođe, postoje literaturni podatci koji govore da

suša može i da povećava sadržaj fotosintetičkih pigmenta paradajza kada se oni izražavaju po jedinici lisne površine (Tamburino i sar., 2017). Međutim, ovakvi efekti se mogu pripisati i tome što suša inhibira rast površine što utiče na povećanje debljine lista. Ovo govori o tome da je koncentracija pigmenta po jedinici lisne površine veća ali to ne mora značiti da je i sadržaj pigmenta u celom listu veći. U rezultatima iz ove disertacije vodni deficit je kod mladih gornjih listova paradajza doveo do povećanja sadržaja hlorofila a, hlorofila b kao i karotenoida. Navedeni rezultati dobijeni biohemijskom metodom i izraženi su preko jedinice lisne površine. Međutim kada se hiperspektralnom kamerom snimaju svi listovi na biljkama primećuje se inhibicija ukupnog sadržaja hlorofila i karotenoida. Dobijeni rezultat je posledica toga što se je suša ubrzala starenje listova pozicioniranih u središnjem delu, a naročito donjih listova paradajza. Do sličnog zaključka došli su i Zhou i sar. 2017. godine prilikom proučavanja uticaja suše na tri sorte paradajza.

Morfološki parametri poput površine listova, sveže i suve mase listova, stabla i korena nakon I i II žetve, očekivano bili su značajno redukovani u uslovima suše. Najviši stepen inhibicije primećen je kako je suša odmicala tj. kada su biljke bile u fazi formiranja plodova. Sveža masa stabla i korena inhibirana je za oko 90 % , a masa listova za oko 85 %. Redukcija suve mase listova, stabla i korena u tretmanu suše iznosila je oko 85 %. Inhibicija koja se javlja usled stresa izazvanog zbog vodnog deficita je rezultat brojnih odgovora na različitim nivoima: molekularnom, biohemijskom i fiziološkom (Koch i sar., 2019). Prethodno je navedeno da u uslovima suše opada turgorov i vodni potencijal biljaka što dovodi do zatvaranja stoma i odražava se na procese fotosinteze, usled čega dolazi do inhibicije rasta i razvoja biljaka. Takođe, u suši dolazi do povećanja aktivnosti enzima i hormona na nivou korenovog sistema, a transport ovih hemijskih signala odvija preko ksilema do nadzemnih delova biljke gde oni utiču na rast i razvoj biljaka. U rezultatima iz ove disertacije primećeno je i blago stimulatívno dejstvo *T. harzianum* od oko 5 % na većinu ispitivanih parametara, dok je *T. brevicompactum* ispoljila trend blage stimulacije na površinu listova biljka kod oba režima zalivanja. Tucci i sar. (2012) su ispitivali uticaj *T. atroviride* P1 *T. harzianum* T22 na pet vrsta genotipa paradajza i uočili su pozitivne efekte u pogledu povećanja sveže i suve mase korena kod većine ispitivanih biljaka. Drugi autori su pokazali direktni efekt gljiva roda *Trichoderma* na povećanju dostupnost hranljivih materija te onda i povećano usvajanja od strane biljaka, kao i indirektno efekte preko reakcije zakišeljavanja, helacije, hidrolize i redoks reakcije, koje dovode do povećanja biomase paradajza (Li i sar., 2015; Singh i sar., 2014; Singh i sar., 2013).

Poznato je da stres izazvan vodnim deficitom utiče na brzinu formiranja plodova i prinos (Quinet i sar., 2019), što je potvrđeno i u rezultatima iz ove disertacije. Plodovi su se brže formirali kod optimalno zalivanih biljaka u odnosu na biljke izložene suši. Na kraju eksperimenta, tj. nakon 46 dana uzgajanja biljaka na platformi za fenotipizaciju, 66 % biljaka je imalo formirane plodove u kontroli, dok je u tretmanu suše svega 22 % biljaka imalo formirane plodove. U suši je smanjeno formiranje i razviće plodova, što je direktna posledica promene odnosa između organa koji snabdevaju biljku asimilatima i organa korisnika tih asimilata, takozvani source / sink odnos (Muller i sar., 2011). Do pojave ovog efekta dolazi zbog nedovoljne količine vode, koja je potrebna za održavanje turgorovog potencijala i ograničenog dotoka asimilata u plodove. *T. harzianum* je stimulatívno delovala na brzinu formiranja plodova, kako u tretmanu suše, tako i kod optimalno zalivanih biljaka. Nakon 45 dana sve optimalno zalivane biljke imale su formirane plodove u tretmanu sa *T. harzianum*, u tretmanu sa *T. brevicompactum* 20 % biljaka je imalo formirane plodove, dok je kontrola imala 44 % biljaka sa formiranim plodovima. U tretmanu suše *T. harzianum* kao i *T. brevicompactum* stimulisale su formiranje plodova. Nakon 45 dana 33 % biljaka tretiranih sa *T. harzianum* i 20 % biljaka tretiranih sa *T. brevicompactum* imalo je formirane plodove, dok je u tretmanu suše bez dodatka *Trichoderme* svega 10 % biljaka bilo sa formiranim plodovima. Istraživanja pokazuju da *T. harzianum* pozitivno utiče na prinos paradajza (Bal i sar., 2006), kao i da povećava njegov prinos čak i u uslovima povećane koncentracije soli u zemljištu (Daliakopoulos i sar., 2019). Lombardi i sar. (2020) su u svojim istraživanjima došli do zaključka da *T. harzianum* (T22 i TH1) i *T. virens* pozitivno utiču na prinos i povećanje kvaliteta ploda jagoda. *T. harzianum* T1 ostvarila najbolje rezultate stimulišući prinos i broj formiranih plodova za 38 %. Lee i sar. (2016) su ispitivali uticaj lako isparljivih organskih

jedinjenja (VOC) na biljke paradajza, koje proizvode gljive roda *Trichoderma*. Spomenuti autori su pokazali da različite vrste gljiva *Trichoderma* proizvode veliku količinu terpena, koje takođe proizvode i biljke i ustanovili su da gljive, koje su imale tendenciju da proizvode veću količinu terpena više podstiču cvetanje i formiranje plodova. Na osnovu ovoga, izveli su hipotezu da VOC koja proizvodi *Trichoderma* ubrzavaju cvetanje i formiranje plodova. Istraživanja o uticaju biljnih hormona na procese formiranja i sazrevanja plodova paradajza uključujući i genske regulacije sinteze hormona govore da su auksini, citokinini, giberelini, primarni regulatori koji učestvuju u procesu formiranja plodova, dok etilen i brasinosteroidi takođe imaju važnu ulogu u ovom procesu (Kumar i sar., 2013). S obzirom da gljive roda *Trichoderma* mogu da proizvode navedene biljne hormone ili da utiču na njihovu sintezu u biljnom tkivu može da se izvede hipoteza da gljive roda *Trichoderma* mogu da utiču na brzinu formiranja plodova proizvodnjom i / ili promenom sadržaja hormona u biljnom tkivu.

Dokazano je da *T. harzianum* indukuje produkciju etilena kod biljaka paradajza (Leonetti i sar., 2017), zatim da *T. asperellum* menja ekspresiju marker gena zaduženih za put auksina (Zhang i sar., 2018), dok su Jaroszuk-Ścisiel i sar. (2019) pokazali da auksine i gibereline može da sintetiše i *Trichoderma* DEMTkZ3A0. Prvi trag da *Trichoderma* utiče na odnos source / sink zabeležili su Vargas i sar. (2009 i 2011). Na osnovu ovoga moguće je postaviti još jednu hipotezu, da gljive roda *Trichoderma* stimulišu prinos i brzinu formiranja plodova utičući na odnos source / sink.

5.2.1.2. Signalizacija, genska aktivnost i sekundarni metabolizam

Prilikom interakcije biljaka i mikroorganizama dolazi do promena u nivou signalnih molekula salicilne kiseline (SA), jasmonske kiseline (JA) i abscisinske kiseline (ABA) što je povezano sa razvojem i odbrambenim sistemom biljaka (Ilyas i sar., 2021). Jedna od ključnih reakcija u biosintezi ABA regulisana je od strane *NCED* gena. Ovaj gen kodira regulatorni enzim 9-cis-epoksikarotenoid dioksigenazu koji ograničava brzinu biosinteze ABA (Petrović i sar., 2021). Povećana ekspresija *NCED1* gena javlja se kao odgovor biljaka na uslove vodnog stresa. Petrović i sar. su 2021. godine primetili da suša kod sva četiri ispitivana genotipa paradajza u listu indukuje porast nivoa ekspresije *NCED1* gena. Povećanu ekspresiju *NCED1* gena u korenu paradajza kod biljaka koje su bile izložene stresu suše kao i kod biljaka koje su bile podvrgnute vodnom deficitu u prisustvu *T. brevicompactum* detektovali su Racić i sar. (2018). U rezultatima iz ove disertacije postoji trend povećane ekspresija *NCED1* gena u svim tretmanima. Sadržaj sinapinske kiseline koja je uključena u regulaciju ABA očekivano je u korelaciji sa sadržajem ABA u listu paradajza. Sadržaj ABA statistički značajno povišen u listu kod optimalno zalivanih biljaka u prisustvu *T. harzianum*, zatim kod biljaka izloženih suši, kao i kod biljaka podvrgnutih vodnom deficitu u prisustvu *T. brevicompactum*.

Signalni putevi JA i SA kod biljaka se aktiviraju u suši, kao i tokom uspostavljanja ednofitne asocijacije sa mikroorganizmima (Ilyas i sar., 2021; Sood i sar., 2020). Povećanje koncentracije SA i JA povezuje se i sa povećanom otpornošću biljaka na bolesti i indukcijom sistemske stečene otpornosti, pri čemu SA utiče na povećane ekspresije PR gena.

Istraživanja pokazuju da *T. atroviride* P1 i *T. harzianum* T22 u listu paradajza indukuju povećanu ekspresiju *PINII* gena, koji je uključen u signalni put JA kiseline, kao i *PR1b1* gena, koji je uključen u signalni put salicilne kiseline (Tucci i sar., 2011). Aktivacija ekspresije *PINII* gena takođe može da bude izazvana prilikom mehaničkih povreda biljaka i prilikom napada patogena. Istraživanja Risoli i sar. (2022) pokazuju da prilikom napada od strane patogena *Botrytis cinerea* biljke paradajza u interakciji sa gljivama roda *Trichoderma* imaju povećanu ekspresija *PINII* gena, dok je ekspresija *PR1b1* gena nepromenjena. Kod optimalno zalivanih biljaka i kod biljaka izloženih suši u korenu paradajza povećano je ekspresiran *PINII* gen u tretmanu sa *T. brevicompactum* (Racić i sar., 2018). Isti autori su zabeležili da *T. brevicompactum* povećava nivo ekspresije *PR1b1* gena u listu paradajza. Rezultati iz ove disertacije pokazuju da je suša uticala na povećanje ekspresije *PINII* gena u listu paradajza, dok je još izraženija stimulacija ispitivanog gena registrovana kod svih biljaka tretiranih sa *T. brevicompactum*. Povećana ekspresija *PINII* gena ukazuje na povišenu sintezu JA. Povećano

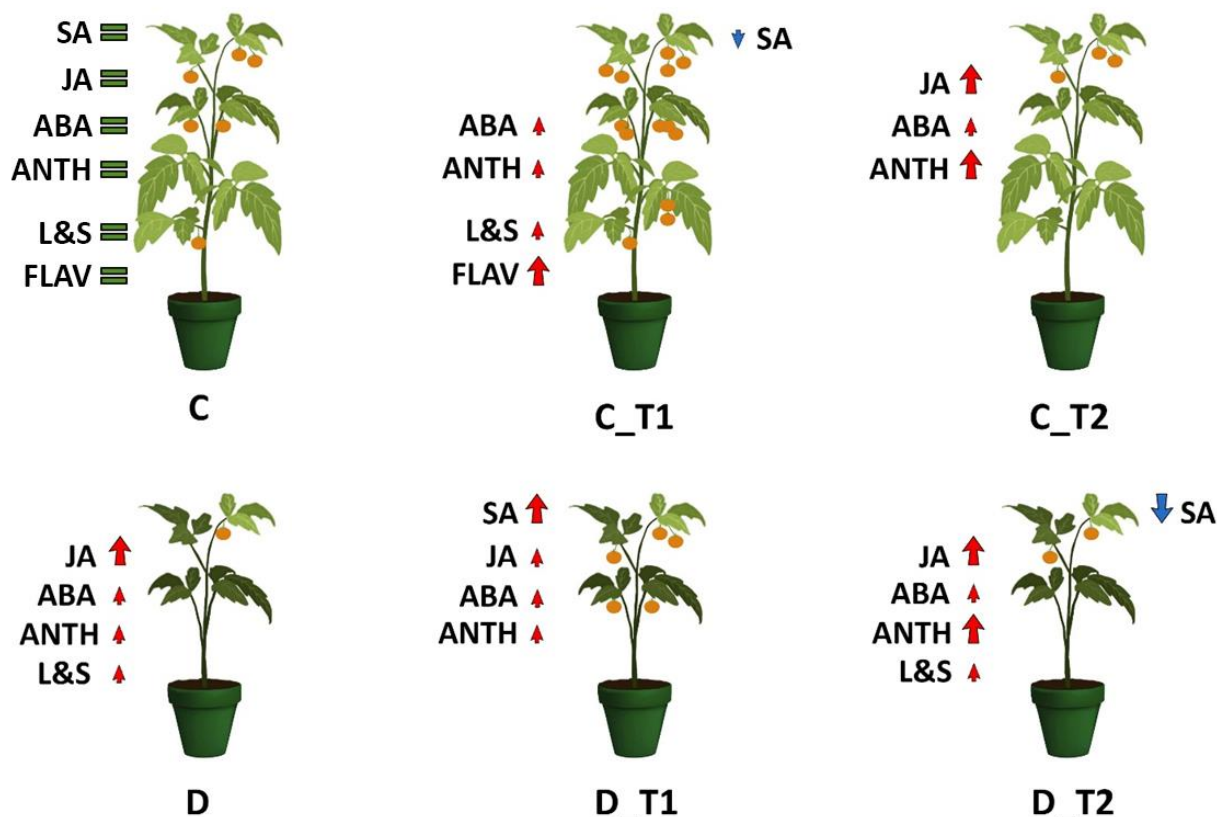
ekspresiran *PR1b1* gen detektovan je kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu u prisustvu *T. harzianum*. Povećana ekspresija *PR1b1* gena upućuje na povišenu ekspresiju SA. Autori Ilyas i sar. (2021) objašnjavaju da JA reguliše između ostalog i progresivnu akumulaciju ABA kod biljaka izloženih stresu suše. U rezultatima iz ove disertacije marker gen ABA *NCED1* povišen u svim tretmanima dok je marker gen JA *PINII* je povišen u svim tretmanima osim kod optimalno zalivanih biljaka u prisustvu *T. harzianum* (Slika 51). Povećani sadržaj JA i ABA u listu paradajza ukazuje na međuzavisnost datih signalnih puteva.

SIJAF13 gen kodira bHLH (*engl.* basic helix-loop-helix) transkripcioni faktor koji ima važnu funkciju u sekundarnom metabolizmu antocijana i odgovoru biljaka na stres (Waseem i sar., 2019). Put sinteze antocijana predstavlja produžetak opšteg flavonoidnog puta. Povećana ekspresija transkripcionog faktora bHLH kod paradajza stimuliše njegovu otpornost na sušu preko niza fizioloških promena koje uključuju povećanje sadržaja flavonoida i ABA (Waseem i sar., 2019). Gljive roda *Trichoderma* kod biljaka mogu da aktiviraju transkripcioni faktora bHLH što dovodi do povećanja otpornosti na stres (Ji i sar., 2021). Pokazano je da isparljiva jedinjenja *T. asperellum* T-34 i *T. harzianum* T-78 utiču na povećanje ekspresije bHLH transkripcionog faktora u korenu biljaka paradajza i arabidopsisa koji su rasli na podlogama sa limitiranim sadržajem gvožđa (Martínez-Medina i sar., 2017). Na osnovu rezultata iz ove disertacije utvrđeno je da *T. brevicompactum* utiče na povećanje nivoa ekspresije *SIJAF13* gena kod optimalno zalivanih biljaka i kod biljaka koje su podvrgnute suši, što je u skladu sa povišenim sadržajem antocijana (Slika 51). Povišene ekspresije *SIJAF13* gena u tretmanima sa *T. brevicompactum* su u korelaciji sa povišenom ekspresijom marker gena JA *PINII*, što je u saglasnosti sa rezultatima Coppola i sar. (2019) koji su pokazali da kod biljaka paradajza gljive roda *Trichoderma* mogu da utiču na povećanje ekspresije bHLH transkripcionog faktora, koja je povezana sa signalizacijom JA.

Lignin i suberin su složeni polimeri i važne su strukturne komponente ćelijskog zida biljaka. Njihova sinteza kod biljaka paradajza je regulisana od strane *TPX1* gena (Quiroga i sar., 2000) i *C3H* gena (Aseel i sar., 2019). Pored mehaničkog očvršćavanja, lignin ima ulogu da vaskularnom tkivu omogući efikasan transport nutrijenata i vode, dok suberin služi kao fizička barijera i sprečava gubitak vode iz tkiva. Zajedno lignin i suberin pružaju zaštitu biljkama od patogena sprečavajući penetraciju lignocelulolitičkih enzima kroz ćelijski zid. Postoje studije koje pokazuju da lignifikacija kod biljaka povećava otpornost na sušu (Zhao i sar., 2021). Stres izazvan vodnim deficitom kod biljaka ograničava fiksaciju CO₂ što dovodi do formiranja ROS (H₂O₂), koji se u peroksizomima uklanjaju posredstvom katalaza koje su kodirane od strane *TPX1* gena (Zhao i sar., 202; Yan i sar., 2021). Pokazano je da se gen *TPX1* povećano ekspresira u korenu paradajza nakon tretmana sa *T. harzianum* (Yan i sar., 2021). Ekspresija *TPX1* gena u rezultatima iz ove disertacije je povišena kod biljaka izloženih suši, kao i kod optimalno zalivanih biljaka koje su tretirane sa *T. harzianum*, dok je *T. brevicompactum* stimulisala ekspresiju *TPX1* gena kod biljaka izloženih suši. Put biosinteze 5-O-kafeoil - hinske kiseline (hlorogenske kiseline) je regulisana od strane *C3H* gena (Paupière i sar., 2020). Ekspresija *C3H* gena u listu paradajza se povećava prilikom aplikacije abuskularnih mikoriznih gljiva, takođe prilikom napada patogena, a najviša ekspresiju je zabeležena u kombinovanom tretmanu (Aseel i sar., 2019). Hlorogenska kiselina je po hemijskoj strukturi estar kafene i hinske kiseline (Naranjo Pinta i sar. 2018). Prekursor je ferulne kiseline koja predstavlja značajn gradivni element lignina. Hlorogenska kiselina pored antioksidativne uloge ima i ulogu zaštite biljaka od patogena, UV zračenja i herbivora (Aseel i sar., 2019). Povišene ekspresije *C3H* gena u rezultatima iz ove disertacije su zabeležene u istim tretmanima kao i kod *TPX1* gena, što je u saglasnosti sa višim sadržajem ferulne kiseline u navedenim tretmanima i ukazuje na povećanu biosintezu lignina (Slika 51).

FLS gen kodira flavonol-sintazu, enzim koji katalizuje prevođenje dihidroflavonola u flavonole, koji su podklasa flavonoida. Ovaj enzim je ključan u sintezi flavonola i ujedno reguliše njihov ukupan sadržaj u biljkama (Schilbert i sar., 2021). Ekspresija *FLS* gena uglavnom se javlja kao odgovor biljaka na oksidativni stres, štetno UV zračenje i tokom procesa signalizacije sa mikroorganizmima. Međutim, nema literaturnih podataka o uticaju gljiva roda *Trichoderma* na ekspresiju *FLS* gena

prilikom interakcije sa biljkama. U rezultatima iz ove disertacije povećano ekspimiranje *FLS* gena je detektovano kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. harzianum*, gde je detektovan i najviši sadržaj ABA u listovima paradajza (Slika 51). Mou i sar. (2015) objašnjavaju da ABA može da utiče na povećanje nivoa ekspresije gena koji su uključeni u biosintezu flavonoida.



Slika 51. Šematski prikaz regulacije genske aktivnosti i sekundarnih metabolita paradajza pri različitim tretmanima: biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2). Mereni parametri: signalni put salicilne kiseline (SA), signalni put jasmonske kiseline (JA), apscisinska kiselina (ABA), antocijani (ANTH), lignin i suberin (L&S), epidermalni flavonoli (FLAV).

Veličinom crvenih strelica predstavljen je stepen stimulacije, dok je veličinom plavih strelica predstavljen stepen inhibicije ispitivanih parametara u odnosu na kontrolu koja je obeležena zelenim znakom jednakosti.

Fenolna jedinjenja su sekundarni metaboliti biljaka, koji imaju značajnu multifunkcionalnu ulogu prilikom odgovora biljaka na abiotički i biotički stres. Biljke mogu da ih koriste kao antimikrobne supstance ili kao signalne molekule prilikom simbioze sa mikroorganizmima. Hasanagić i sar. (2020) su zabeležili da se nakon 28 dana od prestanka zalivanja biljaka kao odgovor na stres u listu paradajza povećava sadržaj p-OH-benzoeve kiseline, ferulne kiseline i kafene kiseline, dok je sadržaj kvercetina i rutina ostao neizmenjen. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima iz ove doktorske disertacije. Małolepsza i sar. su 2017. godine objavili su da *T. virens* povećava nivo fenolnih jedinjenja u listu paradajza, što pozitivno utiče na smanjenje stope infekcija za *Rhizoctonia solani*. Spomenuti autori su zabeležili da *T. virens* utiče na povećanje sadržaja kafene kiseline, ferulne kiseline, siriginske kiseline, luteolina i kvercetina. U rezultatima iz ove disertacije zabeleženo je da *T. harzianum* i/ili *T. brevicompactum* takođe dovode do povećanja navedenih fenolnih jedinjenja u listu paradajza. *T. virens* u istraživanjima Małolepsza i sar. (2017) nije statistički

značajno uticala na sadržaj kvercetina (kvercetin-3-O-glukozid), što je takođe slučaj i sa rezultatima iz ove teze, gde su primenjene *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. Za razliku od spomenutih autora koju su zabeležili da *T. virens* stimuliše sadržaj hlorogenske kiseline i rutina (kvercetin-3-O-rutinozid), rezultati ove teze pokazuju da *T. harzianum* i *T. brevicompactum* nisu imale statistički značajan uticaj na sadržaj spomenutih fenolnih jedinjenja. Do sličnih rezultata došli su Nawrocka i sar., 2017. godine kada su objavili da *T. atroviride* TRS25 utiče na povećanje sadržaja kafene kiseline, ferulne kiseline, hlorogenske kiseline, siriginske kiseline i luteolina u listu paradajza, dok je sadržaj kemferola, kvercetina i rutina ostao neizmenjen.

U rezultatima iz ove doktorske disertacije povišen sadržaj p-OH-benzoeve kiseline, ferulne, siriginske, sinapinske, kafene i apscisinske kiseline u listovima paradajza detektovan je kod optimalno zalivanih biljaka u tretmanu sa *T. harzianum*, kod biljaka podvrgnutih suši kao i kod biljaka izloženih vodnom deficitu u prisustvu *T. brevicompactum*. p-OH-benzoeva kiselina (4-hidroksibenzoeva kiselina) je bitan strukturni element biljnih hormona, kofaktora, atraktanata za oprašivače koja se još ističe sa antimikrobnom i antioksidativnom aktivnošću (Kang i sar., 2020), dok ujedno može da bude i produkt metabolizma gljiva roda *Trichoderma* (Adnan i sar., 2017). Ferulna kiselina je važna strukturna komponenta ćelijskog zida biljaka koja utiče na njihov rast. Takođe, smatra se neenzimskim antioksidansom koji eliminiše slobodne radikale i čija sinteza se obavlja u biljkama kada su izložene stresu (Engwa 2018). Istraživanja o egzogenoj primeni ferulne kiseline na biljkama pokazuju da ona deluje kao važan regulator rasta i da podstiče otpornost biljaka na stres preko procesa zatvaranja stoma, deobe ćelija, promene permabilnosti membrana, kao i kroz druge metaboličke procese (Cheng i sar., 2018). Ferulna kiselina kao i siriginska kiselina doprinosi strukturnom integritetu lignina (Adams i sar., 2020) i inhibiciji klijanja spora i rastu hifa patogenih gljiva (Małolepsza i sar. 2017). Pored navedenih uloga siriginska kiselina štiti biljke od oksidativnog stresa. Akumulacija sinapinske kiseline i njenih derivata varira u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine jer oni određuju fiziološko stanje biljke. Na osnovu koncentracije sinapinske kiseline i njenih derivata moguće je pratiti efekat faktora spoljašnje sredine na rast i razvoj biljaka (Nguyen i sar., 2021). Isti autori su objavili da sinapinska kiselina i njeni estri imaju antimikrobnu funkciju, dok se smatra da imaju ulogu i u zaštiti od UV zračenja. Kafena kiselina je aktivno uključena u fiziološke procese biljaka i mehanizme tolerancije na stres. Kao što je prethodno rečeno kafena kiselina je učestvuje u biosintezi lignina, koji štiti biljke od abiotičkog i biotičkog stresa. Poznata je i kao antioksidans koji učestvuje u uklanjanju ROS formi (Mehmood i sar., 2021). Ova kiselina pozitivno utiče na turgorov potencijal i širenje biljnih ćelija kada su biljke izložene stresu suše (Zafar-ul-Hye i sar., 2021). Pod uticajem suše kafena kiselina se pretvara u ferulnu kiselinu i iz tog razloga je sadržaj kafene i ferulne kiseline povišen u listovima biljaka (Zafar-ul-Hye i sar., 2021), što pokazuju i rezultati iz ove doktorske disertacije. Spomenuti antioksidansi se vezuju za ćelijski zid lista čime biljke štite fotosintetički aparat od visokoenergetskog zračenja, koje se potom apsorbuje u ćelije mezofila. Takođe kafena kiselina i njeni derivati dovode do poboljšanja fiksacije azota, sadržaja ugljenih hidrata i proteina u nodulu korena, naročito kada su biljke izložene stresu suše (Zafar-ul-Hye i sar., 2021).

Dobijeni rezultati i iz ove doktorske disertacije pokazuju da je koncentracija luteolin-7-O-glukozid povećana u listu paradajza kod optimalno zalivanih biljaka u prisustvu *T. harzianum*, dok su *T. harzianum* i *T. brevicompactum* stimulisale sadržaj luteolin-7-O-glukozid kod biljaka izloženih suši. Osnovna biološka uloga luteolin-7-O-glukozid u listu je da uklanja ROS koje nastaju prilikom štetnog UV zračenja. Dihidroksi B prsten luteolin-7-O-glukozid ima antioksidativna svojstva i nizak nivo apsorpcije UV zraka (Mierziak i sar., 2014). Prilikom kontakta sa patogenim mikroorganizmima B prsten flavonoida može da se ugradi i formira vodonične veze sa nukleinskim kiselinama što dovodi do inhibicije sinteze DNK i RNK mikroorganizama (Nawrocka i sar., 2017). Luteolin-7-O-glukozid može da se oslobodi u zoni korenske kape i da deluje kao specifičan signal za započinjanje simbioze sa zemljišnim mikroorganizmima (Mierziak i sar., 2014).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je sadržaj hinske, 5-O-kafeoil-hinska kiseline (hlorogenska kiselina) i kemferol-3-O-glukozida inhibiran kod biljaka izloženih suši, zatim kod

optimalno zalivanih biljaka u prisustvu *T. Harzianum*, kao i kod biljaka podvrgnutih suši u prisustvu *T. brevicompactum*. Hidrolizom 5-O-kafeoil-hinska kiselina (hlorogenske kiselina) nastaje hinska i kafena kiselina koje se zatim razgrađuju u različita isparljiva jedinjenja poput furana, cikloheksana i aromatičnih jedinjenja (Shibamoto 2015). Biološka funkcija polifenola 5-O-kafeoil-hinska kiselina (hlorogenske kiselina) i hinske kiseline je da štite biljna tkiva od mehaničkih oštećenja, koja su prouzrokovana od strane insekata. Prilikom kontakta oštećenog tkiva sa polifenol oksidazom dolazi do formiranja toksičnih hinona (Wilfred i Nicholson 2006). Prilikom akumulacije fenola u konjugovanom obliku pored hinona može da se oformi i veliki broj fenilpropanoidnih jedinica, koje se putem oksidaza i peroksidaza brzo pretvaraju u toksične tanine, cinamil alkohol i lignine čineći biljne ćelije otpornije na patogene gljive (Małolepsza i sar. 2017). Postoje istraživanja koja pokazuju da hlorogenska kiselina ispoljava antifungalna svojstva (Ma i Ma 2015) kao i da se sadržaj hinske kiseline u uslovima vodnog stresa smanjuje u listovima biljaka (Qu i sar., 2019). Kemferol-3-O-glukozid nastaje od dihidroflavonola delovanjem flavonol sintaze (*FLS*) i ima pozitivan efekat u rizosferi na rast hifa i klijanje spora mikoriznih gljiva (Mierziak i sar., 2014). Međutim, nema literaturnih podataka o uticaju kemferol-3-O-glukozida, koji se nalazi u listu biljaka, na procese interakcije sa mikroorganizmima. Nakabayashi i sar. (2014) su istraživali promene akumulacije flavonoida kod *Arabidopsis thaliana* koje su bile izložene dejstvu suše i došli su do zaključka da saržaj kemferola može da bude inhibiran u uslovima vodnog stresa. Međutim isti naučnici navode da mehanizam signalizacije flavonoida ili pojedinačna uloga svakog molekula u ublažavanju od stresa suše još uvek nije razjašnjena.

Rezultati iz ove doktorske disertacije pokazuju da tolerantnost biljaka paradajza na sušu kao i signalizacija interakcije sa gljivama roda *Trichoderma* su u značajnoj korelaciji sa fenilpropanoidnim putem. Navedeni rezultati ukazuju na međuzavisnost i kompleksnost signalnih puteva i sekundarnih metabolita koji učestvuju u odgovoru biljka na stres suše, kao i na interakciju sa gljivama roda *Trichoderma*.

5.2.1.3. Zemljište

Zemljište predstavlja izuzetno heterogenu sredinu, a diverzitet bioloških zajednica u njemu je od ključnog značaja za održavanje života na našoj planeti. Raznovrsne mikrobne populacije čine manje od 0.5% (w/w) od ukupne mase zemljišta, ali to ne umanjuje njihov veliki značaj u procesima transformacije organske materije, održavanju strukture zemljišta, degradaciji organskih zagađivača, biološke kontrole i nastanka biljnih asimilata (Yan i sar., 2015). Za bolje upoznavanje diverziteta zemljišnih mikroorganizama pored klasičnih (direktnih i indirektnih) metoda, primenjuju se i savremene molekularne metode (Chodak i sar., 2015). Velika raznolikost mikrobni populacija u zemljištu je uglavnom neistražena i nedovoljno proučena, a jedan od razloga je i nedostatak primenjenih metoda. Procenjuje se da je od 99 do 99.9 % bakterijskih populacija veoma teško gaji na hranljivim podlogama ili uopšte i ne mogu da se gaje (Torsvik i Ovreas, 2002). Povod izostanka rasta mikrobni populacija je: usporen rast, specifični nutritivni zahtevi, lučenje antibakterijskih supstanci u medijumu i odsustvo sposobnosti rasta bakterija u monokulturi usled izostanka signalnih molekula, koje oslobađaju bakterijske populacije zastupljene samo u sklopu svog prirodnog biotopa (Vartoukian i sar., 2010). Takođe, izolovani mikroorganizmi su retko brojčano dominantniji u prirodnim sredinama u odnosu na rast na nutritivno-bogatim hranljivim podlogama. Na aktivnost mikroorganizama u zemljištu i njihovu zastupljenost utiču brojni faktora kao što su: tip zemljišta, prisustvo organskih zagađivača, pesticida, mineralnih đubriva i teških metala, ali i izlaganje različitim vrstama stresa (Hoffman i sar., 2006).

Gljive iz roda *Trichoderma* odlikuje brza sposobnost rasta i razmnožavanja, brzo usvajanje hranljivih materija iz zemljišta, kao i lučenje enzima koji razgrađuju ćelijski zid drugih mikroorganizama, poput celulaze, ksilanaze i glukanaze (Azimova i sar., 2020). Zahvaljujući ovim enzimima lako apsorbuju hranljive materije iz zemljišta i iz zemljišnih mikroorganizama, čime ujedno i modifikuju mikrobiološku zajednicu zemljišta (Halifu i sar., 2019). Poznate su kao fakultativni mikroorganizmi i dobri antagonisti biljnih patogena (do Nascimento i sar., 2017). Mikrobiološke analize zemljišta

pokazuju da inokulacija *Trichoderma* spp. ima značajan uticaj na zajednicu mikroorganizama u rizosferi (Zhang i sar., 2018). Rezultati iz ove disertacije pokazuju da brojnost amonifikatora, sporogenih bakterija i ukupnog broja bakterija u rizosferi nakon I žetve nije zavisila od režima zalivanja. Međutim vodni deficit je imao značajne efekte na broj mikroorganizama u zemljištu, ali je bilo potrebno vreme da se oni i ispolje. Navedeni efekti suše su registrovani nakon II žetve. Autori koji su primetili da suša ne utiče na brojnost bakterija to povezuju sa više faktora, kao što su sam kontekst suše, tipa zemljišta, vrste bakterija koje su prisutne u zemljištu kao i sa genotipom biljne vrste (Na i sar., 2019; Tóth i sar., 2017). Kod optimalno zalivanih biljaka nakon I žetve značajne razlike zabeležene su u tretmanu sa *T. brevicompactum*, koja je udvostručila brojnost amonifikatora. Isti trend primećen je i u tretmanu sa *T. harzianum*, ali bez statistički značajnih razlika. Navedeno povećanje brojnosti amonifikatora je očekivano, s obzirom na činjenicu da u procesu amonifikacije učestvuju različite mikrobne populacije uključujući i gljive roda *Trichoderma*. Sve ostale značajne razlike primećene su u tretmanu suše. Tretman sa *T. brevicompactum* je inhibitorno delovao na ukupan broj bakterija, koji se smanjio sedam puta. *T. harzianum* je redukovala broj gljiva u zemljištu tri puta, a *T. brevicompactum* jedanaest puta. Sposobnost gljiva roda *Trichoderma* da inhibiraju rast bakterija zabeležena je u brojnim radovima (Ros i sar., 2020; Konappa i sar., 2020). Konkretno, vezano za paradajz, svakako je najvažnija inhibicija bakterije *Ralstonia solanacearum*, jer je ova bakterija jedna od najčešćih koje podstiču uvenuće paradajza (Konappa i sar., 2020). Nakon II žetve, zabeležen je porast svih ispitivanih grupa mikroorganizama u odnosu na I žetvu. U ovom ispitivanom vremenskom intervalu efekti suše su bili mnogo izraženiji i imali su veći uticaj na brojnost mikroorganizama od tretmana sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum*. Broj amonifikatora, sporogenih bakterija i ukupni broj bakterija u kontroli bio je veći za oko 90 % u odnosu na tretman suše, dok je broj gljiva bio veći za 72 %. Nakon II žetve u tretmanima sa *T. harzianum* i *T. brevicompactum* značajno je smanjen broj amonifikatora kod optimalno zalivanih biljaka za oko 65 %, kao i ukupan broj bakterija za oko 75 %.

5.2.2. Kvalitet plodova

Poznato je da odabrane vrste gljiva roda *Trichoderma* pospešuju rast i razvoj biljaka, da povećavaju unos hranljivih materija, što utiče i na kvantitet prinosa (Pascale i sar., 2017). Efikasnost kolonizacije korena od strane ovih simbiotskih gljiva zavisi od izlučenih molekulskih efektora. Do sada je analizirano oko dvadeset proteina efektor gljiva roda *Trichoderma* koji su svrstani u tri familije: cerato platanini, hidrofobini i glikozid hidrolaze (Ramírez-Valdespino et al., 2019). Prve dve grupe najviše su ispitane na vrstama gljiva *T. harzianum*, dok je jedan od cerato platanina koji povećava efikasnost kolonizacije korena biljaka kod ovih gljiva protein svolenin (Brotaman i sar., 2013). Izolat korišćen u ogledu, koji je sproveden u plasteniku u organskim uslovima gajenja, je *T. harzianum* SMZC 22660. Korišćeni izolat se odlikuje visokim aktivnostima enzima N-acetil- β -glukozaminidaza, alkalne fosfataze i naftol-AS-BI-fosfohidrolaze. Alkalna fosfataza ima važnu ulogu u solubilizaciji vezanih fosfata, čineći ih na taj način dostupnim biljkama (Kapri i sar., 2010), dok je metabolički produkt izolovan iz *T. harzianum* N-acetil- β -glukozaminidaza našao primenu kao glavna komponenta sredstava za zaštitu biljaka (Harman i sar., 1995). Spomenuta tri enzima se smatraju važnima u biokontroli patogena nastanjenih u zemljištu jer imaju sposobnost razgradnje ćelijskog zida drugih gljiva (Harman i sar., 2004).

Gljive iz roda *Trichoderma* pospešuju unos hranljivih materija izlučivanjem organskih kiselina koje rastvaraju minerale, što dovodi do bolje pristupačnosti i usvajanja hranljivih materija iz zemljišta. U isto vreme, zbog izrazite sposobnosti kolonizacije, gljive roda *Trichoderma* proširuju kontaktnu površinu između rizosfere i zemljišta, luče vanćelijske enzime (saharazu, ureazu i fosfatazu), kao i organske kiseline u rizosferi i obezbeđuju brz i efikasan transfer nutrijenata (Pelagio i sar., 2017). Otkriveno je da u zemljištu u kojem je izvršena inokulacija gljiva *Trichoderma* dolazi do povećanog

sadržaja hranljivih materija i biomase mikroorganizama i na taj način *Trichoderma* doprinosi kvalitetu i plodnosti zemljišta (Wagner i sar., 2016).

Tucci i sar. (2012) su istraživali uticaj gljiva iz roda *Trichoderma* spp. na biljke paradajza i uočili su pozitivne efekte na većinu ispitivanih genotipova u pogledu povećanja sveže i suve mase korena, suve mase izdanaka i visine stabljika paradajza. Međutim, primetili su da tretmani sa vrstama *Trichoderma* nisu uvek imali pozitivne efekte, čak su u pojedinim slučajevima za jedan genotip paradajza bili i štetni. Ovo ukazuje da stimulacija rasta paradajza u velikoj meri zavisi i od njegovog genotipa. Rezultati ove doktorske disertacije, sprovedeni na dve sorte paradajza uzgajane u plasteniku govore da nije bilo statistički značajnih razlika u ispitivanim parametrima rasta između sorti, kao ni između kontrole i tretmana sa *T. harzianum*. U slučaju kada su primetni stimulatívni efekti *T. harzianum*, to je najverovatnije posledica poboljšanog usvajanja nutrijenata, što može biti direktno povezano sa stimulacijom rasta biljaka (Yedidia i sar., 2001). Utvrđeno je da *T. harzianum* olakšava unos P i Fe što dovodi do povećanja suve mase biljaka, dužine izdanka i površine listova (Owen i sar., 2015).

Nedestruktivna merenja indeksa hlorofila, epidermalnih flavonola, antocijana i indeks balansa azota važni su fiziološki parametri, koji mogu da ukažu na eventualni stres, ukoliko je biljka njemu izložena. Poznato je da su sadržaj hlorofila i epidermalnih flavonola u lišću biljaka važan pokazatelj statusa azota biljke. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je paradajz gruzanski zlatni imao statistički značajno niži sadržaj hlorofila i veći sadržaj epidermalnih flavonola u prisustvu *T. harzianum* što je u korelaciji sa smanjenjem sadržaja indeksa balansa azota. Yu i sar. (2021) su primetili da kod biljaka nakon inokulacije *T. asperellum* TaspHu1 dolazi do smanjenja sadržaja hlorofila. Primećeno je da slične efekte izazivaju *T. pseudoharzianum* T1 i *T. afroharzianum* T52 što je povezano sa snižavanjem regulacije gena za sintezu hlorofila kod najmlađih listova biljaka (Liu i sar., 2020). Postoje istraživanja u kojima nije pronađeno značajno povećanje hlorofila a i hlorofila b u listovima paradajza tretiranih različitim sojevima *Trichoderma* (Alexandru i sar., 2013). Međutim, postoje i objavljeni radovi u kojima je primećen povećan sadržaj fotosintetičkih pigmenta i fotosintetičke sposobnosti biljaka koje su rasle u prisustvu gljiva roda *Trichoderma* (Harman i sar., 2021).

U rezultatima iz ove disertacije *T. harzianum* je značajno uticala na povećanje epidermalnih flavonola kod paradajza gruzanski zlatni, ali je kod paradajza narvik imala suprotan efekat. Hassan i Mathesius (2012) su dokazali da flavonoidi mogu biti indukovani simbiotima. Takođe, sugerišu da su flavonoidi koji se nalaze u korenu biljaka uključeni u regulaciju privremenog odbrambenog odgovora, koji je izazvan simbiotskom kolonizacijom korena. Nakon folijarne primene gljiva roda *Trichoderma*, Sesan i sar. (2020) su primetili porast ukupnih flavonoida i ukupnih polifenola u listovima, čiji sadržaj je bio veći od sedam, pa čak do šezdeset dana nakon aplikacije. Mayo-Prieto i sar. (2019) su identifikovali šest flavonoida, čiji sadržaj je značajno povećan, kod biljaka pasulja u prisustvu gljiva iz roda *Trichoderma* uz značajnu stimulaciju rasta biljaka. Detaljna analiza metaboloma i transkriptoma pokazala je da kolonizacija *T. harzianum* značajno utiče i preuređuje fenilpropanoidni put biljaka paradajza (Coppola i sar., 2019). Rezultati iz ove teze pokazuju da kod sorte paradajza gruzanski zlatni dolazi do smanjenja indeksa balansa azota u tretmanu sa *T. harzianum*. Ovo ukazuje na aktivaciju sekundarnog metabolizma na osnovu čega se može očekivati bolja otpornost biljaka na bolesti i napade insekata, što je u skladu sa novijim rezultatima drugih autora (Maio-Prieto i sar., 2019).

Fenolna jedinjenja su veoma značajni prirodni antioksidansi u plodu paradajza, među kojima flavonoidi u velikoj meri doprinose njegovom kvalitetu (Bhandri et al., 2016). Porast ukupnog sadržaja flavonoida u plodu paradajza sorte gruzanski zlatni ustanovljen je u tretmanu sa *T. harzianum*. Ovo potvrđuje prethodno zapažanje da smanjenje indeksa balansa azota u listovima biljaka paradajza, koje su tretirane gljivom *Trichoderma* aktivira sekundarni metabolizam. Neki autori su primetili i porast ukupnog sadržaja fenola u plodu paradajza (Singh i sar., 2013), grožđa (Pascale i sar., 2017), luka (Ortega-Garcia i sar., 2015) i krastavca (Navrocka i sar., 2018), što u ovoj

tezi nije bio slučaj. Bhandri i sar. (2016) su objavili da varijacije u sadržaju polifenola i flavonoida u plodovima paradajza zavise od genotipa i uslova spoljašnje sredine u kojima su biljke rasle. Navedenim se može objasniti i različiti odgovor dve sorte paradajza na prisustvo *T. harzianum*. Ovo je takođe u saglasnosti sa rezultatima Ortega-Garcia i sar. (2015) koji su dokazali da su ispitivani genotipovi luka drugačije reagovali na inokulaciju *T. asperellum* i T22, pri tome ne pokazujući značajne razlike kod jednog genotipa, dok je kod drugog genotipa luka došlo do značajnog porasta sadržaja flavonoida.

Sazrevanje plodova paradajza povezano je sa akumulacijom šećera. Brojna istraživanja pokazuju da sadržaj ugljenih hidrata u plodovima paradajza varira u zavisnosti od genotipa kao i od uslova spoljašnje sredine koji deluju na biljku. Gajeni paradajz karakteriše visok sadržaj saharoze i heksoze, dok divlje vrste paradajza akumuliraju saharozu, koja ima centralnu ulogu u razvoju plodova (Kanayama 2017). Sinteza skroba, tokom formiranja zrelog crvenog ploda, praćena je obično, povećanim sadržajem šećera heksoza. U zavisnosti od primenjenih tretmana na biljkama paradajza, sadržaj rastvorljivih šećera može da se smanji usled smanjenja sadržaja skroba, koji se javlja tokom zrenja (Centeno et al., 2011). Određivanje sadržaja šećera je važno za komercijalno tržište, jer je direktno povezano sa ukusom i slatkoćom paradajza (Matsukura, 2019). Nema literaturnih podataka koji pokazuju uticaj gljiva iz roda *Trichoderma* na sadržaj skroba i rastvorljivih šećera u plodu paradajza. Na osnovu rezultata iz ovog rada primećuje se da sorta gružanski zlatni sadrži znatno više rastvorljivih šećera u odnosu na narvik. Sadržaj rastvorljivih šećera kod ispitivanih sorti paradajza u prisustvu *T. harzianum* nije se značajno promenio. Štaviše, rezultati pokazuju da je prisustvo *T. harzianum* smanjilo sadržaj skroba kod sorte gružanski zlatni.

Rodriguez-Iruretagoiena i sar. (2015) su ispitali koncentraciju različitih elemenata u zemljištu i plodu paradajza gajenog na trinaest različitih lokacija. Rezultati ove teze, koji se odnose na koncentracije mikronutrijenata i teških metala u zemljištu i plodu paradajza, kao i indeksi bioakumulacije u saglasnosti su sa radom Rodriguez-Iruretagoiena i sar. (2015). Iako su indeksi bioakumulacije ispitivanih elementa bili slični kod dve sorte paradajza u kontrolnim uslovima, oni su različito reagovali na tretman sa *T. harzianum*. Paradajz gružanski zlatni je imao do dva puta veći indeks bioakumulacije za Fe i Cr u tretmanu sa *T. harzianum* u odnosu na kontrolu. Literaturni podaci o efektu gljiva iz roda *Trichoderma* na unos hranljivih materija biljaka nisu u saglasnosti. Khan i sar. (2017) objavili su da su koncentracije Cu, Fe, Mn i Zn značajno porasle u korenu, izdancima i plodovima biljaka paradajza nakon inokulacije *T. harzianum*, što može da se poveže sa sposobnošću gljive da povećavaju rastvorljivost spomenutih mikroelemenata u zemljištu, što su i dokazali Kayaet i sar., (2009). Značajan porast koncentracije pomenutih elemenata u korenu krastavca tretiranih sa *T. harzianum* utvrdili su i Yedidia i sar. (2001). Ovo se može povezati sa uticajem *T. harzianum* koja olakšava biljkama unos hranljivih materija (Singh i sar., 2014), kao što je i prikazano za P i Fe kod biljaka krastavaca tretiranih sa *T. asperellum* (Yedidia et al., 2001). Suprotno prethodno spomenutim istraživanjima, smanjene akumulacije Fe u lišću biljaka paradajza uzgajanih u prisustvu *T. harzianum* T34 primetili su Borrero i sar. (2011). Smanjene koncentracije Cu, Mn i Zn kod biljaka pšenice nakon aplikacije *T. asperellum* zabeležili su de Santiago i sar. (2011). Oba autora sugerišu da je smanjene koncentracije spomenutih elementa, kod biljaka, posledica kompeticije između biljke i gljive. Studija sprovedena na biljkama paradajza gajenog hidroponično, sa specifičnim nedostatkom hranljivih sastojaka, pokazala je da efekat *T. harzianum* zavisi od koncentracije drugih elemenata. U slučaju nedostatka Fe ili Cu, efekat gljive je praćen povećanim unosom spomenutih elemenata. Međutim, u slučaju nedostatka Zn, efekat je suprotan i unos ovog elementa je smanjen, usled kompeticije, koja se javila između biljke i gljive (Li i sar., 2015).

Makroelementi (N, P, K) su uključeni u regulaciju ključnih fizioloških i biohemijskih procesa, uključujući deobu ćelija, aktivnost enzima i sintezu proteina (Ahanger i Ahmad, 2019). Sadržaj makroelementa P i K se nije značajno menjao između sorti paradajza, kao ni u tretmanu sa *T. harzianum*, međutim sadržaj N je bio oko dva puta veći kod sorte gružanski zlatni u odnosu na narvik, dok je *T. harzianum* značajno smanjila procenat N u plodovima paradajza gružanski zlatni u poređenju sa kontrolom. Veće koncentracije N mogu se povezati sa sporijim zrenjem i blagim

smanjenjem veličine plodova (Manoj i sar., 2013), što je bio slučaj kod sorte gružanski zlatni koja nije bila tretirana sa *T. harzianum*.

Smanjene indeksa bioakumulacije teških metala Ni i Pb, kod sorte gružanski zlatni, primećeno je u prisustvu *T. harzianum*. Kod sorte narvik, *T. harzianum* je značajno smanjila indeks bioakumulacije Pb. Istraživanja drugih naučnika govore o smanjenu akumulacije i translokaciji toksičnih elemenata u prisustvu gljiva roda *Trichoderma*. Smanjenu akumulaciju Cu kod biljaka luka u prisustvu *T. asperellum* u uslovima visokih toksičnih koncentracija Cu zabeležili su Tellez Vargas i sar. (2017). Rezultati iz ove teze su u saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Kacprzak i sar. (2014), koji govore o smanjenju indeksa bioakumulacije Pb kod biljaka paradajza u prisustvu gljiva iz roda *Trichoderma*. Kacprzak i sar. (2014) su primetili da je indeks bioakumulacije Pb smanjen kod svih ispitivanih biljnih vrsta *Miscanthus giganteus* L., *Salix* spp., *Phalaris arundinacea* L. i *Panicum virgatum* L. uzgajanih u prisustvu gljiva roda *Trichoderma*.

Analiza glavnih komponenata (PCA), često se koristi, kako bi se efikasno pronašle razlike između odnosa brojnih ispitivanih biljnih parametara. Ova metoda multivarijacione analize ima za cilj da objasni korelaciju između velikog broja varijabli u odnosu na mali broj osnovnih nezavisnih faktora (Beheshtizadeh et al. 2013). Sprovedena PCA analiza fizioloških parametara lista je potvrdila da u kontroli sorta narvik ima veći sadržaj epidermalnih flavonola i veći indeks balansa azota od sorte gružanski zlatni, što je posledica većeg indeksa hlorofila i nižeg sadržaja epidermalnih flavonola. Paradajz gružanski zlatni je na prisustvo *T. harzianum* reagovao smanjenjem indeksa hlorofila i povećanjem sadržaja flavonola. Kao posledica prethodno navedenog došlo je do smanjenja indeksa balansa azota. Sa druge strane *T. harzianum* je na sortu narvik delovala inhibitorno u pogledu sadržaja epidermalnih flavonola.

Na osnovu PCA analize utvrđene su osnovne razlike između ploda dve sorte paradajza. U kontroli sadržaj Ni, Fe, Zn i flavonoida bio je veći kod plodova paradajza narvik u odnosu na paradajz gružanski zlatni. Sa druge strane plodovi paradajza gružanski zlatni su imali i veći sadržaj N, Mn, ukupnih polifenola i rastvornih šećera. U tretmanu sa *T. harzianum* plodovi sorte narvik imali su veći sadržaj Fe i Cr dok je sadržaj Mn i ukupnih flavonoida bio značajno povećan kod sorte gružanski zlatni u odnosu na kontrolu.

Fizičko - hemijske karakteristike zemljišta su važan faktor prilikom procene pozitivnih efekata gljiva roda *Trichoderma* na rast, razvoj biljaka i unos hranljivih sastojaka. Kako su unos hranljivih sastojaka i interakcija *Trichoderma* - biljka zavisi od biljne vrste i genotipa, teško je predvideti njihov konačni odgovor. Da bi pozitivni efekti interakcije bili što veći, potrebno je pre same primene gljiva *Trichoderma* izvršiti karakterizaciju zemljišta.

Iako je *T. harzianum* jedan od najrasprostranjenijih i najviše korišćenih biopesticida ostaje nejasno kako pozitivni efekti ovih gljiva zavise od genotipa biljke (Tucci i sar., 2012). Isti autori sugerišu da je odgovor biljaka na prisustvo gljiva roda *Trichoderma* pod genskom kontrolom, što se može objasniti činjenicom da pojedini genotipovi paradajza imaju sposobnost da regulišu kolonizaciju korena od strane ovih gljiva. Različiti genotipovi paradajza na različite načine vrše percepciju efektorskih molekula koji su ključni za identifikaciju i kolonizaciju korena (Ramírez-Valdespino i sar., 2019). U ogledu iz ove doktorske disertacije bolja kolonizacija korena bila je povezana sa povećanom ekspresijom gena svolenina u korenu. Sorta paradajza koja je pokazala veću ekspresiju ovog gena bila je u većoj korelaciji sa pozitivnim efektima *T. harzianum*.

Na osnovu svih navedenih rezultata iz ove doktorske disertacije, u budućnosti, dalja istraživanja interakcije *Trichoderma* - biljka treba usmeriti ka procesima adaptacije biljaka na klimatske promene, koje su praćene sušom, poplavama, povišenim temperaturama i radijacijom, kao i pojavom novih fitopatogenih mikroorganizama. Očekuje se da bi primena gljiva roda *Trichoderma* bila efikasna u ublažavanju negativnih efekata abiotičkih i biotičkih stresova na biljke koji nastaju kao posledica klimatskih promena.

ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

Naučni doprinos ove doktorske disertacije odnosi se na rasvetljavanje mehanizama interakcije između gljiva roda *Trichoderma* i biljaka. U cilju razjašnjavanja molekularno - fizioloških pokazatelja pozitivnog odgovora biljaka na primenu ovih gljiva proučavani su brzi odgovori biljaka tokom interakcije i spori efekti koji nastaju tokom dužih vremenskih perioda delovanja gljiva na biljke paradajza. Brzi odgovori biljaka paradajza tokom 48 h od uspostavljanja kontakta sa gljivama roda *Trichoderma* na klijanje i procese u ranim fazama vegetativnog razvića biljaka su proučavani kako bi se bolje razumeli signalni mehanizmi. Dugoročni efekti gljiva su izučavani na nivou procesa fotosinteze, rasta biljaka, formiranja i kvaliteta plodova paradajza. Razjašnjavanju dugoročnih efekata na metabolizam biljaka najviše su doprineli rezultati genskih ekspresija i sadržaja sekundarnih metabolita.

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

1. U okviru brzih odgovora, proučavanje uticaja gljiva roda *Trichoderma* na klijanje semena sorti gruzanski zlatni i narvik, u *in vitro* uslovima, nakon 48 h na MS podlogama, pokazalo je da sve ispitivane gljive stimulišu klijanje semena paradajza, pre ostvarivanja fizičkog kontakta između gljive i semena.

1.1. Analizom FTIR spektara utvrđeno je da dolazi do promena u sadržaju ukupnih proteina i smanjenja sadržaja pektina i/ili ksiloglukana u radikulama semena paradajza.

2. Među ranim reakcijama biljaka sorte ailsa craig na prestanak zalivanja i interakciju sa *T. brevicompactum*, najosetljiviji parametri su sadržaj epidermalnih flavonola, provodljivost stoma, vodni potencijal lista i sadržaj ABA u korenu.

2.1. Utvrđeno je da epidermalni flavonoli i ABA učestvuju u signalizaciji interakcije. Biljke u interakciji sa *T. brevicompactum* u uslovima suše imaju bolje adaptivne karakteristike, odnosno manji porast ABA u korenu i veću provodljivost stoma, što bi trebalo da obezbedi veću brzinu fotosinteze i rast biljaka.

3. Dugoročni efekti *T. harzianum* i *T. brevicompactum* u uslovima pojedinačnih i kombinovanih efekata dva režima zalivanja u kombinaciji sa *T. harzianum* ili *T. brevicompactum* pokazuju da gljive nisu imale veliki uticaj na primarni metabolizam paradajza gruzanski zlatni, za razliku od suše.

3.1. Zatvaranje stoma uzrokovano sušom, dovelo je do smanjenja brzine transpiracije i intenziteta fotosinteze, a dalje je uticalo i na smanjenje elektronskog transporta kroz PS II, što je praćeno povećanjem nefotohemijskog gašenja fluorescencije hlorofila.

3.2. Suša je kod središnjih, a naročito kod donjih listova paradajza ubrzala starenje, što je razlog smanjenog ukupnog sadržaja hlorofila i karotenoida. Inhibicija procesa fotosinteze je uticala na povećanje temperature biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu.

3.3. Površina listova, sveža i suva masa listova, stabla i korena je smanjena kod biljaka koje su bile izložene vodnom deficitu.

- 3.4. *T. brevicompactum* je pokazala trend blage stimulacije površine listova, kako kod dobro zalivanih biljaka, tako i kod biljaka izloženih vodnom deficitu.
- 3.5. *T. harzianum* pokazuje tendenciju da kod oba režima zalivanja stimuliše parametre koji se odnose na biomasu biljaka.
- 3.6. Formiranje plodova kod biljaka izloženih vodnom deficitu je usporeno ali je u tretmanu sa *T. harzianum* brzina formiranja plodova paradajza je bila veća i to kako kod optimalno zalivanih biljaka, tako i u tretmanu suše.
- 3.7. Analizom ekspresije *PinII* i *PR1b1* gena utvrđeno je da se u zavisnosti od stresa suše aktiviraju različiti signalni putevi. U svim tretmanima dolazi do aktiviranja signalnog puta jasmonske kiseline (JA), dok je signalni put salicilne kiseline (SA) aktiviran kod biljaka izloženih suši u tretmanu sa *T. harzianum*. Navedene promene ukazuju na bolji potencijal biljaka za otpornost prema biotičkim stresovima.
- 3.8. Na osnovu ekspresije *NCED1* i *SIJAF13* gena utvrđeno je da *T. harzianum* i *T. brevicompactum* utiču na povećanje sadržaja ABA i antocijana u svim tretmanima, što ukazuje na bolji potencijal biljaka za otpornost prema abiotičkim stresovima.
- 3.9. Povećana ekspresija *C3H* gena kao i povišen nivo sekundarnog metabolita hlorogenske kiseline upućuju na povećan sadržaj lignina i suberina, što je detektovano u listu paradajza kod optimalno zalivanih biljaka u prisustvu *T. harzianum* kao i u tretmanu suše u prisustvu *T. brevicompactum*. Opisane promene kod biljaka ukazuju da su one otpornije na biotički stres i da je kod njih efikasniji transport nutrijenata i vode.
4. Dugoročni efekti *T. harzianum* na biljke paradajza gajenog u plasteniku u organskoj proizvodnji pokazuju da je gljiva značajno uticala na sadržaj hlorofila, epidermalnih flavonola i indeks balansa azota u listovima, što govori o aktiviranju sekundarnog metabolizma biljaka.
- 4.1. *T. harzianum* je u plodu paradajza gružanski zlatni uticala na kvalitet ploda. Došlo je do povećanja sadržaja ukupnih flavonoida, smanjenja sadržaja skroba, povećanja indeksa bioakumulacije za Fe i Cr i smanjenja indeksa bioakumulacije za Ni.
- 4.2. Povećane ekspresije svolenin gena upućuju na uspješniju kolonizaciju korena paradajza od strane gljiva roda *Trichoderma*, što je u ovom slučaju i u korelaciji sa uočenim pozitivnim efektima ovih gljiva. Paradajz gružanski zlatni je pokazao veću ekspresiju spomenutog gena u odnosu na narvik.
5. Dobijeni rezultati ukazuju da je zajednički imenitelj svih sprovedenih ogleda međuzavisnost genotipa paradajza i soja gljiva *Trichoderma*. Pozitivan odgovor biljaka na prisustvo gljiva *Trichoderma* povezan je sa uspješnom kolonizacijom, promenama na nivou proteina i aktiviranju sekundarnog metabolizma gde bi trebalo usmeriti i buduća istraživanja.

LITERATURA

7. LITERATURA

1. Adams, E., Miyazaki, T., Moon, J. Y., Sawada, Y., Sato, M., Toyooka, K., Hirai, M.Y. & Shin, R. (2020). Syringic acid alleviates cesium-induced growth defect in Arabidopsis. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9116.
2. Adams, P., De-Leij, F. A., & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial ecology*, 54(2), 306-313.
3. Adnan, L. A., Sathishkumar, P., Yusoff, A. R. M., Hadibarata, T., & Ameen, F. (2017). Rapid bioremediation of Alizarin Red S and Quinizarine Green SS dyes using *Trichoderma lixii* F21 mediated by biosorption and enzymatic processes. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(1), 85-97.
4. Agati, G., Traversi, M. L., & Cerovic, Z. G. (2008). Chlorophyll fluorescence imaging for the noninvasive assessment of anthocyanins in whole grape (*Vitis vinifera* L.) bunches. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6), 1431-1434.
5. Agati, G., Tuccio, L., Kusznierevich, B., Chmiel, T., Bartoszek, A., Kowalski, A., Nondestructive optical sensing of flavonols and chlorophyll in white head cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata subvar. alba) grown under different nitrogen regimens & Kaniszewski, S. (2016). Nondestructive optical sensing of flavonols and chlorophyll in white head cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata subvar. alba) grown under different nitrogen regimens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(1), 85-94.
6. Agurla, S., Gahir, S., Munemasa, S., Murata, Y., & Raghavendra, A. S. (2018). Mechanism of stomatal closure in plants exposed to drought and cold stress. *Survival strategies in extreme cold and desiccation*, 215-232.
7. Ahanger, M. A., & Ahmad, P. (2019). Role of mineral nutrients in abiotic stress tolerance: revisiting the associated signaling mechanisms. *Plant Signaling Molecules*, 269-285.
8. Alexandru, Mioara, et al. "Influence of some *Trichoderma* species on photosynthesis intensity and pigments in tomatoes." *Rom Biotech Lett* 18 (2013): 8499-8510.
9. Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), 61.
10. Alhomodi, A. F., Zavadil, A., Berhow, M., Gibbons, W. R., & Karki, B. (2021). Composition of canola seed sprouts fermented by *Aureobasidium pullulans*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei* under submerged-state fermentation. *Food and Bioprocess Processing*, 126, 256-264.
11. Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 2926-2933.
12. Amaresan, N., Kumar, M. S., Annapurna, K., Kumar, K., & Sankaranarayanan, A. (Eds.). (2020). *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Academic Press.
13. An, J. P., Zhang, X. W., Bi, S. Q., You, C. X., Wang, X. F., & Hao, Y. J. (2020). The ERF transcription factor MdERF38 promotes drought stress-induced anthocyanin biosynthesis in apple. *The Plant Journal*, 101(3), 573-589.
14. Andberg, M., Penttilä, M., & Saloheimo, M. (2015). Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresource technology*, 181, 105-113.
15. Anjum, Z. A., Hayat, S., Ghazanfar, M. U., Ahmad, S., Adnan, M., & Hussian, I. (2020). Does seed priming with *Trichoderma* isolates have any impact on germination and seedling vigor of wheat. *Int. J. botany Stud*, 5(2), 65-68.

16. Aseel, D. G., Rashad, Y. M., & Hammad, S. M. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against Tomato Mosaic Virus. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
17. Azimova, N. S., Khamidova, K. M., Turaeva, B. I., Karimov, H. K., & Shakirov, Z. S. (2020). Properties of the cellulase and xylanase enzyme complexes of *Trichoderma harzianum* UzCF-28. *Eurasian Journal of Biosciences*, 14(2), 5803-5808.
18. Badr, A., & Brueggemann, W. (2020). Comparative analysis of drought stress response of maize genotypes using chlorophyll fluorescence measurements and leaf relative water content. *Photosynthetica*, 58, 638-645.
19. Bal, U., & Altintas, S. (2006). Effects of *Trichoderma harzianum* on the yield and fruit quality of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) grown in an unheated greenhouse. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46(1), 131-136.
20. Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., & Dhiba, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in microbiology*, 9, 1606.
21. Basińska-Barczak, A., Błaszczuk, L., & Szentner, K. (2020). Plant cell wall changes in common wheat roots as a result of their interaction with beneficial fungi of *Trichoderma*. *Cells*, 9(10), 2319.
22. Beheshtizadeh, H., Rezaie, A., Rezaie, A., & Ghandi, A. (2013). Principal component analysis and determination of the selection criteria in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(18), 2024.
23. Belić, M., Nešić, Lj., Ćirić V. (2014): *Praktikum iz pedologije*. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Novom Sadu.
24. Ben-Jabeur, M., Gracia-Romero, A., López-Cristoffanini, C., Vicente, R., Kthiri, Z., Kefauver, S. C., López-Carbonell, M., Serret, M.D., Araus, J.L. & Hamada, W. (2021). The promising MultispeQ device for tracing the effect of seed coating with biostimulants on growth promotion, photosynthetic state and water–nutrient stress tolerance in durum wheat. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6(1), 1-11.
25. Bhandari, S. R., Cho, M. C., & Lee, J. G. (2016). Genotypic variation in carotenoid, ascorbic acid, total phenolic, and flavonoid contents, and antioxidant activity in selected tomato breeding lines. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57(5), 440-452.
26. Bharath, P., Gahir, S., & Raghavendra, A. S. (2021). Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure: An Important Component of Plant Defense Against Abiotic and Biotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 324.
27. Borrero, C., Trillas, M. I., Delgado, A., & Avilés, M. (2012). Effect of ammonium/nitrate ratio in nutrient solution on control of *Fusarium* wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. *Plant Pathology*, 61(1), 132-139.
28. Böttcher, B., Pöllath, C., Staib, P., Hube, B., & Brunke, S. (2016). *Candida* species rewired hyphae developmental programs for chlamydospore formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 1697.
29. Brestic, M., & Zivcak, M. (2013). PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In *Molecular stress physiology of plants* (pp. 87-131). Springer, India.
30. Brestic, M., Cornic, G., Freyer, M. J., & Baker, N. R. (1995). Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress?. *Planta*, 196(3), 450-457.
31. Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant physiology*, 147(2), 779-789.
32. Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003221.

33. Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., & Willmitzer, L. (2013). Trichoderma-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog*, 9(3), e1003221.
34. Brotman, Y., Liseć, J., Méret, M., Chet, I., Willmitzer, L., & Viterbo, A. (2012). Transcript and metabolite analysis of the Trichoderma-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, 158(1), 139-146.
35. Cantero-Navarro, E., Romero-Aranda, R., Fernández-Muñoz, R., Martínez-Andújar, C., Pérez-Alfocea, F., & Albacete, A. (2016). Improving agronomic water use efficiency in tomato by rootstock-mediated hormonal regulation of leaf biomass. *Plant Science*, 251, 90-100.
36. Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaíno, J. A., González, F., Llobell, A., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2007). Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. *Fungal Genetics and Biology*, 44(4), 269-283.
37. Centeno, D. C., Osorio, S., Nunes-Nesi, A., Bertolo, A. L. F., Carneiro, R. T., Araújo, W. L., Steinhauser, M.-C., Michalska, J., Rohrmann, J., Geigenberger, P., Oliver, S. N., Stitt, M., Carrari, F., Rose, J. K. C., & Fernie, A. R. (2011). Malate Plays a Crucial Role in Starch Metabolism, Ripening, and Soluble Solid Content of Tomato Fruit and Affects Postharvest Softening. *The Plant Cell*, 23(1), 162.
38. Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Ghazlen, N. B., & Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia plantarum*, 146(3), 251-260.
39. Chacón, M. R., Rodríguez Galán, O., Benítez Fernández, C. T., Sousa, S., Rey, M., Llobell González, A., & Delgado Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by " *Trichoderma harzianum*". *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 10 (1), 19-27.
40. Cheng, Z. Y., Sun, L., Wang, X. J., Sun, R., An, Y. Q., An, B. L., Zhu, M.X., Zhao, C.F., & Bai, J. G. (2018). Ferulic acid pretreatment alleviates heat stress in blueberry seedlings by inducing antioxidant enzymes, proline, and soluble sugars. *Biologia plantarum*, 62(3), 534-542.
41. Chodak, M., Pietrzykowski, M., & Sroka, K. (2015). Physiological profiles of microbial communities in mine soils afforested with different tree species. *Ecological engineering*, 81, 462-470.
42. Chowdappa, P., Kumar, S. M., Lakshmi, M. J., & Upreti, K. K. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological control*, 65(1), 109-117.
43. Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3), 1579-1592.
44. Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E. K., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology*, 92(4), fiw036.
45. Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Vergara, A. G., & López-Bucio, J. (2015). *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(2), 425-432.
46. Coppola, M., Diletto, G., Digilio, M. C., Woo, S. L., Giuliano, G., Molisso, D., & Rao, R. (2019). Transcriptome and metabolome reprogramming in tomato plants by *Trichoderma harzianum* strain T22 primes and enhances defence responses against aphids. *Frontiers in physiology*, 10, 745.

47. Coppola, M., Diretto, G., Digilio, M. C., Woo, S. L., Giuliano, G., Molisso, D., Pennacchio, F., Lorito, M., & Rao, R. (2019). Transcriptome and metabolome reprogramming in tomato plants by *Trichoderma harzianum* strain T22 primes and enhances defense responses against aphids. *Frontiers in Physiology*, 745.
48. Dahal, K., & Vanlerberghe, G. C. (2018). Improved chloroplast energy balance during water deficit enhances plant growth: more crop per drop. *Journal of experimental botany*, 69(5), 1183-1197.
49. Daliakopoulos, I. N., Apostolakis, A., Wagner, K., Deligianni, A., Koutskoudis, D., Stamatakis, A., & Tsanis, I. K. (2019). Effectiveness of *Trichoderma harzianum* in soil and yield conservation of tomato crops under saline irrigation. *Catena*, 175, 144-153.
50. Daryaei, A., Jones, E. E., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R., & Falloon, R. E. (2016). Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. *Journal of applied microbiology*, 120(4), 999-1009.
51. de Santiago, A., Quintero, J. M., Avilés, M., & Delgado, A. (2011). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron, copper, manganese, and zinc uptake by wheat grown on a calcareous medium. *Plant and Soil*, 342(1-2), 97-104. Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., Lorito M (2012) The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341-354.
52. Degenkolb, T., Von Doehren, H., Fog Nielsen, K., Samuels, G. J., & Brückner, H. (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*, 5(5), 671-680.
53. Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), 3010-3014.
54. do Nascimento, M. O., de Almeida Sarmiento, R., Dos Santos, G. R., de Oliveira, C. A., & de Souza, D. J. (2017). Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Journal of basic microbiology*, 57(8), 699-704.
55. Egner, H., Riehm, H., & Domingo, W. R. (1960). Investigations on the chemical soil analysis as a basis for assessing the soil nutrient status. II: Chemical extraction methods for phosphorus and potassium determination. *Kungliga Lantbrukshögskolans Annaler*, 26, 199-215.
56. Elkelish, A. A., Alhaithloul, H. A. S., Qari, S. H., Soliman, M. H., & Hasanuzzaman, M. (2020). Pretreatment with *Trichoderma harzianum* alleviates waterlogging-induced growth alterations in tomato seedlings by modulating physiological, biochemical, and molecular mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 171, 103946.
57. Engwa, G. A. (2018). Free radicals and the role of plant phytochemicals as antioxidants against oxidative stress-related diseases. *Phytochemicals: Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention. BoD—Books on Demand*, 7, 49-74.
58. Fàbregas, N., & Fernie, A. R. (2019). The metabolic response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1077-1085.
59. Faedda, R., Puglisi, I., Sanzaro, V., Petrone, G., & Cacciola, S. O. (2012). Expression of genes of *Trichoderma harzianum* in response to the presence of cadmium in the substrate. *Natural product research*, 26(24), 2301-2308.
60. Fernández-Calleja, M., Monteagudo, A., Casas, A. M., Boutin, C., Pin, P. A., Morales, F., & Igartua, E. (2020). Rapid on-site phenotyping via field fluorimeter detects differences in photosynthetic performance in a hybrid—parent barley germplasm set. *Sensors*, 20(5), 1486.
61. Fiorini, L., Guglielminetti, L., Mariotti, L., Curadi, M., Picciarelli, P., Scartazza, A., Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2016). *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. *Plant and Soil*, 400(1), 351-366.
62. Flagella, Z., Campanile, R. G., Stoppelli, M. C., De Caro, A., & Di Fonzo, N. (1998). Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO₂-enriched and normal air in cereal species. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 753-759.

63. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017): FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops, [Accessed April 15, 2019].
64. Fu, J., Wang, Y. F., Liu, Z. H., Li, Z. T., & Yang, K. J. (2018). *Trichoderma asperellum* alleviates the effects of saline-alkaline stress on maize seedlings via the regulation of photosynthesis and nitrogen metabolism. *Plant Growth Regulation*, 85(3), 363-374.
65. Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ghanbary, M. A. T., Pirdashti, H., & Dehestani, A. (2018). The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia Horticulturae*, 230, 134-141.
66. Ghazlen, N. B., Cerovic, Z. G., Germain, C., Toutain, S., & Latouche, G. (2010). Non-destructive optical monitoring of grape maturation by proximal sensing. *Sensors*, 10(11), 10040-10068.
67. Gomes, E. V., Ulhoa, C. J., Cardoza, R. E., Silva, R. N., & Gutiérrez, S. (2017). Involvement of *Trichoderma harzianum* Epl-1 protein in the regulation of *Botrytis* virulence-and tomato defense-related genes. *Frontiers in plant science*, 8, 880.
68. González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., & Jiménez-Bremont, J. F. (2018). The *Arabidopsis*-*Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. *Scientific reports*, 8(1), 1-14.
69. Grieco, M., Roustan, V., Dermendjiev, G., Rantala, S., Jain, A., Leonardelli, M., Neumann, K., Berger, V., Engelmeier, D., Bachmann, G., & Ebersberger, I. (2020). Adjustment of photosynthetic activity to drought and fluctuating light in wheat. *Plant, cell & environment*, 43(6), 1484-1500.
70. Griffiths, P. R. (1975). *Chemical infrared Fourier transform spectroscopy*. Wiley.
71. Guidi, L., Brunetti, C., Fini, A., Agati, G., Ferrini, F., Gori, A., & Tattini, M. (2016). UV radiation promotes flavonoid biosynthesis, while negatively affecting the biosynthesis and the de-epoxidation of xanthophylls: Consequence for photoprotection?. *Environmental and Experimental Botany*, 127, 14-25.
72. Guzmán-Guzmán, P., Porrás-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*, 109(1), 6-16.
73. Halifu, S., Deng, X., Song, X., & Song, R. (2019). Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* annual seedlings. *Forests*, 10(9), 758.
74. Harman, G. E. (1998). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *Trichoderma and gliocladium*, 2, 229-265.
75. Harman, G. E., Doni, F., Khadka, R. B., & Uphoff, N. (2019). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. *Journal of applied microbiology*.
76. 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.
77. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
78. Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
79. Harman, G. E.; Lorito, M.; Di Pietro, A.; Hayes, C.K. (1995). U.S. Patent No. 5,474,926. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
80. Hasanagić, D., Koleška, I., Kojić, D., Vlaisavljević, S., Janjić, N., & Kukavica, B. (2020). Long term drought effects on tomato leaves: anatomical, gas exchange and antioxidant modifications. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(7), 1-14.
81. Hassan S, Mathesius U (2012) The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: Opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* 63: 3429–3444.

82. Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.
83. Hinojosa-Gómez, J., Martín-Hernández, S., Heredia, J. B., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T., & Muy-Rangel, M. D. (2020). Anthocyanin Induction by Drought Stress in the Calyx of Roselle Cultivars. *Molecules*, 25(7), 1555.
84. Hoffmann, S., Schulz, E., Csitári, G., & Bankó, L. (2006). Influence of mineral and organic fertilizers on soil organic carbon pools: (Einfluss von organischer und mineralischer Düngung auf C-Pools organischer Bodensubstanz). *Archives of agronomy and soil science*, 52(6), 627-635.
85. Huang, D., Wu, W., Abrams, S. R., & Cutler, A. J. (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of experimental Botany*, 59(11), 2991-3007.
86. Huang, W., Yang, S. J., Zhang, S. B., Zhang, J. L., & Cao, K. F. (2012). Cyclic electron flow plays an important role in photoprotection for the resurrection plant *Paraboea rufescens* under drought stress. *Planta*, 235(4), 819-828.
87. Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: a review. *Molecules*, 23(9), 2313.
88. Ibrahim MH, Jaafar HZE (2012) Dualex 4 reading values as indicator of total flavonoid and chlorophyll content of three varieties of *Labisiapumila*Benth. (Kacip Fatimah) seedlings under greenhouse condition. *Transaction of the Malaysian Society of Plant Physiology* 20:102–105.
89. Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, A. H., Hayat, K., Hayat, K., Fahad, S., Khan, A., & Ullah, A. (2021). Drought tolerance strategies in plants: a mechanistic approach. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(3), 926-944.
90. Iqtedar, M., Nadeem, M., Naeem, H., Abdullah, R., Naz, S., Syed, Q. U. A., & Kaleem, A. (2015). Bioconversion potential of *Trichoderma viride* HN1 cellulase for a lignocellulosic biomass *Saccharum spontaneum*. *Natural product research*, 29(11), 1012-1019.
91. Isendahl, N., & Schmidt, G. (2006). Drought in the Mediterranean-WWF policy proposals. WWF report, Madrid.
92. Iula, G., Miras-Moreno, B., Lucini, L., & Trevisan, M. (2021). The Mycorrhiza-and *Trichoderma*-Mediated Elicitation of Secondary Metabolism and Modulation of Phytohormone Profile in Tomato Plants. *Horticulturae*, 7(10), 394.
93. Jaroszuk-Ścisel, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Tyśkiewicz, K., Pawlik, A., & Janusz, G. (2019). Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4923.
94. Ji, S., Liu, Z., & Wang, Y. (2021). *Trichoderma*-Induced Ethylene Responsive Factor MsERF105 Mediates Defense Responses in *Malus sieversii*. *Frontiers in plant science*, 12.
95. Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. S. P., & Ito, S. I. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular plant pathology*, 19(4), 870-882.
96. Jones Jr, J. B. (2001). Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRC press.
97. Jones Jr, J. B. (2007). Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden. CRC press.
98. Kacprzak, M. J., Rosikon, K., Fijalkowski, K., & Grobelak, A. (2014). The effect of *Trichoderma* on heavy metal mobility and uptake by *Miscanthus giganteus*, *Salix* sp., *Phalaris arundinacea*, and *Panicum virgatum*. *Applied and Environmental Soil Science* 2014.
99. Kang, J. E., Jeon, B. J., Park, M. Y., & Kim, B. S. (2020). Inhibitory activity of sedum middendorffianum-derived 4-hydroxybenzoic acid and vanillic acid on the type III secretion

- system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *The Plant Pathology Journal*, 36(6), 608.
100. Kang, S., Zhang, L., Liang, Y., Hu, X., Cai, H., & Gu, B. (2002). Effects of limited irrigation on yield and water use efficiency of winter wheat in the Loess Plateau of China. *Agricultural water management*, 55(3), 203-216.
101. Kapri, A., & Tewari, L. (2010). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 787-795.
102. Karlusich, J. P., Arce, R., Shahinnia, F., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Zurbriggen, M., Hajirezaei, M.R., & Nestor, C. (2020). Transcriptional and metabolic profiling reveals modulation of genes associated to drought tolerance by chloroplast redox poise in potato. *Authorea Preprints*.
103. Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Tuna, A. L., & Cullu, M. A. (2009). The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. *Scientia horticulturae*, 121(1), 1-6.
104. Khan, M. Y., Haque, M. M., Molla, A. H., Rahman, M. M., & Alam, M. Z. (2017). Antioxidant compounds and minerals in tomatoes by *Trichoderma*-enriched biofertilizer and their relationship with the soil environments. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(3), 691-703.
105. Khoshmanzar, E., Aliasgharzad, N., Neyshabouri, M. R., Khoshru, B., Arzanlou, M., & Lajayer, B. A. (2019). Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1-10.
106. Stikić, R., Jovanović, Z. 2015. *Fiziologija biljaka*. Izdavač „Naučna KMD“ ISBN 978-86-6021-088-5.
107. Koch, G., Rolland, G., Dauzat, M., Bédiée, A., Baldazzi, V., Bertin, N., Guédon, Y., & Granier, C. (2019). Leaf production and expansion: A generalized response to drought stresses from cells to whole leaf biomass - A case study in the tomato compound leaf. *Plants*, 8(10), 409.
108. Kohzuma, K., Cruz, J. A., Akashi, K., Hoshiyasu, S., Munekage, Y. N., Yokota, A., & Kramer, D. M. (2009). The long-term responses of the photosynthetic proton circuit to drought. *Plant, cell & environment*, 32(3), 209-219.
109. Kohzuma, K., Dal Bosco, C., Meurer, J., & Kramer, D. M. (2013). Light-and metabolism-related regulation of the chloroplast ATP synthase has distinct mechanisms and functions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 13156-13163.
110. Konappa, N., Krishnamurthy, S., Arakere, U. C., Chowdappa, S., & Ramachandrapa, N. S. (2020). Efficacy of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria and *Trichoderma* strains in eliciting resistance against bacterial wilt in a tomato. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-13.
111. Kostić, A. Ž., Gašić, U. M., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Barać, M. B., Mačukanović-Jocić, M. P., Avramov, S. N., & Tešić, Ž. L. (2019). Phytochemical Analysis and Total Antioxidant Capacity of Rhizome, Above-Ground Vegetative Parts and Flower of Three Iris Species. *Chemistry & Biodiversity*, 16(3), e1800565
112. Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), 37-42.
113. 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(10), 753-763.
114. Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, E.M., Kuo, A., & Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC genomics*, 20(1), 1-24.

115. Kuhlert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., Roth, M.G., Bi, K., TerAvest, D., Weebadde, P., & Kramer, D. M. (2016). MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network. *Royal Society open science*, 3(10), 160592.
116. Kumar, R., Khurana, A., & Sharma, A. K. (2013). Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of experimental botany*, 65(16), 4561-4575.
117. 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.
118. Lehmann, P., & Or, D. (2015). Effects of stomata clustering on leaf gas exchange. *New Phytologist*, 207(4), 1015-1025.
119. Lehner, S. M., Atanasova, L., Neumann, N. K., Krska, R., Lemmens, M., Druzhinina, I. S., & Schuhmacher, R. (2013). Isotope-assisted screening for iron-containing metabolites reveals a high degree of diversity among known and unknown siderophores produced by *Trichoderma* spp. *Applied and environmental microbiology*, 79(1), 18-31.
120. Leonetti, P., Zonno, M. C., Molinari, S., & Altomare, C. (2017). Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant cell reports*, 36(4), 621-631.
121. Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS One*, 10(6), e0130081.
122. Li, R.X.; Cai, F.; Pang, G.; Shen, Q.R.; Li, R.; Chen, W. Solubilisation of phosphate and 415 micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of 416 tomato plant growth. *PLoS One* 2015, 10, 1-16.
123. Li, Y. Q., Song, K., Li, Y. C., & Chen, J. (2016). Statistical culture-based strategies to enhance chlamydospore production by *Trichoderma harzianum* SH2303 in liquid fermentation. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 17(8), 619-627.
124. Li, Y., Song, H., Zhou, L., Xu, Z., & Zhou, G. (2019). Tracking chlorophyll fluorescence as an indicator of drought and rewatering across the entire leaf lifespan in a maize field. *Agricultural Water Management*, 211, 190-201.
125. Liang, G., Liu, J., Zhang, J., & Guo, J. (2020). Effects of drought stress on photosynthetic and physiological parameters of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 145(1), 12-17.
126. Lichtenthaler HL (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148:350–382
127. Liu, B., Ji, S., Zhang, H., Wang, Y., & Liu, Z. (2020). Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. *Microbiological research*, 235, 126445.
128. Liu, J., Guo, Y. Y., Bai, Y. W., Camberato, J. J., Xue, J. Q., & Zhang, R. H. (2018). Effects of drought stress on the photosynthesis in maize. *Russian journal of plant physiology*, 65(6), 849-856.
129. Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F., Visser, R. G., & Bovy, A. (2018). Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review. *Frontiers in Chemistry*, 6, 52.
130. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*, 25, 402–408.
131. Lladó, S., Jiménez, N., Vinas, M., & Solanas, A. M. (2009). Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil. *Biodegradation*, 20(5), 593-601.

132. Lombardi, N., Caira, S., Troise, A. D., Scaloni, A., Vitaglione, P., Vinale, F., Marra, R., Salzano, A.M., Lorito, M., & Woo, S. L. (2020). Trichoderma applications on strawberry plants modulate the physiological processes positively affecting fruit production and quality. *Frontiers in microbiology*, 11, 1364.
133. Loukehaich, R., Wang, T., Ouyang, B., Ziaf, K., Li, H., Zhang, J., Lu, Y. & Ye, Z. (2012). SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *Journal of experimental botany*, 63(15), 5593-5606.
134. Løvdaal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Verheul, M., & Lillo, C. (2010). Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, 71(5-6), 605-613
135. Ma, J. N., & Ma, C. M. (2015). Antifungal inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 635-641). Academic Press.
136. 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.
137. Małolepsza, U., Nawrocka, J., & Szczech, M. (2017). Trichoderma virens 106 inoculation stimulates defence enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered Rhizoctonia solani infection. *Biocontrol science and technology*, 27(2), 180-199.
138. Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M. R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., Napolitano, M., Lombardi, N., Lorito, M., & Woo, S. L. (2018). Modulation of tomato response to Rhizoctonia solani by Trichoderma harzianum and its secondary metabolite harzianic acid. *Frontiers in microbiology*, 9, 1966.
139. Manoj, K., Meena, M. L., Sanjay, K., Sutanu, M., & Devendra, K. (2013). Effect of nitrogen, phosphorus and potassium fertilizers on the growth, yield and quality of tomato var. Azad T-6. *Asian Journal of Horticulture*, 8(2), 616-619.
140. Manojlović, S., Ubavić, M., Bogdanović, D., Dozet, D. (1995): Praktikum iz agrohemije. Poljoprivredni fakultet. Institut za ratarsvo i povrtarstvo, Novi Sad.
141. María del Carmen, H. R., 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), 1-30.
142. Martínez-Medina, A., Van Wees, S. C., & Pieterse, C. M. (2017). Airborne signals from Trichoderma fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of Arabidopsis thaliana and Solanum lycopersicum. *Plant, cell & environment*, 40(11), 2691-2705.
143. Matsukura, C. (2016). Sugar accumulation in tomato fruit and its modification using molecular breeding techniques. In *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops* (pp. 141-154). Springer, Berlin, Heidelberg.
144. Mayo-Prieto, S., Marra, R., Vinale, F., Rodríguez-González, Á., Woo, S. L., Lorito, M., & Casquero, P. A. (2019). Effect of Trichoderma velutinum and Rhizoctonia solani on the Metabolome of Bean Plants (Phaseolus vulgaris L.). *International journal of molecular sciences*, 20(3), 549.
145. Mazis, A., Choudhury, S. D., Morgan, P. B., Stoerger, V., Hiller, J., Ge, Y., & Awada, T. (2020). Application of high-throughput plant phenotyping for assessing biophysical traits and drought response in two oak species under controlled environment. *Forest Ecology and Management*, 465, 118101.
146. Mehmood, H., Abbasi, G. H., Jamil, M., Malik, Z., Ali, M., & Iqbal, R. (2021). Assessing the potential of exogenous caffeic acid application in boosting wheat (Triticum aestivum L.) crop productivity under salt stress. *Plos one*, 16(11), e0259222.
147. Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.

148. Mitter, E. K., Tosi, M., Obregón, D., Dunfield, K. E., & Germida, J. J. (2021). Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 29.
149. Monfil, V. O., & Casas-Flores, S. (2014). Molecular mechanisms of biocontrol in *Trichoderma* spp. and their applications in agriculture. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 429-453). Elsevier.
150. Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Nicolas, C., & Monte, E. (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of plant physiology*, 167(8), 659-665.
151. Morales, D., Rodríguez, P., Dell'Amico, J., Nicolas, E., Torrecillas, A., & Sánchez-Blanco, M. J. (2003). High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biologia Plantarum*, 47(2), 203-208.
152. Morales-Barrera, L., & Cristiani-Urbina, E. (2008). Hexavalent chromium removal by a *Trichoderma inhamatum* fungal strain isolated from tannery effluent. *Water, Air, and Soil Pollution*, 187(1), 327-336.
153. Mou, W., Li, D., Luo, Z., Mao, L., & Ying, T. (2015). Transcriptomic analysis reveals possible influences of ABA on secondary metabolism of pigments, flavonoids and antioxidants in tomato fruit during ripening. *PLoS One*, 10(6), e0129598.
154. Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual review of phytopathology*, 51, 105-129.
155. Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M., & Gibon, Y. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of experimental botany*, 62(6), 1715-1729.
156. Na, X., Cao, X., Ma, C., Ma, S., Xu, P., Liu, S., Wang, J., Wang, H., Chen, L., & Qiao, Z. (2019). Plant stage, not drought stress, determines the effect of cultivars on bacterial community diversity in the rhizosphere of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). *Frontiers in microbiology*, 10, 828.
157. Nakabayashi, R., Mori, T., & Saito, K. (2014). Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, 9(8), e29518.
158. Naranjo Pinta, M., Montoliu, I., Aura, A. M., Seppänen-Laakso, T., Barron, D., & Moco, S. (2018). In Vitro Gut Metabolism of [U-13C]-Quinic Acid, The Other Hydrolysis Product of Chlorogenic Acid. *Molecular nutrition & food research*, 62(22), 1800396.
159. Nawrocka, J., Szczech, M., & Małolepsza, U. (2017). *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection Science*, 54(1), 17-23.
160. NawRocka, J., Szczech, M., MałolepSza, U. (2017). *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection Science*, 54(1), 17-23.
161. Nguyen, V. P., Stewart, J. D., Ioannou, I., & Allais, F. (2021). Sinapic acid and sinapate esters in brassica: Innate accumulation, biosynthesis, accessibility via chemical synthesis or recovery from biomass, and biological activities. *Frontiers in Chemistry*, 9, 350.
162. Nitsch, L. M. C., Oplaat, C., Feron, R., Ma, Q., Wolters-Arts, M., Hedden, P., Mariani, C., & Vriezen, W. H. (2009). Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. *Planta*, 229(6), 1335-1346.
163. Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S. O. N. J. A., Driscoll, S., Novitskaya, L., & Foyer, C. H. (2002). Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of Botany*, 89(7), 841-850.

164. Nzanza, B., Marais, D., & Soundy, P. (2012). Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. *Scientia Horticulturae*, 144, 55-59.
165. Oljira, A. M., Hussain, T., Waghmode, T. R., Zhao, H., Sun, H., Liu, X., Wang, X., & Liu, B. (2020). *Trichoderma* Enhances Net Photosynthesis, Water Use Efficiency, and Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Salt Stress. *Microorganisms*, 8(10), 1565.
166. Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, 143, 48-53.
167. Ortega-García, J. G., Montes-Belmont, R., Rodríguez-Monroy, M., Ramírez-Trujillo, J. A., Suárez-Rodríguez, R., Sepúlveda-Jiménez, G. (2015). Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. *Scientia Horticulturae*, 195, 8-16.
168. Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54.
169. Pan, T., Liu, M., Kreslavski, V. D., Zharmukhamedov, S. K., Nie, C., Yu, M., Kuznetsov, V. V., Allakhverdiev, S. I. & Shabala, S. (2020). Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-35.
170. Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., & Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop protection*, 92, 176-181.
171. Patanè, C., Tringali, S., & Sortino, O. (2011). Effects of deficit irrigation on biomass, yield, water productivity and fruit quality of processing tomato under semi-arid Mediterranean climate conditions. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 590-596.
172. Paupière, M. J., Tikunov, Y., Schleiff, E., Bovy, A., & Fragkostefanakis, S. (2020). Reprogramming of Tomato Leaf Metabolome by the Activity of Heat Stress Transcription Factor HsfB1. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2082.
173. Paupière, M. J., Tikunov, Y., Schleiff, E., Bovy, A., & Fragkostefanakis, S. (2020). Reprogramming of Tomato leaf metabolome by the activity of heat stress transcription factor HsfB1. *Frontiers in Plant Science*, 2082.
174. Pehlivan, N., Yesilyurt, A. M., Durmus, N., & Karaoglu, S. A. (2017). *Trichoderma lixii* ID11D seed biopriming mitigates dose dependent salt toxicity in maize. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(3), 79.
175. Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in plant science*, 8, 822.
176. Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in plant science*, 8, 822.
177. Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in plant science*, 8, 822.
178. Pepper, I.L., Gerba, C.P., Brendencke, J.W. (1995): *Environmental Microbiology*, CA 92101-4495. A Laboratory Manual. Academic Press, San Diego, USA, pp. 175.
179. Petrović, I., Savić, S., Gricourt, J., Causse, M., Jovanović, Z., & Stikić, R. (2021). Effect of long-term drought on tomato leaves: the impact on metabolic and antioxidative response. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 27(12), 2805-2817.

180. Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of experimental botany*, 62(3), 869-882.
181. Pleban, J. R., Guadagno, C. R., Mackay, D. S., Weinig, C., & Ewers, B. E. (2020). Rapid chlorophyll a fluorescence light response curves mechanistically inform photosynthesis modeling. *Plant physiology*, 183(2), 602-619.
182. Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 975:384–394
183. Qi, W., & Zhao, L. (2013). Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of basic microbiology*, 53(4), 355-364.
184. Qu, X., Wang, H., Chen, M., Liao, J., Yuan, J., & Niu, G. (2019). Drought stress-induced physiological and metabolic changes in leaves of two oil tea cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(6), 439-447.
185. Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F. J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J. P., & Lutts, S. (2019). Tomato fruit development and metabolism. *Frontiers in plant science*, 10, 1554.
186. Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H., & Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant physiology*, 122(4), 1119-1128.
187. Racić, G., Vukelić, I., Prokić, L., Čurčić, N., Zorić, M., Jovanović, L., & Panković, D. (2018). The influence of *Trichoderma brevicompactum* treatment and drought on physiological parameters, abscisic acid content and signalling pathway marker gene expression in leaves and roots of tomato. *Annals of Applied Biology*, 173(3), 213-221.
188. Ram, R. M., Vaishnav, A., & Singh, H. B. (2020). *Trichoderma* spp.: Expanding Potential beyond Agriculture. In *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond* (pp. 351-367). Springer, Cham.
189. Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in microbiology*, 10, 1030.
190. Rangel Pedersen, N., Tovborg, M., Soleimani Farjam, A., & Della Pia, E. A. (2021). Multicomponent carbohydrase system from *Trichoderma reesei*: A toolbox to address complexity of cell walls of plant substrates in animal feed. *Plos one*, 16(6), e0251556.
191. Rawat, L., Singh, Y., Shukla, N., & Kumar, J. (2012). Seed biopriming with salinity tolerant isolates of *trichoderma harzmmunalle*viates salt stress in rice: growth, physiological and biochemical characteristics. *Journal of Plant pathology*, 353-365.
192. Rejeb, I. B., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475.
193. Risoli, S., Cotrozzi, L., Sarrocco, S., Nuzzaci, M., Pellegrini, E., & Vitti, A. (2022). *Trichoderma*-Induced Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum* Species: A Meta-Analysis. *Plants*, 11(2), 180.
194. Rodriguez-Iruretagoiena, A., Trebolazabala, J., Martinez-Arkarazo, I., de Diego, A., & Madariaga, J. M. (2015). Metals and metalloids in fruits of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) and their cultivation soils in the Basque Country: concentrations and accumulation trends. *Food Chemistry*, 173, 1083-1089.
195. Romero-Contreras, Y. J., Ramírez-Valdespino, C. A., Guzmán-Guzmán, P., Macías-Segoviano, J. I., Villagómez-Castro, J. C., & Olmedo-Monfil, V. (2019). Tal6 from *Trichoderma atroviride* is a LysM effector involved in mycoparasitism and plant association. *Frontiers in microbiology*, 10, 2231.
196. Roper, T. R., Keller, J. D., Loescher, W. H., & Rom, C. R. (1988). Photosynthesis and carbohydrate partitioning in sweet cherry: fruiting effects. *Physiologia Plantarum*, 72(1), 42-47.

197. Rose, R., Rose, C. L., Omi, S. K., Forry, K. R., Durall, D. M., & Bigg, W. L. (1991). Starch determination by perchloric acid vs enzymes: evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(1), 2-11.
198. Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, S. L., Vinale, F., Marra, R., Varlese, R., Manganiello, G., Pascale, A., Scala, V., & Lorito, M. (2015). Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma* hydrophobin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(2), 167-179.
199. Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.
200. Sánchez-Rodríguez, E., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., Blasco, B., Leyva, R., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2012). Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. *Plant Science*, 188, 89-96.
201. Sánchez-Rodríguez, E., Moreno, D. A., Ferreres, F., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., & Ruiz, J. M. (2011). Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: changes on phenolic metabolites and related enzymes. *Phytochemistry*, 72(8), 723-729.
202. Sant'Ana, D. V. P., & Lefsrud, M. (2018). Tomato proteomics: tomato as a model for crop proteomics. *Scientia Horticulturae*, 239, 224-233.
203. Savitzky, A., and Golay, M. J. E. (1964). „Smoothing and differentiation of data by simp
204. Schilbert, H. M., Schöne, M., Baier, T., Busche, M., Viehöver, P., Weisshaar, B., & Holtgräwe, D. (2021). Characterization of the *Brassica napus* flavonol synthase gene family reveals bifunctional flavonol synthases. *Frontiers in Plant Science*, 2290.
205. Scholander, P. F., Bradstreet, E. D., Hemmingsen, E. A., Hammel, H. T. (1965): Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants lants. *Science* 148:339-346.
206. Schwarz, D., Thompson, A. J., & Kläring, H. P. (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in plant science*, 5, 625.
207. Schwarz, D., Thompson, A. J., & Kläring, H. P. (2014). Guidelines to use tomato in experiments with a controlled environment. *Frontiers in plant science*, 5, 625.
208. Sekhar, Y. C., Ahammed, S. K., Prasad, T. N. V. K. V., & Devi, R. S. J. (2017). Identification of *Trichoderma* species based on morphological characters isolated from rhizosphere of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Int J Sci Environ Technol*, 6, 2056-2063.
209. Şesan, T. E., Oancea, A. O., Ştefan, L. M., Mănoiu, V. S., Ghiurea, M., Răut, I., Constantinescu-Aruxandei, D., Toma, A., Savin, S., Bira, A.F. & Pomohaci, C.M. (2020). Effects of Foliar Treatment with a *Trichoderma* Plant Biostimulant Consortium on *Passiflora caerulea* L. Yield and Quality. *Microorganisms*, 8(1), 123.
210. Shamim, F., Johnson, G. N., Saqlan, S. M., & Waheed, A. (2013). Higher antioxidant capacity protects photosynthetic activities as revealed by Chl a fluorescence in drought tolerant tomato genotypes. *Pak. J. Bot*, 45(5), 1631-1642.
211. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
212. Sharma, S., Kour, D., Rana, K. L., Dhiman, A., Thakur, S., Thakur, P., Thakur, N., Sudheer, S., Yadav, N., & Yadav, A.N. (2019). *Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. In *Recent advancement in white biotechnology through fungi* (pp. 85-120). Springer, Cham.
213. Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of experimental botany*, 53(366), 33-37.
214. She, X., & Song, X. (2012). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* via reducing nitric oxide levels in guard cells. *New Zealand Journal of Botany*, 50(2), 203-216.
215. Shibamoto, T. (2015). Volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components. In *Coffee in health and disease prevention* (pp. 129-135). Academic Press.

216. Shivashankara, K. S., & Mathai, C. K. (2000). Inhibition of photosynthesis by flowering in mango (*Mangifera indica* L.). A study by gas exchange methods. *Scientia horticulturae*, 83(3-4), 205-212.
217. Shojaie, B., Mostajeran, A., & GHANADIAN, M. (2016). Flavonoid dynamic responses to different drought conditions: amount, type, and localization of flavonols in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana* L. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 612-622.
218. Shores, M., & Harman, G. E. (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant physiology*, 147(4), 2147-2163.
219. 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.
220. Shukla, N., Awasthi, R. P., Rawat, L., & Kumar, J. (2015). Seed biopriming with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. *Annals of applied Biology*, 166(2), 171-182.
221. Simakov VN (1957) The use of phenylanthranilic acid in the determination of humus by Tyurin's method. *Pochvovedenie* 8:72-73
222. Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virol. Mycol*, 3(127), 2161-0517.
223. Singh, S. P., H. B. Singh, and D. K. Singh. "Effect of *Trichoderma harzianum* on mineral component and antioxidant activity of tomato fruits." *Vegetos* 26, no. 2 (2013): 237-244.
224. Singh, S. P., Singh, H. B., & Singh, D. K. (2013). Effect of *Trichoderma harzianum* on mineral component and antioxidant activity of tomato fruits. *Vegetos*, 26(2), 237-244.
225. Singh, S. P., Singh, H. B., Singh, D. K., & Rakshit, A. (2014). *Trichoderma*-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Egyptian Journal of Biology*, 16, 29-38.
226. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*, vol. 299 (pp. 152-178).
227. Sivakumar, R., Devi, D. D., Chandrasekar, C. N., Santhi, R., & Vijayakumar, R. M. (2014). Impact of drought on gas exchange and physiological parameters and yield in contrasting genotypes of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1-7.
228. Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: the "secrets" of a multitasking biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762.
229. Stewart, A., & Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 415-428). Elsevier.
230. Sytar, O., Brücková, K., Kovar, M., Živčák, M., Hemmerich, I., & Brestič, M. (2017). Nondestructive detection and biochemical quantification of buckwheat leaves using visible (VIS) and near-infrared (NIR) hyperspectral reflectance imaging. *Journal of Central European Agriculture*, 18(4), 864-878.
231. Sytar, O., Zivcak, M., & Brestic, M. (2016). Noninvasive methods to support metabolomic studies targeted at plant phenolics for food and medicinal use. In *Plant omics: trends and applications* (pp. 407-443). Springer, Cham.
232. Taha, N., Kamel, S., Elsakhawy, T., Bayoumi, Y., Omara, A. E. D., & El-Ramady, H. R. (2020). Sustainable Approaches of *Trichoderma* under Changing Environments for Vegetable Production. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 4(2020), 291-311.
233. Tamburino, R., Vitale, M., Ruggiero, A., Sassi, M., Sannino, L., Arena, S., Costa, A., Batelli, G., Zambrano, N., Scaloni, A., & Grillo, S. (2017). Chloroplast proteome response to drought stress and recovery in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC plant biology*, 17(1), 1-14.

234. Taveira, M., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Oliveira, L., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2012). Fast determination of bioactive compounds from *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves. *Food chemistry*, 135(2), 748-755.
235. Tezara, W. M. V. J., Mitchell, V. J., Driscoll, S. D., & Lawlor, D. W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401(6756), 914-917.
236. Thioulouse, J., & Dray, S. (2009). ade4TkGUI: ade4 Tcl/Tk Graphical User Interface. R Package Version 0.2-5.
237. Tohge, T., Wendenburg, R., Ishihara, H., Nakabayashi, R., Watanabe, M., Sulpice, R., Hoefgen, R., Takayama, H., Saito, K., Stitt, M., & Fernie, A. R. (2016). Characterization of a recently evolved flavonol-phenylacyltransferase gene provides signatures of natural light selection in Brassicaceae. *Nature communications*, 7(1), 1-11.
238. Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
239. Tóth, Z., Táncsics, A., Kriszt, B., Kröel-Dulay, G., Ónodi, G., & Hornung, E. (2017). Extreme effects of drought on composition of the soil bacterial community and decomposition of plant tissue. *European Journal of Soil Science*, 68(4), 504-513.
240. Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., Lorito M (2012) The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341-354.
241. Tyurin IV (1931) A modification of a volumetric method of humus determination with chromic acid. *Pochvovedenie* 36(5-6):36
242. Urban, L., Jegouzo, L., Damour, G., Vandame, M., & François, C. (2008). Interpreting the decrease in leaf photosynthesis during flowering in mango. *Tree physiology*, 28(7), 1025-1036.
243. Urban, L., Lu, P., & Thibaud, R. (2004). Inhibitory effect of flowering and early fruit growth on leaf photosynthesis in mango. *Tree Physiology*, 24(4), 387-399.
244. Vargas, J. T., Rodríguez-Monroy, M., Meyer, M. L., Montes-Belmont, R., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2017). *Trichoderma asperellum* ameliorates phytotoxic effects of copper in onion (*Allium cepa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 136, 85-93.
245. Vargas, W. A., Crutcher, F. K., & Kenerley, C. M. (2011). Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytologist*, 189(3), 777-789.
246. Vargas, W. A., Mandawe, J. C., & Kenerley, C. M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant physiology*, 151(2), 792-808.
247. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309(1), 1-7.
248. Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.
249. Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., & Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48(6), 705-711.
250. 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.
251. Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M., & Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and

- abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161.
252. Vitti, A., Pellegrini, E., Nali, C., Lovelli, S., Sofo, A., Valerio, M., Scopa, A. & Nuzzaci, M. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in plant science*, 7, 1520.
253. Von Caemmerer, S. V., & Farquhar, G. D. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153(4), 376-387.
254. Wagner, K., Apostolakis, A., Daliakopoulos, I., & Tsanis, I. (2016, April). Can Tomato Inoculation with *Trichoderma* Compensate Yield and Soil Health Deficiency due to Soil Salinity?. In EGU General Assembly Conference Abstracts (pp. EPSC2016-1007).
255. Wahb-Allah, M. A., Alsadon, A. A., & Ibrahim, A. A. (2011). Drought tolerance of several tomato genotypes under greenhouse conditions. *World Applied Sciences Journal*, 15(7), 933-940.
256. Waseem, M., Rong, X., & Li, Z. (2019). Dissecting the role of a basic helix-loop-helix transcription factor, SlbHLH22, under salt and drought stresses in transgenic *Solanum lycopersicum* L. *Frontiers in plant science*, 734.
257. Wei, Z., Fang, L., Li, X., Liu, J., & Liu, F. (2020). Effects of elevated atmospheric CO₂ on leaf gas exchange response to progressive drought in barley and tomato plants with different endogenous ABA levels. *Plant and Soil*, 447(1), 431-446.
258. Wilfred, V., & Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Springer.
259. Yadav, A. N., Kumar, V., Dhaliwal, H. S., Prasad, R., & Saxena, A. K. (2018). Microbiome in crops: diversity, distribution, and potential role in crop improvement. In *Crop improvement through microbial biotechnology* (pp. 305-332). Elsevier.
260. Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(4), 316-323.
261. Yan, Y., Mao, Q., Wang, Y., Zhao, J., Fu, Y., Yang, Z., Peng, X., Zhang, M., Bai, B., Liu, A. & Chen, S. (2021). *Trichoderma harzianum* induces resistance to root-knot nematodes by increasing secondary metabolite synthesis and defense-related enzyme activity in *Solanum lycopersicum* L. *Biological Control*, 158, 104609.
262. Yang, C. S., & Heinsohn, P. A. (2007). *Sampling and analysis of indoor microorganisms*. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.
263. Yang, X., Li, Y., Chen, H., Huang, J., Zhang, Y., Qi, M., Liu, Y., & Li, T. (2020). Photosynthetic Response Mechanism of Soil Salinity-Induced Cross-Tolerance to Subsequent Drought Stress in Tomato Plants. *Plants*, 9(3), 363.
264. Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y, Chet I (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* 235(2): 235-242.
265. Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 863-873.
266. Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57(3), 508-514.
267. Yoshioka, Y., Ichikawa, H., Naznin, H. A., Kogure, A., & Hyakumachi, M. (2012). Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. *Pest management science*, 68(1), 60-66.
268. You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological control*, 101, 31-38.
269. Yu, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Liu, Z. (2021). Biocontrol and growth-promoting effect of *Trichoderma asperellum* TaspHu1 isolate from *Juglans mandshurica* rhizosphere soil. *Microbiological Research*, 242, 126596.

270. Yuan, X. K., Yang, Z. Q., Li, Y. X., Liu, Q., & Han, W. (2016). Effects of different levels of water stress on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant enzyme activities of greenhouse tomato. *Photosynthetica*, 54(1), 28-39.
271. Zafar-ul-Hye, M., Akbar, M. N., Iftikhar, Y., Abbas, M., Zahid, A., Fahad, S., Datta, R., Ali, M., Elgorban, A.M., Ansari, M.J., & Danish, S. (2021). Rhizobacteria Inoculation and Caffeic Acid Alleviated Drought Stress in Lentil Plants. *Sustainability*, 13(17), 9603.
272. Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. *Fungal biology reviews*, 30(2), 74-90.
273. Zgallai, H., Steppe, K., & Lemeur, R. (2006). Effects of different levels of water stress on leaf water potential, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain anti-oxidative enzymes in tomato plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(6), 679-685.
274. Zhang, F., Huo, Y., Cobb, A. B., Luo, G., Zhou, J., Yang, G., Wilson, G.W., & Zhang, Y. (2018). *Trichoderma* biofertilizer links to altered soil chemistry, altered microbial communities, and improved grassland biomass. *Frontiers in microbiology*, 9, 848.
275. Zhang, R. S., Baloch, A. M., Li, S., Liu, Z. H., Jiang, C. Y., Wang, H., Baloch, A.W., & Diao, G. P. (2018). Improvement in biomass, IAA levels and auxin signaling-related gene expression in shanxin poplar seedlings (*Populus davidiana* × *P. alba* var. *pyramidalis*) induced by *Trichoderma asperellum*. *Pak. J. Bot*, 50(4), 1629-1636.
276. Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in plant science*, 7, 1405.
277. Zhang, Z., Cao, B., Gao, S., & Xu, K. (2019). Grafting improves tomato drought tolerance through enhancing photosynthetic capacity and reducing ROS accumulation. *Protoplasma*, 256(4), 1013-1024.
278. Zhao, T., Wu, T., Pei, T., Wang, Z., Yang, H., Jiang, J., Zhang, H., Chen, X., Li, J., & Xu, X. (2021). Overexpression of *SIGATA17* promotes drought tolerance in transgenic tomato plants by enhancing activation of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. *Frontiers in plant science*, 12.
279. Zhao, W., Sun, Y., Kjelgren, R., & Liu, X. (2015). Response of stomatal density and bound gas exchange in leaves of maize to soil water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1), 1704.
280. Zheng, J., Huang, G., Jia, D., Wang, J., Mota, M., Pereira, L. S., Huang, Q., Xu, X., & Liu, H. (2013). Responses of drip irrigated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) yield, quality and water productivity to various soil matric potential thresholds in an arid region of Northwest China. *Agricultural Water Management*, 129, 181-193.
281. Zhou, R., Yu, X., Ottosen, C. O., Rosenqvist, E., Zhao, L., Wang, Y., Yu, W., Zhao, T., & Wu, Z. (2017). Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC plant biology*, 17(1), 1-13.
282. Zhou, R., Yu, X., Zhao, T., Ottosen, C. O., Rosenqvist, E., & Wu, Z. (2019). Physiological analysis and transcriptome sequencing reveal the effects of combined cold and drought on tomato leaf. *BMC plant biology*, 19(1), 1-14.
283. Zhu, Z. X., & Zhuang, W. Y. (2015). *Trichoderma* (*Hypocrea*) species with green ascospores from China. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 113.
284. Zivcak, M., Brestic, M., Balatova, Z., Drevenakova, P., Olsovska, K., Kalaji, H. M., Yang, X., & Allakhverdiev, S. I. (2013). Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. *Photosynthesis research*, 117(1-3), 529-546.
285. Zivcak, M., Kalaji, H. M., Shao, H. B., Olsovska, K., & Brestic, M. (2014). Photosynthetic proton and electron transport in wheat leaves under prolonged moderate drought stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 107-115.

286. Zsögön, A. (2011). Identification and characterization of a tomato introgression line with reduced wilting under drought.
287. Zsögön, A., Vicente, M. H., Reartes, D. S., & Peres, L. E. P. (2017). Understanding and improving water-use efficiency and drought resistance in tomato. *Achieving sustainable cultivation of tomatoes*, 139-164.
288. Shi, L., Guo, M., Ye, N., Liu, Y., Liu, R., Xia, Y., Cui, S., & Zhang, J. (2015). Reduced ABA accumulation in the root system is caused by ABA exudation in upland rice (*Oryza sativa* L. var. Gaoshan1) and this enhanced drought adaptation. *Plant and Cell Physiology*, 56(5), 951-964.
289. Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant physiology*, 154(2), 483-486.

PRILOG

8. PRILOG

Prilog 1.

Parametri razmene gasova mereni pomoću mobilnog sistema Li-6400XT: E - intenzitet transpiracije, A - intenzitet fotosinteze, Ci - intracelularna koncentracija CO₂, NPQ - nefotohemijisko gašenje fluorescencije hlorofila, gs - provodljivost stoma, ETR - brzina linearnog elektronskog transporta kroz PS II, Fo - minimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila, Fm - maksimalni kvantni prinos fluorescencije hlorofila i Fv/Fm - maksimalan kvantni prinos fotohemije fotosistema II, WUE - trenutna efikasnost korišćenja vode ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), WUEi - unutrašnja efikasnost korišćenja vode ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$) i A/Ci - efikasnost karboksilacije. Parametri su mereni pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

21 dan (dostignut nivo od 15 % SWC)												
Tretmani	A ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	gs ($\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2$ mol^{-1})	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2}$ s^{-1})	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}$ s^{-1})	WUE	WUEi	A/Ci \times 10^{-2}
C	14.56 \pm 1.99 a	0.44 \pm 0.12 a	325.82 \pm 14.47 a	550.00 \pm 0.00 a	2900.00 \pm 0.00 a	0.81 \pm 0.00 a	1.23 \pm 0.11 a	117.40 \pm 15.49 a	5.75 \pm 0.99 a	2.44 \pm 0.43 b	31.94 \pm 8.25 b	4.58 \pm 0.53 a
C_T1	13.54 \pm 2.32 a	0.47 \pm 0.12 a	326.39 \pm 9.87 a	550.00 \pm 0.00 a	2900.00 \pm 0.00 a	0.81 \pm 0.00 a	1.25 \pm 0.10 a	114.17 \pm 12.43 a	6.09 \pm 1.07 a	2.28 \pm 0.34 b	30.08 \pm 5.63 b	4.39 \pm 0.49 a
C_T2	16.69 \pm 2.78 a	0.62 \pm 0.13 a	332.09 \pm 6.65 a	550.00 \pm 0.00 a	2900.00 \pm 0.00 a	0.81 \pm 0.00 a	1.23 \pm 0.13 a	124.18 \pm 14.84 a	7.27 \pm 0.89 a	2.3 \pm 0.21 b	28.07 \pm 3.31 b	5.03 \pm 0.65 a
D	2.78 \pm 1.68 b	0.03 \pm 0.02 b	255.85 \pm 44.58 b	550.00 \pm 0.00 a	2900.00 \pm 0.00 a	0.81 \pm 0.00 a	1.41 \pm 0.15 a	78.49 \pm 12.73 b	0.68 \pm 0.51 b	4.24 \pm 1.24 a	84.02 \pm 13.78 a	1.06 \pm 0.45 c
D_T1	4.79 \pm 2.00 b	0.05 \pm 0.02 b	224.63 \pm 44.92 b	550.00 \pm 0.00 a	2900.00 \pm 0.00 a	0.81 \pm 0.00 a	1.25 \pm 0.14 a	84.13 \pm 10.68 b	0.87 \pm 0.30 b	5.68 \pm 1.00 a	111.07 \pm 17.93 a	2.23 \pm 0.84 b
D_T2	4.35 \pm 1.39 b	0.04 \pm 0.01 b	222.26 \pm 39.65 b	550.00 \pm 0.00 a	2900.00 \pm 0.00 a	0.81 \pm 0.00 a	1.24 \pm 0.10 a	74.19 \pm 6.87 b	0.83 \pm 0.19 b	5.11 \pm 1.09 a	96.88 \pm 23.39 a	2.36 \pm 0.62 b

22 dan (dostignut nivo od 15 % SWC)											
A ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	gs ($\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2$ mol^{-1})	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2}$ s^{-1})	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}$ s^{-1})	WUE	WUEi	A/Ci \times 10^{-2}
16.33 \pm 2.20 a	0.72 \pm 0.11 a	339.51 \pm 6.46 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.36 \pm 0.13 a	119.73 \pm 9.19 a	7.17 \pm 0.41 a	2.27 \pm 0.26 c	23.24 \pm 3.21 c	4.88 \pm 0.69 a
15.86 \pm 2.43 a	0.81 \pm 0.12 a	345.34 \pm 6.56 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.29 \pm 0.10 a	124.06 \pm 13.62 a	7.38 \pm 0.71 a	2.19 \pm 0.28 c	19.40 \pm 4.26 c	4.65 \pm 0.61 a
16.61 \pm 2.35 a	0.71 \pm 0.08 a	337.22 \pm 7.31 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.31 \pm 0.11 a	129.86 \pm 14.60 a	7.38 \pm 0.85 a	2.29 \pm 0.21 c	23.99 \pm 2.90 c	4.95 \pm 0.56 a
2.72 \pm 1.26 b	0.03 \pm 0.01 b	231.10 \pm 49.28 b	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.42 \pm 0.13 a	74.47 \pm 9.89 b	0.46 \pm 0.23 b	5.37 \pm 1.23 ab	91.63 \pm 18.71 ab	1.29 \pm 0.45 b
3.88 \pm 1.29 b	0.03 \pm 0.01 b	185.89 \pm 62.95 b	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.43 \pm 0.13 a	85.26 \pm 10.60 b	0.53 \pm 0.26 b	7.37 \pm 1.55 a	122.82 \pm 23.79 a	2.46 \pm 1.64 b
2.25 \pm 1.45 b	0.04 \pm 0.01 b	291.35 \pm 53.53 ab	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.45 \pm 0.12 a	71.55 \pm 7.04 b	0.62 \pm 0.18 b	3.70 \pm 1.72 b	63.74 \pm 29.60 b	0.82 \pm 0.60 b
23 dan (dostignut nivo od 15 % SWC)											
A ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	gs ($\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2$ mol^{-1})	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2}$ s^{-1})	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}$ s^{-1})	WUE	WUEi	A/Ci \times 10^{-2}
17.23 \pm 2.61 a	0.78 \pm 0.08 a	339.27 \pm 7.27 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.34 \pm 0.08 b	132.70 \pm 12.15 a	8.06 \pm 0.60 a	2.19 \pm 0.38 b	23.71 \pm 2.71 b	5.23 \pm 0.80 a
17.69 \pm 2.73 a	0.76 \pm 0.11 a	339.20 \pm 8.36 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.31 \pm 0.12 b	136.65 \pm 14.16 a	7.99 \pm 0.54 a	2.26 \pm 0.28 b	24.66 \pm 3.29 b	5.21 \pm 0.75 a
17.06 \pm 2.28 a	0.80 \pm 0.06 a	343.45 \pm 6.86 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.36 \pm 0.11 b	133.63 \pm 12.40 a	8.45 \pm 0.77 a	2.01 \pm 0.21 b	21.31 \pm 2.97 b	4.94 \pm 0.77 a
2.08 \pm 0.80 b	0.03 \pm 0.01 b	256.06 \pm 69.44 b	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.54 \pm 0.11 a	73.46 \pm 7.73 b	0.51 \pm 0.21 b	4.55 \pm 1.97 a	98.38 \pm 46.34 a	0.92 \pm 0.39 b
2.91 \pm 1.16 b	0.03 \pm 0.01 b	229.43 \pm 44.68 b	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.60 \pm 0.11 a	78.00 \pm 8.61 b	0.61 \pm 0.18 b	5.05 \pm 1.54 a	104.23 \pm 24.10 a	1.39 \pm 0.59 b

Tretmani	A ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	gs ($\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ci ($\mu\text{mol CO}_2$ mol^{-1})	Fo	Fm	Fv/Fm	NPQ	ETR ($\mu\text{mol m}^{-2}$ s^{-1})	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}$ s^{-1})	WUE	WUEi	A/Ci \times 10^{-2}
D_T2	2.12 \pm 1.21 b	0.03 \pm 0.01 b	255.00 \pm 35.17 b	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.60 \pm 0.14 a	77.89 \pm 13.38 b	0.48 \pm 0.21 b	4.70 \pm 1.22 a	87.07 \pm 19.50 a	0.89 \pm 0.42 b
41 dan (formiranje prvih plodova)												
C	8.75 \pm 1.34 a	0.16 \pm 0.04 b	280.78 \pm 27.99 d	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.86 \pm 0.33 cd	79.83 \pm 10.01 a	3.48 \pm 1.62 a	2.35 \pm 0.74 a	51.48 \pm 8.18 a	3.00 \pm 0.37 a
C_T1	10.28 \pm 1.89 a	0.35 \pm 0.08 a	324.83 \pm 16.49 ab	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.46 \pm 0.23 e	84.01 \pm 19.23 a	6.41 \pm 2.85 a	1.77 \pm 0.75 ab	29.42 \pm 3.62 b	3.43 \pm 0.40 a
C_T2	9.10 \pm 1.97 a	0.20 \pm 0.10 ab	300.35 \pm 27.96 bcd	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.60 \pm 0.30 de	75.79 \pm 7.73 a	4.68 \pm 2.60 a	2.10 \pm 0.37 a	63.52 \pm 14.64 a	3.18 \pm 0.39 a
D	0.92 \pm 0.86 b	0.03 \pm 0.01 c	346.81 \pm 29.61 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	2.15 \pm 0.14 b	58.55 \pm 7.38 b	0.93 \pm 0.20 b	0.61 \pm 0.12 c	20.44 \pm 4.11 b	0.14 \pm 0.06 b
D_T1	0.94 \pm 0.43 b	0.03 \pm 0.01 c	336.06 \pm 42.55 ac	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	2.16 \pm 0.14 abc	64.07 \pm 18.79 ab	0.82 \pm 0.41 b	0.89 \pm 0.25 bc	28.81 \pm 7.62 b	0.23 \pm 0.10 b
D_T2	1.50 \pm 0.91 b	0.02 \pm 0.02 c	347.23 \pm 63.23 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	2.48 \pm 0.21 a	69.21 \pm 7.67 ab	0.76 \pm 0.61 b	1.73 \pm 0.70 ab	62.62 \pm 24.92 a	0.48 \pm 0.29 b
44 dan (formiranje prvih plodova)												
C	7.16 \pm 1.04a	0.09 \pm 0.01 a	259.51 \pm 24.87 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.81 \pm 0.18 ab	66.55 \pm 11.31a	1.79 \pm 0.30 a	3.83 \pm 0.35 a	74.06 \pm 4.31 a	2.71 \pm 0.27 a
C_T1	7.46 \pm 1.45a	0.12 \pm 0.05 a	275.76 \pm 21.94 a	550.00 \pm 0.00 a	3000.00 \pm 0.00 a	0.83 \pm 0.00 a	1.59 \pm 0.18 b	65.91 \pm 5.05a	2.26 \pm 0.82 a	3.55 \pm 0.35 a	68.70 \pm 9.82 ab	2.69 \pm 0.43 a

C_T2	6.54 ± 1.54a	0.08 ± 0.02 a	259.59 ± 12.33 a	550.00 ± 0.00 a	3000.00 ± 0.00 a	0.83 ± 0.00 a	1.74 ± 0.17 ab	63.22 ± 9.64a	1.53 ± 0.33 a	4.25 ± 0.19 a	80.88 ± 3.93 a	2.53 ± 0.47 ab
D	2.64 ± 0.60b	0.03 ± 0.01 b	210.40 ± 53.09 a	550.00 ± 0.00 a	3000.00 ± 0.00 a	0.83 ± 0.00 a	2.05 ± 0.12 a	72.45 ± 6.01a	0.56 ± 0.19 b	4.55 ± 0.62 a	89.68 ± 13.33 a	1.20 ± 0.20 c
D_T1	2.19 ± 0.96b	0.03 ± 0.01 b	280.79 ± 36.22 a	550.00 ± 0.00 a	3000.00 ± 0.00 a	0.83 ± 0.00 a	2.08 ± 0.21 a	67.00 ± 9.58a	0.56 ± 0.16 b	3.89 ± 0.67 a	77.61 ± 6.10 a	0.78 ± 0.17 c
D_T2	2.24 ± 0.70b	0.02 ± 0.00 b	198.11±102.24 a	550.00 ± 0.00 a	3000.00 ± 0.00 a	0.83 ± 0.00 a	2.24 ± 0.13 a	60.86 ± 5.45a	0.34 ± 0.09 b	5.61 ± 3.08 a	58.05 ± 6.35 b	1.29 ± 0.88 bc

Prilog 2.

Parametri snimani hiperspektralnom kamerom i kamerom za detekciju signala fluorescencije hlorofila pri različitim tretmanima: optimalno zalivane biljke (C), biljke izložene suši (D), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. harzianum* (C_T1), optimalno zalivane biljke u prisustvu *T. brevicompactum* (C_T2), biljke izložene suši u prisustvu *T. harzianum* (D_T1) i biljke izložene suši u prisustvu *T. brevicompactum* (D_T2).

Maksimalan kvantni prinos PS II u mraku - Fv/Fm_{lss}, nefotohemijско gašenje fluorescencije hlorofila - NPQ, koeficijent fotohemijskog gašenja - qP_{lss}, stvarna fotohemijaska efikasnost - Qy_{lss}, maksimalan kvantni prinos PS II u mraku - QY_{max}, fluorescencija hlorofila u ravnotežnom stanju - Rfd_{lss}, indeks antocijana - ANTH, indeks refleksije hlorofila a - CHLa, indeks refleksije hlorofila b - CHL b, indeks refleksije karotenoida I - CRI-1, indeks refleksije karotenoida II - CRI-2, modificovani indeks odnosa apsorpcije hlorofila I - MCARI1, vegetacijski indeks normalizovanih razlika - NDVI, jednostavni indeks odnosa vode - SR4, indeks refleksije vode-1 - WATER1 i indeks vode - WI (C).

Tretmani	Dan 9					
	C_T2	C	D_T1	C_T1	D	D_T2
Fv/Fm _{Lss}	0.442	0.444	0.444	0.444	0.446	0.453
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
NPQ _{Lss}	1.275	1.312	1.340	1.345	1.373	1.411
Std	0.023	0.021	0.019	0.020	0.021	0.021
Značajnost	a	ab	abc	abc	bc	c
qP _{Lss}	0.320	0.324	0.340	0.341	0.355	0.360
Std	0.006	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006
Značajnost	a	a	ab	ab	b	b
Qy _{Lss}	0.153	0.155	0.158	0.161	0.166	0.169
Std	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Značajnost	a	a	ab	ab	ab	b
Qy _{Max}	0.800	0.802	0.804	0.804	0.805	0.808
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
Rfd _{Lss}	1.868	1.942	1.959	1.964	2.007	2.026
Std	0.029	0.027	0.024	0.027	0.025	0.027
Značajnost	a	ab	ab	ab	b	b
ANTH	-5.496	-5.482	-5.351	-5.301	-5.299	-5.183
Std	0.120	0.106	0.106	0.096	0.106	0.102
Značajnost	a	a	a	a	a	a

CHL_a	8.738	8.792	8.882	8.884	9.082	9.122
Std	0.130	0.122	0.136	0.136	0.136	0.153
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI1	6.217	6.282	6.487	6.598	6.604	6.907
Std	0.258	0.270	0.270	0.270	0.244	0.305
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI2	6.627	6.760	6.975	6.981	7.017	7.196
Std	0.268	0.256	0.268	0.268	0.242	0.303
Značajnost	a	a	a	a	a	a
MCARI1	0.688	0.690	0.693	0.694	0.715	0.733
Std	0.020	0.018	0.016	0.017	0.018	0.018
Značajnost	a	a	a	a	a	a
NDVI	0.805	0.805	0.806	0.807	0.810	0.812
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003
Značajnost	a	a	a	a	a	a
SR4	1.058	1.062	1.066	1.068	1.069	1.076
Std	0.009	0.008	0.007	0.008	0.008	0.008
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.540	0.554	0.563	0.571	0.581	0.591
Std	0.031	0.031	0.029	0.028	0.035	0.031
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.211	1.215	1.215	1.217	1.225	1.228
Std	0.013	0.012	0.015	0.013	0.013	0.013
Značajnost	a	a	a	a	a	a

Dan 12

Tretmani	D	D_T2	C_T2	D_T1	C	C_T1
Fv/Fm_Lss	0.451	0.452	0.453	0.453	0.455	0.457
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	a	a	a
NPQ_Lss	1.249	1.303	1.367	1.368	1.386	1.409
Std	0.022	0.023	0.021	0.022	0.019	0.021
Značajnost	a	ab	bc	bc	bc	c
qP_Lss	0.391	0.404	0.405	0.416	0.422	0.431
Std	0.006	0.006	0.006	0.005	0.006	0.006
Značajnost	a	ab	ab	abc	bc	c
Qy_Lss	0.181	0.186	0.189	0.199	0.200	0.200
Std	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Max	0.825	0.825	0.826	0.826	0.827	0.829

Std	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Značajnost	a	a	a	a	a	a
Rfd_Lss	1.831	1.844	1.924	1.929	1.941	2.044
Std	0.034	0.036	0.034	0.034	0.030	0.032
Značajnost	a	a	ab	ab	ab	b
ANTH	-4.911	-4.864	-4.858	-4.734	-4.678	-4.629
Std	0.115	0.104	0.130	0.110	0.115	0.115
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CHL_a	8.755	8.786	8.861	8.929	8.994	9.201
Std	0.126	0.126	0.121	0.114	0.143	0.126
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI1	6.725	7.000	7.023	7.055	7.231	7.382
Std	0.226	0.226	0.216	0.204	0.255	0.226
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI2	7.259	7.454	7.554	7.652	7.705	7.989
Std	0.210	0.210	0.190	0.201	0.238	0.210
Značajnost	a	a	a	a	a	a
MCARI1	0.654	0.660	0.667	0.677	0.678	0.691
Std	0.017	0.017	0.020	0.017	0.016	0.017
Značajnost	a	a	a	a	a	a
NDVI	0.805	0.806	0.808	0.809	0.811	0.813
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002
Značajnost	a	a	a	a	a	a
SR4	1.089	1.108	1.109	1.110	1.110	1.117
Std	0.009	0.009	0.008	0.009	0.011	0.009
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.440	0.445	0.472	0.479	0.482	0.553
Std	0.034	0.038	0.030	0.034	0.034	0.032
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.232	1.266	1.271	1.274	1.287	1.289
Std	0.014	0.015	0.014	0.015	0.017	0.015
Značajnost	a	a	a	a	a	a
Dan 16						
Tretmani	C	C_T2	C_T1	D	D_T1	D_T2
Fv/Fm_Lss	0.483	0.486	0.488	0.498	0.500	0.501
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	b	b	b
NPQ_Lss	0.633	0.654	0.658	0.798	0.823	0.852
Std	0.021	0.020	0.020	0.018	0.020	0.019

Značajnost	a	a	a	b	b	b
qP_Lss	0.286	0.289	0.301	0.350	0.351	0.355
Std	0.007	0.007	0.007	0.007	0.006	0.007
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Lss	0.144	0.145	0.154	0.172	0.175	0.175
Std	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Max	0.841	0.841	0.842	0.843	0.843	0.843
Std	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Značajnost	a	a	ab	b	b	b
Rfd_Lss	0.917	0.946	0.961	1.141	1.142	1.231
Std	0.033	0.032	0.031	0.031	0.028	0.030
Značajnost	a	a	a	b	b	b
ANTH	-4.097	-4.097	-4.039	-4.027	-3.925	-3.820
Std	0.096	0.087	0.096	0.092	0.109	0.096
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CHL_a	8.571	8.604	8.627	8.664	8.769	9.018
Std	0.112	0.105	0.117	0.117	0.132	0.117
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI1	7.577	7.803	7.856	7.872	7.966	8.005
Std	0.225	0.254	0.215	0.225	0.202	0.225
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI2	8.131	8.181	8.350	8.372	8.477	8.560
Std	0.220	0.248	0.220	0.220	0.210	0.198
Značajnost	a	a	a	a	a	a
MCARI1	0.600	0.626	0.628	0.636	0.642	0.664
Std	0.014	0.013	0.016	0.012	0.014	0.014
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
NDVI	0.799	0.799	0.799	0.800	0.804	0.808
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002
Značajnost	a	a	a	a	a	a
SR4	1.138	1.148	1.150	1.156	1.156	1.178
Std	0.015	0.015	0.017	0.014	0.015	0.013
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.356	0.409	0.417	0.429	0.461	0.477
Std	0.041	0.046	0.052	0.044	0.046	0.046
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.294	1.298	1.314	1.320	1.330	1.343
Std	0.020	0.020	0.019	0.023	0.020	0.018

Značajnost	a	a	a	a	a	a
Dan 19						
Tretmani	C	C_T2	C_T1	D_T1	D	D_T2
Fv/Fm_Lss	0.488	0.489	0.494	0.512	0.515	0.521
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	b	b	b
NPQ_Lss	0.473	0.485	0.500	0.732	0.742	0.780
Std	0.017	0.016	0.016	0.014	0.015	0.016
Značajnost	a	a	a	b	b	b
qP_Lss	0.262	0.266	0.271	0.344	0.346	0.346
Std	0.006	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Lss	0.135	0.139	0.139	0.169	0.172	0.172
Std	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Max	0.842	0.842	0.843	0.845	0.846	0.846
Std	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Rfd_Lss	0.683	0.717	0.722	1.050	1.051	1.063
Std	0.025	0.024	0.024	0.021	0.022	0.024
Značajnost	a	a	a	b	b	b
ANTH	-3.960	-3.932	-3.890	-3.508	-3.473	-3.292
Std	0.126	0.120	0.113	0.126	0.126	0.142
Značajnost	a	a	a	ab	ab	b
CHL_a	8.503	8.563	8.585	8.622	8.636	8.923
Std	0.146	0.116	0.129	0.123	0.129	0.129
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI1	8.384	8.544	8.727	9.322	9.575	9.885
Std	0.345	0.390	0.345	0.330	0.311	0.345
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
CRI2	8.645	8.954	8.954	10.053	10.337	10.619
Std	0.321	0.321	0.363	0.307	0.289	0.321
Značajnost	a	ab	ab	bc	c	c
MCARI1	0.550	0.556	0.568	0.577	0.581	0.582
Std	0.018	0.016	0.015	0.016	0.016	0.015
Značajnost	a	a	a	a	a	a
NDVI	0.791	0.792	0.794	0.794	0.795	0.802
Std	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b

SR4	1.179	1.186	1.187	1.200	1.206	1.208
Std	0.012	0.013	0.012	0.011	0.012	0.011
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.351	0.376	0.383	0.383	0.385	0.389
Std	0.034	0.035	0.040	0.035	0.032	0.035
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.335	1.338	1.339	1.344	1.349	1.353
Std	0.013	0.017	0.015	0.015	0.015	0.014
Značajnost	a	a	a	a	a	a

Dan 23

Tretmani	C_T1	C_T2	C	D	D_T1	D_T2
Fv/Fm_Lss	0.492	0.494	0.494	0.527	0.530	0.534
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	b	b	b
NPQ_Lss	0.438	0.466	0.496	0.769	0.778	0.791
Std	0.020	0.019	0.018	0.018	0.017	0.016
Značajnost	a	a	a	b	b	b
qP_Lss	0.282	0.292	0.292	0.380	0.385	0.398
Std	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Lss	0.153	0.155	0.157	0.189	0.189	0.199
Std	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Max	0.841	0.842	0.843	0.849	0.850	0.851
Std	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Značajnost	a	ab	b	c	c	c
Rfd_Lss	0.657	0.709	0.737	1.125	1.131	1.157
Std	0.023	0.022	0.021	0.020	0.021	0.019
Značajnost	a	a	a	b	b	b
ANTH	-4.301	-4.279	-3.992	-2.665	-2.639	-2.568
Std	0.103	0.097	0.108	0.108	0.108	0.122
Značajnost	a	a	a	b	b	b
CHL_a	8.519	8.544	8.779	9.012	9.186	9.311
Std	0.138	0.122	0.122	0.122	0.110	0.117
Značajnost	a	a	ab	abc	bc	c
CRI1	8.142	8.185	8.466	11.333	11.939	12.663
Std	0.484	0.428	0.428	0.428	0.386	0.409
Značajnost	a	a	a	b	b	b

CRI2	8.352	8.376	8.584	11.915	12.352	13.130
Std	0.477	0.422	0.422	0.422	0.380	0.403
Značajnost	a	a	a	b	b	b
MCARI1	0.514	0.522	0.531	0.533	0.555	0.559
Std	0.021	0.019	0.019	0.018	0.019	0.017
Značajnost	a	a	a	a	a	a
NDVI	0.792	0.792	0.797	0.798	0.801	0.803
Std	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	ab	ab	ab	b
SR4	1.194	1.196	1.216	1.230	1.236	1.244
Std	0.009	0.009	0.010	0.008	0.008	0.009
Značajnost	a	ab	abc	bc	c	c
WATER1	0.340	0.342	0.346	0.379	0.389	0.413
Std	0.023	0.026	0.029	0.025	0.026	0.026
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.328	1.329	1.338	1.344	1.349	1.353
Std	0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.010
Značajnost	a	a	a	a	a	a

Dan 26

Tretmani	C_T1	C_T2	D	C	D_T1	D_T2
Fv/Fm_Lss	0.498	0.499	0.505	0.509	0.511	0.515
Std	0.003	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004
Značajnost	a	a	ab	ab	ab	b
NPQ_Lss	0.608	0.729	0.756	1.055	1.108	1.117
Std	0.057	0.053	0.053	0.047	0.053	0.049
Značajnost	a	a	a	b	b	b
qP_Lss	0.508	0.529	0.584	0.600	0.611	0.655
Std	0.055	0.052	0.052	0.049	0.046	0.052
Značajnost	a	a	a	a	a	a
Qy_Lss	0.260	0.272	0.301	0.301	0.311	0.339
Std	0.027	0.026	0.026	0.024	0.023	0.026
Značajnost	a	a	a	a	a	a
Qy_Max	0.817	0.820	0.821	0.822	0.824	0.827
Std	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.003
Značajnost	a	a	a	a	a	a
Rfd_Lss	1.170	1.465	1.613	1.907	2.088	2.186
Std	0.156	0.145	0.145	0.128	0.138	0.145
Značajnost	a	ab	abc	bc	c	c
ANTH	-5.034	-4.968	-4.760	-2.273	-2.048	-2.046

Std	0.100	0.095	0.105	0.105	0.119	0.105
Značajnost	a	a	a	b	b	b
CHL_a	8.169	8.180	8.610	9.819	9.905	9.947
Std	0.142	0.161	0.142	0.142	0.128	0.136
Značajnost	a	a	a	b	b	b
CRI1	7.278	7.310	8.016	12.628	13.043	14.023
Std	0.496	0.561	0.496	0.496	0.447	0.475
Značajnost	a	a	a	b	b	b
CRI2	7.457	7.587	8.099	12.696	13.064	14.051
Std	0.536	0.474	0.474	0.474	0.428	0.453
Značajnost	a	a	a	b	b	b
MCARI1	0.461	0.463	0.470	0.559	0.594	0.603
Std	0.027	0.024	0.024	0.023	0.021	0.024
Značajnost	ab	a	ab	bc	c	c
NDVI	0.783	0.784	0.793	0.811	0.813	0.813
Std	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Značajnost	a	a	a	b	b	b
SR4	1.161	1.185	1.202	1.202	1.235	1.236
Std	0.027	0.027	0.037	0.027	0.016	0.027
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.397	0.422	0.428	0.483	0.548	0.566
Std	0.042	0.097	0.072	0.072	0.072	0.072
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.255	1.268	1.272	1.311	1.318	1.326
Std	0.030	0.030	0.030	0.040	0.030	0.017
Značajnost	a	a	a	a	a	a

Dan 31

Tretmani	C_T1	C_T2	D	C	D_T1	D_T2
Fv/Fm_Lss	0.485	0.486	0.488	0.512	0.515	0.520
Std	0.003	0.003	0.003	0.003	0.005	0.004
Značajnost	a	a	a	b	b	b
NPQ_Lss	0.554	0.577	0.595	0.888	0.907	0.908
Std	0.044	0.049	0.057	0.040	0.043	0.039
Značajnost	a	a	a	b	b	b
qP_Lss	0.319	0.334	0.350	0.438	0.456	0.463
Std	0.014	0.016	0.018	0.014	0.013	0.013
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Lss	0.167	0.171	0.173	0.214	0.220	0.223
Std	0.009	0.007	0.008	0.007	0.006	0.006

Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Max	0.836	0.837	0.841	0.847	0.850	0.851
Std	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Značajnost	a	ab	bc	cd	d	d
Rfd_Lss	0.787	0.813	0.829	1.235	1.303	1.313
Std	0.057	0.066	0.050	0.050	0.045	0.045
Značajnost	a	a	a	b	b	b
ANTH	-4.804	-4.699	-4.096	-2.109	-2.096	-1.881
Std	0.267	0.267	0.289	0.289	0.402	0.365
Značajnost	a	a	a	b	b	b
CHL_a	8.370	8.416	8.874	9.954	10.519	10.617
Std	0.679	0.616	0.488	0.488	0.452	0.452
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI1	8.591	9.302	9.539	12.002	13.900	14.572
Std	1.141	1.035	0.819	0.819	0.759	0.759
Značajnost	a	a	a	ab	b	b
CRI2	9.258	10.047	10.296	12.820	14.439	14.938
Std	1.158	0.832	1.051	0.832	0.770	0.770
Značajnost	a	a	a	ab	b	b
MCARI1	0.380	0.418	0.426	0.587	0.601	0.642
Std	0.053	0.058	0.042	0.039	0.039	0.042
Značajnost	a	abc	ab	bcd	cd	d
NDVI	0.787	0.787	0.799	0.811	0.815	0.818
Std	0.008	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006
Značajnost	a	a	ab	ab	ab	b

Dan 40

Tretmani	D_T2	D_T1	D	C_T1	C_T2	C
Fv/Fm_Lss	0.465	0.474	0.480	0.570	0.575	0.575
Std	0.007	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005
Značajnost	a	a	a	b	b	b
NPQ_Lss	0.716	0.800	0.801	0.897	0.954	1.011
Std	0.024	0.025	0.027	0.028	0.030	0.036
Značajnost	a	ab	ab	bc	c	c
qP_Lss	0.660	0.704	0.757	0.877	0.882	0.888
Std	0.018	0.017	0.021	0.015	0.015	0.016
Značajnost	a	ab	b	c	c	c
Qy_Lss	0.321	0.343	0.357	0.485	0.491	0.511
Std	0.010	0.009	0.012	0.008	0.009	0.008
Značajnost	a	a	a	b	b	b

Qy_Max	0.783	0.784	0.787	0.810	0.812	0.815
Std	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Rfd_Lss	1.654	1.689	1.889	2.274	2.280	2.340
Std	0.054	0.049	0.064	0.044	0.044	0.048
Značajnost	a	a	a	b	b	b
ANTH	-3.384	-3.224	-3.195	-2.594	-2.427	-2.261
Std	0.206	0.206	0.223	0.223	0.310	0.282
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
CHL_a	8.388	8.754	8.941	9.062	9.386	9.960
Std	0.439	0.474	0.439	0.599	0.660	0.474
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI1	10.848	11.479	12.089	12.634	12.677	13.203
Std	1.256	1.163	1.163	1.256	1.749	1.587
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI2	12.180	12.807	12.959	13.040	13.455	13.655
Std	1.227	1.136	1.708	1.227	1.136	1.549
Značajnost	a	a	a	a	a	a
MCARI1	0.332	0.351	0.420	0.519	0.540	0.569
Std	0.059	0.065	0.046	0.043	0.043	0.046
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
NDVI	0.777	0.781	0.782	0.797	0.805	0.812
Std	0.008	0.008	0.008	0.011	0.012	0.008
Značajnost	a	ab	ab	ab	ab	b
SR4	1.276	1.291	1.292	1.293	1.314	1.320
Std	0.014	0.019	0.015	0.021	0.014	0.015
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.316	0.323	0.331	0.331	0.340	0.353
Std	0.013	0.012	0.012	0.018	0.013	0.017
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WI	1.323	1.324	1.337	1.339	1.350	1.353
Std	0.009	0.012	0.009	0.009	0.009	0.013
Značajnost	a	a	a	a	a	a

Dan 47

Tretmani	C	C_T2	C_T1	D_T2	D	D_T1
Fv/Fm_Lss	0.453	0.459	0.461	0.483	0.487	0.490
Std	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003
Značajnost	a	a	a	b	b	b

NPQ_Lss	0.606	0.683	0.699	0.973	0.988	1.012
Std	0.028	0.024	0.022	0.022	0.019	0.019
Značajnost	a	a	a	b	b	b
qP_Lss	0.296	0.297	0.320	0.444	0.450	0.479
Std	0.018	0.014	0.016	0.013	0.014	0.013
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Lss	0.142	0.145	0.155	0.202	0.207	0.221
Std	0.008	0.006	0.007	0.006	0.005	0.005
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Qy_Max	0.811	0.814	0.814	0.842	0.843	0.845
Std	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002
Značajnost	a	a	a	b	b	b
Rfd_Lss	0.770	0.860	0.874	1.362	1.399	1.406
Std	0.041	0.035	0.031	0.031	0.028	0.028
Značajnost	a	a	a	b	b	b
ANTH	-2.554	-2.243	-2.208	-2.149	-1.892	-1.776
Std	0.240	0.172	0.217	0.159	0.172	0.159
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CHL_a	6.396	7.183	7.348	9.034	9.250	10.081
Std	0.393	0.424	0.393	0.536	0.424	0.591
Značajnost	a	ab	ab	bc	c	c
CRI1	7.752	8.073	8.681	11.200	11.676	12.296
Std	0.908	0.981	0.908	1.365	0.981	1.239
Značajnost	a	a	a	a	a	a
CRI2	10.885	11.361	11.784	11.862	12.489	13.146
Std	0.943	1.018	0.943	1.418	1.018	1.286
Značajnost	a	a	a	a	a	a
MCARI1	0.357	0.402	0.440	0.480	0.493	0.500
Std	0.055	0.043	0.060	0.040	0.040	0.043
Značajnost	a	a	a	a	a	a
NDVI	0.720	0.740	0.742	0.799	0.804	0.810
Std	0.008	0.008	0.008	0.011	0.008	0.012
Značajnost	a	a	a	b	b	b
SR4	1.310	1.330	1.331	1.338	1.340	1.354
Std	0.019	0.019	0.020	0.019	0.023	0.025
Značajnost	a	a	a	a	a	a
WATER1	0.318	0.321	0.344	0.355	0.376	0.392
Std	0.034	0.032	0.026	0.026	0.026	0.028
Značajnost	a	a	a	a	a	a

WI	1.284	1.287	1.302	1.309	1.314	1.328
Std	0.011	0.012	0.011	0.011	0.014	0.015
Značajnost	a	a	a	a	a	a

Biografija autora

Igor D. Vukelić rođen je 1988. godine u Novom Sadu gde je završio osnovnu školu i gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj”. Diplomirao je 2013. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, na Departmanu za biologiju i ekologiju. Na istom departmanu 2014. godine završio je master studije sa prosečnom ocenom 10,00 i ocenom 10 na master radu: „Varijabilnost n-alkana kod cijanobakterija izolovanih iz bioloških lesnih pokorica kao odgovor na fiziološki stres izazvan sušom i UV zračenjem”. Doktorske studije molekularne biologije na modulu Molekularna biologija prokariota Univerziteta u Beogradu upisuje 2015. godine. Od 2017. godine zaposlen je na Fakultetu ekološke poljoprivrede, Univerziteta Educons, a od 2019. godine kao asistent. Izvodi praktičnu nastavu na predmetima Osnovi biohemije, Biotehnologija u zaštiti životne sredine i Agrobiotehnologija.

Učestvovao je na projektu prekogranične saradnje IPA, projektu Horizon 2020, projektu Višegradske fondacije, Erasmus+ projektu kao i na dva projekta Autonomne pokrajine Vojvodine. Trenutno je angažovan na jednom Erasmus+ projektu, jednom bilateralnom projektu i na dva projekta Autonomne pokrajine Vojvodine. Autor je i koautor dva naučna rada u časopisima kategorije M21 i preko dvadeset naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima sa recenzijom i u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova. Koautor je tehničkog rešenja iz kategorije M82 pod nazivom „Biostimulator na bazi *Trichoderma harzianum* za primenu u povrtarskoj proizvodnji”. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Игор Д. Вукелић

број индекса М3014/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларно - физиолошки механизми интеракције парадајза (*Solanum lycopersicum* L.) и одабраних изолата гљива рода *Trichoderma*

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Игор Д. Вукелић

Број индекса M3014/2015

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Молекуларно - физиолошки механизми интеракције парадајза (*Solanum lycopersicum* L.) и одабраних изолата гљива рода *Trichoderma*

Ментор проф. др Дејана Панковић и проф. др Светлана Радовић

Потписани/а Игор Д. Вукелић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Молекуларно - физиолошки механизми интеракције парадајза (*Solanum lycopersicum* L.) и одабраних изолата гљива рода *Trichoderma*

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

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