

ACADEMIA ROMÂNĂ
ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI



TEZĂ DE DOCTORAT
-REZUMAT-

**Combaterea biologică a ciupercii patogene *Fusarium oxysporum* cu ajutorul tulpinilor de *Trichoderma sp.*
– abordare moleculară –**

Coordonator științific:

Prof. dr. Octavian POPESCU

Doctorand:

Ing. Alexandru PAICA

București 2020

Cuprins

Mulțumiri	5
Listă tabele	6
Listă figuri	7
Listă abrevieri	9
Capitolul 1. Importanța și istoricul cercetărilor în domeniu	10
A. Antibioza	11
B. Competiția pentru spațiu și nutrienți	12
C. Micoparazitismul	12
1.1. <i>Trichoderma spp.</i>	13
1.1.1. Taxonomia genului <i>Trichoderma</i>	13
1.1.2. Morfologia genului <i>Trichoderma</i>	14
1.1.2.1. Caracteristici macroscopice	14
1.1.2.2. Caracteristici microscopice	15
1.1.3. Identificarea speciilor de <i>Trichoderma</i> cu tehnica <i>DNA barcoding</i>	18
1.1.3.1. Identificarea tulpinilor de biocontrol din genul <i>Trichoderma</i>	20
1.1.4. Evoluția moleculară a chitinazelor la genul <i>Trichoderma</i>	24
1.1.4.1. Filogenia și evoluția familiei de gene GH18 la genul <i>Trichoderma</i>	27
1.1.5. Utilizarea tulpinilor de <i>Trichoderma spp.</i> în stimularea creșterii plantelor	28
1.1.5.1. Mecanismele stimulării creșterii plantelor	30
1.2. Scopul și obiectivele tezei de doctorat	34
1.3. Structura tezei	34
Capitolul 2. Cercetări privind evaluarea și selecția tulpinilor de <i>Trichoderma spp.</i> utilizate în combaterea biologică a ciupercii fitopatogene <i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>	35
2.1. Introducere	35
2.2. Materiale și metode	37
2.2.1. Identificarea moleculară a izolatelor de <i>Trichoderma spp.</i>	37
2.2.1.1. Izolatele de <i>Trichoderma spp.</i>	37
2.2.1.2. Condițiile de cultivare	37
2.2.1.3. Extracția și purificarea ADN-ului genomic	37
2.2.1.4. Cuantificarea ADN-ului extras	38
2.2.1.4.1. Electroforeză în gel de agaroză	38
2.2.1.4.2. Spectrofotometrie în UV	38
2.2.1.5. PCR (Reacția în lanț a polimerazei)	39
2.2.1.6. Purificarea din gelul de agaroză și analiza secvențelor de ADN	40
2.2.2. Interrelații <i>in vitro</i> dintre <i>Trichoderma spp.</i> și diferite ciuperci fitopatogene, exprimate prin coeficientul <i>X</i>	42
2.2.3. Screening-ul unor tulpini de <i>Trichoderma spp.</i> pentru producerea de enzime hidrolitice	42

2.3. Rezultate și discuții	44
2.3.1. Identificarea moleculară a izolatelor de <i>Trichoderma spp.</i>	44
2.3.2. Interrelații <i>in vitro</i> dintre <i>Trichoderma spp.</i> și diferite ciuperci fitopatogene, exprimate prin coeficientul X	46
2.3.3. <i>Screening</i> -ul unor tulpini de <i>Trichoderma spp.</i> pentru producerea de enzime hidrolitice	48
Capitolul 3. Studiul activității chitinazice a diferitelor tulpini de <i>Trichoderma spp.</i> în prezența infecției cu <i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>	50
3.1. Introducere	50
3.2. Materiale și metode	51
3.2.1. Evaluarea activității chitinazice a tulpinilor de <i>Trichoderma spp.</i>	51
3.2.2. Evaluarea exprimării genelor responsabile de activitatea chitinazelor în cultura de tomate	52
3.2.2.1. Materialul biologic	53
3.2.2.2. Izolarea ARN-ului total	53
3.2.2.3. Revers-Transcrierea și Real-Time PCR (RT-qPCR)	54
3.2.2.4. Analiza exprimării genelor	55
3.3. Rezultate și discuții	56
3.3.1. Evaluarea activității chitinazice a tulpinilor de <i>Trichoderma spp.</i>	56
3.3.2. Evaluarea exprimării genelor responsabile de activitatea chitinazelor în cultura de tomate	58
Capitolul 4. Stimularea creșterii plantelor de tomate cu ajutorul diferitelor tulpini de <i>Trichoderma spp.</i> în prezența și în absența infecției cu <i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>	60
4.1. Introducere	60
4.2. Materiale și metode	62
4.2.1. Determinarea pigmentilor asimilatori și fenolilor totali	64
4.2.2. Determinarea calitativă și cantitativă a fosfaților solubili	64
4.2.3. Cuantificarea acidului indol-3-acetic (IAA) produs de tulpinile de <i>Trichoderma spp.</i>	65
4.3. Rezultate și discuții	66
Capitolul 5.	78
5.1. Concluzii	78
5.2. Originalitatea tezei	80
5.3. Perspective de dezvoltare ulterioară	82
Lista lucrărilor publicate din domeniul tezei	83
Lista proiectelor de cercetare	84
Bibliografie	85

MULȚUMIRI

Acum, la finalul stagiului doctoral, sunt marcat de sentimente de fericire și împlinire care provin din mulțumirea profesională și personală a studiilor duse la bun sfârșit. Elaborarea, finalizarea și susținerea acestei teze de doctorat ar fi fost imposibilă fără implicarea și ajutorul mai multor persoane deosebite cărora doresc să le adresez câteva cuvinte de mulțumire.

În primul rând, doresc să adresez alee mulțumiri coordonatorului meu științific, Prof. Dr. Octavian POPESCU, pentru încredere, pentru îndrumarea științifică, pentru răbdarea, încurajarea și înțelegerea acordate de-a lungul perioadei de pregătire și elaborare a tezei.

Ideea tezei și primele experimente au prins contur în timpul activității mele ca cercetător în Laboratorul de Organisme Utile din ICDPP, București. Mulțumirile mele se îndreaptă către colegii care m-au ajutat și în special doamnei dr. Cristina PETRIȘOR îi mulțumesc pentru colaborarea deschisă, pentru efortul depus pe tot parcursul cercetărilor și pentru sfaturile constructive în redactarea acestei lucrări. Țin să mulțumesc doamnei dr. Florica CONSTANTINESCU pentru sprijinul profesional necesar pentru demararea acestui demers. De asemenea, doamnei dr. Oana BOIU-SICUIA și domnului Jozsef DAN care m-au ajutat la obținerea și caracterizarea morfologică a unora din tulpinile utilizate în această teză.

Evaluarea exprimării genei *chit26* prin qPCR a fost realizată în laboratorul Departamentului de Citobiologie Vegetală și Animală din cadrul IBB. A fost o onoare să colaborez cu colectivul acestui laborator.

Doresc să adresez mulțumiri colectivului din Centrul de Biologie Moleculară, ICI-BNS, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, în special doamnei dr. Beatrice KELEMEN pentru ajutorul acordat în identificarea moleculară a tulpinilor de *Trichoderma spp.*

În continuare doresc să îmi exprim recunoștința față de domnul dr. Adrian PETICILĂ pentru ajutorul în cultivarea plantelor de tomate.

Mulțumesc Școlii de Studii Avansate a Academiei Române pentru sprijinul financiar acordat pe parcursul stagiului de studii doctorale (2014-2017).

De asemenea, vreau să mulțumesc părinților mei pentru sprijinul permanent și pentru că au subliniat întotdeauna importanța unei bune educații.

În final, vreau să mulțumesc în mod special soției mele Ioana PAICA pentru dragostea necondiționată și pentru că fost alături de mine ori de câte ori a fost nevoie, mai ales în momentele în care reușita analizelor genetice părea un lucru imposibil de atins. Doresc să-i mulțumesc în mod deosebit pentru ajutorul și efortul depus în evaluarea exprimării genei *chit26* prin qPCR.

Capitolul 1

Importanța și istoricul cercetărilor în domeniu

Pesticidele, inclusiv fungicidele, au făcut obiectul unor critici substanțiale în ultimii ani din cauza efectelor adverse asupra mediului înconjurător cu consecințe grave pentru sănătatea omului și a altor organisme non-țintă. Prin urmare, dezvoltarea unor metode de combatere alternative, mai sigure și „prietenoase” față de mediul înconjurător, a devenit o prioritate absolută. În acest context, combaterea biologică a dăunătorilor devine o ramură importantă a agriculturii.

Genul *Trichoderma spp.* a fost introdus în literatura micologică de Christian Hendrik Peerson (1794). Anumiți membri ai genului *Trichoderma spp.* au diferite caracteristici benefice și sunt utilizați ca surse pentru o gamă de enzime hidrolitice cu importanță industrială sau ca agenți de biocontrol față de ciupercile fitopatogene ale plantelor (Harman și Björkman, 1998; Howell, 2003; Harman și colab., 2004; Howell, 2007; Kumar și colab., 2008; Viterbo și Horwitz, 2010; Hermosa și colab., 2012; Seiboth și colab., 2012). Totodată, alte specii pot provoca chiar infecții letale la om, în special la pacienții cu imunodeficiență (Summerbell, 2003; Kredics și colab., 2011; Hatvani și colab., 2013) sau sunt agenții cauzali ai mucegaiului verde la ciupercile cultivate (Samuels și colab., 2002; Park și colab., 2006; Hatvani și colab., 2007; Komon-Zelazowska și colab., 2007).

Din cauza multipleror utilizări ale speciilor de *Trichoderma spp.*, identificarea corectă a izolatelor este esențială la toate grupele menționate mai sus. În trecut, au fost identificate specii de *Trichoderma spp.* exclusiv pe baza caracteristicilor morfologice (Summerbell, 2003; Gams și Bissett, 1998).

Totuși, identificarea pe baza caracterelor morfologice este dificilă și necesită o expertiză, putând duce cu ușurință la rezultate eronate. Prin urmare, aplicarea de tehnici biochimice și moleculare este recomandată pentru a confirma identificarea la nivel de specie ale izolatelor de *Trichoderma spp.*

Anumite tehnici moleculare, cum ar fi amprentarea ADN (Arisan-Atac și colab., 1995) sau analiza secvenței de ADN ribozomal a regiunii *ITS* (*Internal Transcribed Spacer*) [*ITS 1* – între genele pentru ARNr 18S și 5,8S și *ITS 2* – între genele pentru ARNr 5,8S și 28S (25S la plante)], precum și a fragmentelor de gene care codifică factorul de elongare 1- α (*translation elongation factor 1 – tef1*), endochitinaza (*chi18-5*, cunoscută anterior ca *ech42*),

subunitatea II a ARN polimerazei (*rpb2*), calmodulina 1 (*cal1*) (Kullnig-Gradinger și colab., 2002; Druzhinina și colab., 2008) sunt adecvate pentru a da un diagnostic precis, eliminându-se astfel problemele de morfologie în identificarea speciilor.

Pentru identificarea speciilor de *Trichoderma* / *Hypocrea* cu ajutorul tehnicii de *DNA barcoding*, Druzhinina și colab. (2005) au introdus prima bază de date online, **TrichOKey**, folosind coduri de bare oligonucleotidice, disponibile pe site-ul Subcomisiei Internaționale de Taxonomie privind *Trichoderma* și *Hypocrea* (<http://www.trichoderma.info>). Numeroase tulpini de *Trichoderma* aparținând diferitelor specii au fost descoperite ca potențiali agenți de biocontrol ai dăunătorilor agricoli.

Baza structurală a peretelui celular al fungilor este compusă din chitină, un homopolimer format din unități de *N*-acetil-glucozamină cu legături glicozidice $\beta 1 \rightarrow 4$ și $\beta 1 \rightarrow 3$. Deși chitina este localizată la interiorul peretelui celular, adică adiacent membranei plasmatică, degradarea acesteia pare a fi un aspect vital în interacțiunile fungilor cu plantele.

Chitinazele sunt secretate de plante în cadrul răspunsului de apărare contra fungilor patogeni (Huub și colab., 1991; van Loon și colab., 1998; Datta și Muthukrishnan, 1999; Leubner-Metzger și Meins Jr., 1999; van Loon și van Strien, 1999). Chito-oligozaharidele, eliberate în acest mod din peretele celular al fungilor, pot la rândul lor activa răspunsul de apărare contra fungilor în plante.

Implicarea chitinazelor în atacul micoparazitic este un mecanism important care a fost tema multor cercetări. S-a descoperit că o serie de gene pentru chitinaze sunt puternic induse în micoparazitism, de exemplu, *ech42*, *chit33* și *chit36* (Carsolio și colab., 1994; Mach și colab., 1999; Zeilinger și colab., 1999; de las Mercedes Dana și colab., 2001; Viterbo și colab., 2002). De asemenea, s-a arătat că *N*-acetil-glucozaminidaza Nag1 este puternic indusă în micoparazitism (Mach și colab., 1999; Zeilinger și colab., 1999).

Stimularea creșterii de către tulpinile de *Trichoderma spp.* a fost observată la un număr mare de grupuri diferite de plante, inclusiv legume, culturi de câmp, plante ornamentale și culturile forestiere. O mare parte din cercetările realizate până acum s-au axat pe culturile de legume de seră, de exemplu: castraveți (*Cucumis sativus*), fasole (*Phaseolus vulgaris*), vinete (*Solanum melongena*), salată verde (*Lactuca sativa*), mazăre (*Pisum sativum*), ridichi (*Raphanus sativus*), ardei (*Capsicum annuum*) și roșii (*Solanum lycopersicum*) (Chang și colab., 1986; Paulitz și colab., 1986; Baker, 1988; Lynch și colab., 1991; Kleifeld și Chet, 1992; Ousley și colab., 1993; 1994a; 1994b; El-Mohamedy și El-

Baky, 2008). Răsadurile tratate cu *Trichoderma spp.* au fost mai bine dezvoltate, mai viguroase și au avut un conținut de clorofilă mai mare.

Stimularea creșterii plantelor a fost asociată cu tulpinile următoarelor specii de *Trichoderma spp.* raportate pentru a stimula creșterea plantelor: *T. longipile* și *T. tomentosum* (Rabeendran și colab., 2000), *T. harzianum* (Chang și colab., 1986; Inbar și colab., 1994; Perveen și Bokhari, 2012), *T. viride* (Ousley și colab., 1993; 1994b; Perveen și Bokhari, 2012), *T. koningii* (Windham și colab., 1986; Samuels și colab., 2006), *T. asperellum* (Li și colab., 2018), *T. atroviride* (Colla și colab., 2015) și *T. stromaticum* (De Souza și colab., 2008).

Cu toate acestea, în cadrul unei singure specii de *Trichoderma spp.*, nu toate izolatele sunt capabile de a stimula creșterea plantelor. De exemplu, diferitele tulpini de *Trichoderma harzianum* sau *T. viride* au dat diferite efecte de stimulare a creșterii pe mai multe plante gazdă (Ousley și colab., 1993, 1994b).

1.2. Scopul și obiectivele tezei de doctorat

- Identificarea moleculară a tulpinilor de *Trichoderma spp.* pe baza secvențelor *ITS* și *eEF1a1*
- Studiul antagonismului dintre *Trichoderma spp.* și diferite ciuperci fitopatogene din genul *Fusarium*
- *Screening*-ul unor tulpini de *Trichoderma spp.* pentru producerea de enzime hidrolitice
- Evaluarea exprimării genelor responsabile de activitatea chitinazelor în cultura de tomate
- Stimularea creșterii plantelor de tomate cu ajutorul unor tulpini de *Trichoderma spp.* în prezența și în absența infecției cu *Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici*

1.3. Structura tezei

Teza este structurată în două părți: studiu din literatură (Capitolul 1) și partea de contribuții personale formată din 3 capitole (Capitolul 2 – Capitolul 4), fiecare capitol reprezentând unul din obiectivele tezei.

Fiecare capitol din cea de a doua parte a tezei cuprinde:

- o introducere pe tematica analizată;
- materiale și metode utilizate în cadrul studiului;
- rezultate și discuții;

Concluziile sunt formulate într-un capitol separat (Capitolul 5).

Lista completă de referințe este prezentată la sfârșitul tezei.

Capitolul 2

Cercetări privind evaluarea și selecția tulpinilor de *Trichoderma spp.* utilizate în combaterea biologică a ciupercii fitopatogene *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*

2.1 Identificarea moleculară a izolatelor de *Trichoderma spp.*

Cele șase tulpini de *Trichoderma spp.* colectate în vederea selectării ca agenți de combatere biologică sau stimulator de creștere al plantelor, au fost identificate la nivel de specie (Samuels și colab., 2009; Chaverri și colab., 2015). Pentru aceasta au fost obținute secvențele *ITS 1*, *ITS 2* și *eEF1a1*, pentru toate tulpinile selectate.

Secvențele FASTA au fost analizate cu ajutorul *TrichOKey 2.0* (Druzhinina și Kubicek, 2005; Druzhinina și colab., 2005; Druzhinina și Kopchinskiy, 2006) și *TrichoBLAST* (Kopchinskiy și colab., 2005), instrumente disponibile online la <http://www.trichoderma.info>.

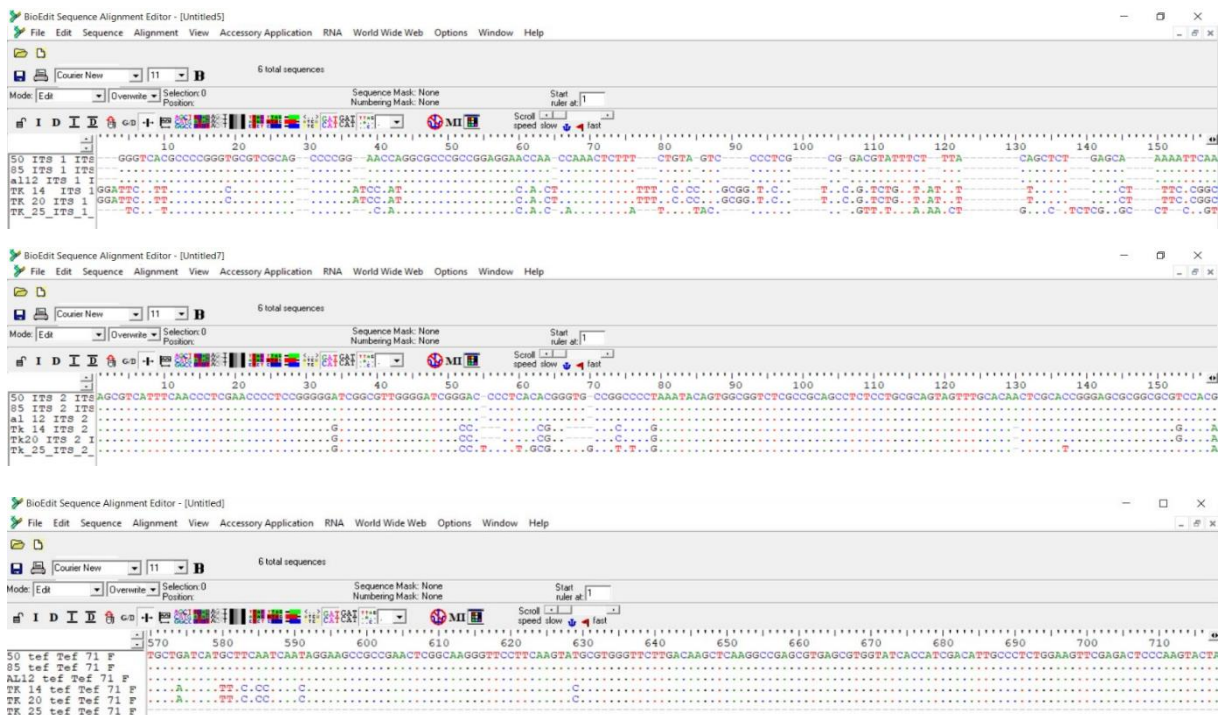


Figura 2.1. Alinierea și analiza secvențelor *ITS* și *eEF1a1* realizate cu ajutorul *BioEdit*, *TrichOKey v2.0* și *TrichoBLAST* (<http://www.trichoderma.info>).

Analiza secvenței regiunilor *ITS 1* și *ITS 2* și a genei *eEF1a1* a permis identificarea tulpinilor care aparțin la două specii: *Trichoderma asperellum* și *Trichoderma longibrachiatum*.

O analiză filogenetică a secvențelor *eEF1a1*, corespunzătoare celor șase tulpini, a fost efectuată utilizând pachetul MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*) prin metoda UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) (Fig. 2.2).

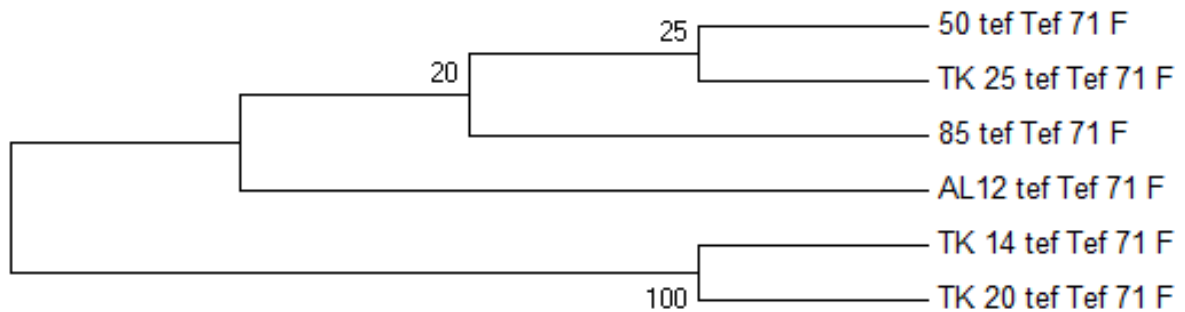


Figura 2.2. Arborele filogenetic al tulpinilor de *Trichoderma spp.* pe baza secvențelor *eEF1a1* realizat prin UPGMA; Bootstrap 200.

2.2. Interrelații *in vitro* dintre *Trichoderma spp.* și diferite ciuperci fitopatogene, exprimate prin coeficientul *X*

Pentru aprecierea gradului de antagonism prin metoda culturilor duble a fost testată pe mediul CGA comportarea tulpinilor de *Trichoderma spp.* față de trei tulpini de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium solani*). Rezultatele obținute sunt prezentate mai jos (Fig. 2.3).

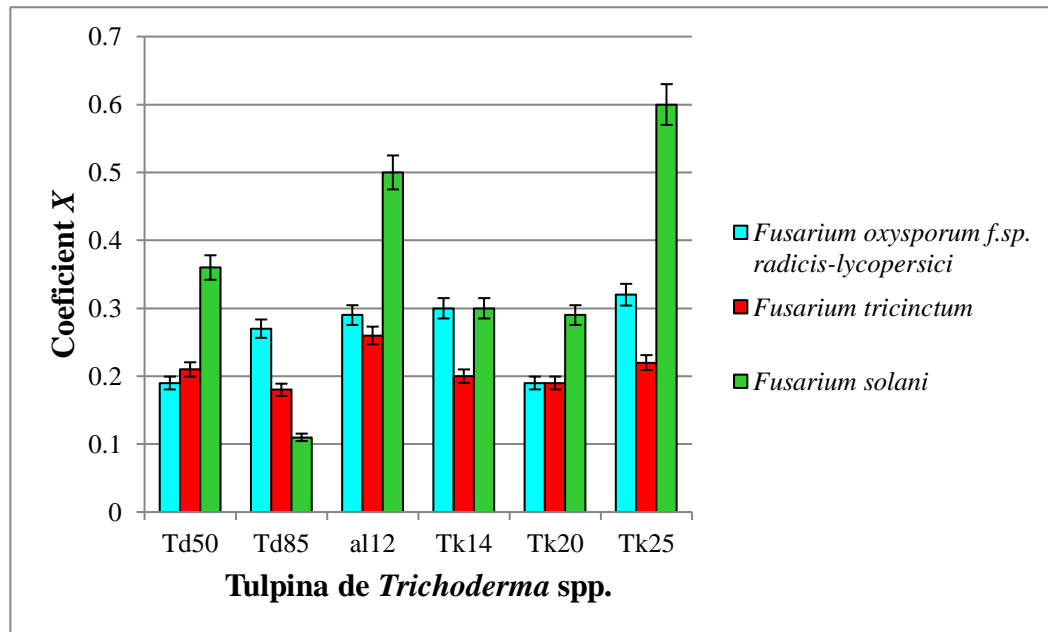


Figura 2.3. Antagonismul dintre șase tulpini de *Trichoderma spp.* și trei specii de ciuperci fitopatogene din genul *Fusarium*.

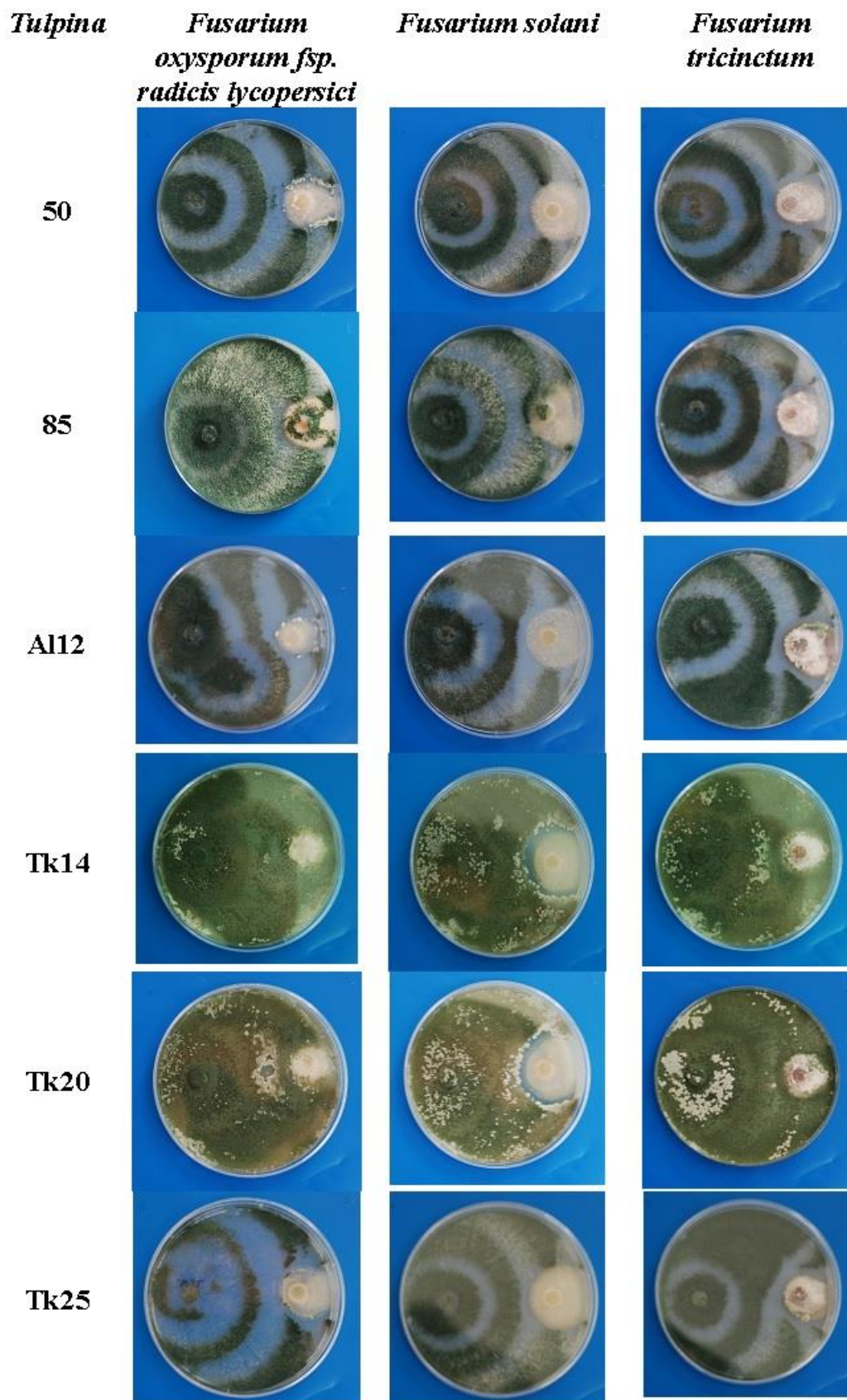


Figura 2.4. Testarea capacității antagoniste a tulpinilor de *Trichoderma spp.* prin metoda culturilor duble (Jouan,1964).

Valoarea coeficientului X calculată pentru *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* este cuprinsă între 0,19 și 0,32 (la 8 zile). Față de *Fusarium tricinctum*, valorile coeficientului X au variat între 0,19 și 0,26 (la 8 zile). Pentru ciuperca fitopatogenă *Fusarium solani*, valoarea coeficientului X a variat între 0,11 și 0,60 (după 8 zile). Aceste rezultate încadrează izolatele de *Trichoderma spp.* în clasa de antagonism (valoarea coeficientului $X < 1$).

Rezultatele obținute evidențiază caracterul antagonist al celor șase tulpini de *Trichoderma spp.*, luate în studiu de noi, față de toate cele trei izolate supuse testărilor.

Mecanismul de acțiune al tulpinilor de *Trichoderma spp.* față de ciupercile fitopatogene se explică prin capacitatea ridicată de sporulare și competiția pentru spațiu și hrană care a inhibat dezvoltarea coloniilor de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Fusarium tricinctum* și *Fusarium solani* utilizate în experimentele noastre.

Numeroase cercetări au evidențiat complexitatea mecanismelor de acțiune ale izolatelor genului *Trichoderma*: **antagonism** (inhibă creșterea miceliană a patogenului); **competiția pentru hrană și spațiu** (sporii eliberați cresc mai repede decât sporiile ciupercilor patogene și le inhibă dezvoltarea prin colonizarea acestora) și **rezistență indusă** la plante (Harman, 2006; Rojan și colab., 2010).

2.3. Screening-ul unor tulpini de *Trichoderma spp.* pentru producerea de enzime hidrolitice

Toate cele șase tulpini de *Trichoderma* au fost examinate calitativ pentru producerea de enzime extracelulare prin metoda culturii pe mediu specific. Rezultatele noastre arată că toate tulpinile de *Trichoderma* studiate produc enzime litice, nivelul de producție al acestor enzime variind în funcție de tulpină.

Pentru determinarea activității chitinolitice s-a folosit metoda evidențierii pe mediu (Agrawal și Kotasthane, 2012), care se bazează pe formarea unei zone de culoare roșu-violet în jurul coloniei de fungi.

Tulpinile *Td50*, *al12* și *Tk20* prezintă o zonă colorată în roșu mai mare ca diametru comparativ cu tulpinile *Td85*, *Tk14* și *Tk25*. Aceste tulpini au activitate chitinazică mai mare față de tulpinile *Td85*, *Tk14* și *Tk25* care au o activitate chitinazică mai scăzută (Fig. 2.5).



Figura 2.5. Evaluarea tulpinilor de *Trichoderma* pentru producerea de chitinaze pe mediu cu chitină coloidală.

Capitolul 3

Studiul activității chitinazice a diferitelor tulpini de *Trichoderma spp.* în prezența infecției cu *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*

3.1 Evaluarea activității chitinazice a tulpinilor de *Trichoderma spp.*

Rezultatele prezentate mai jos (Fig. 3.1) confirmă faptul că tulpinile de *Trichoderma spp.* luate în studiu prezintă activitate chitinazică, aceasta variind în funcție de tulpină și de specie.

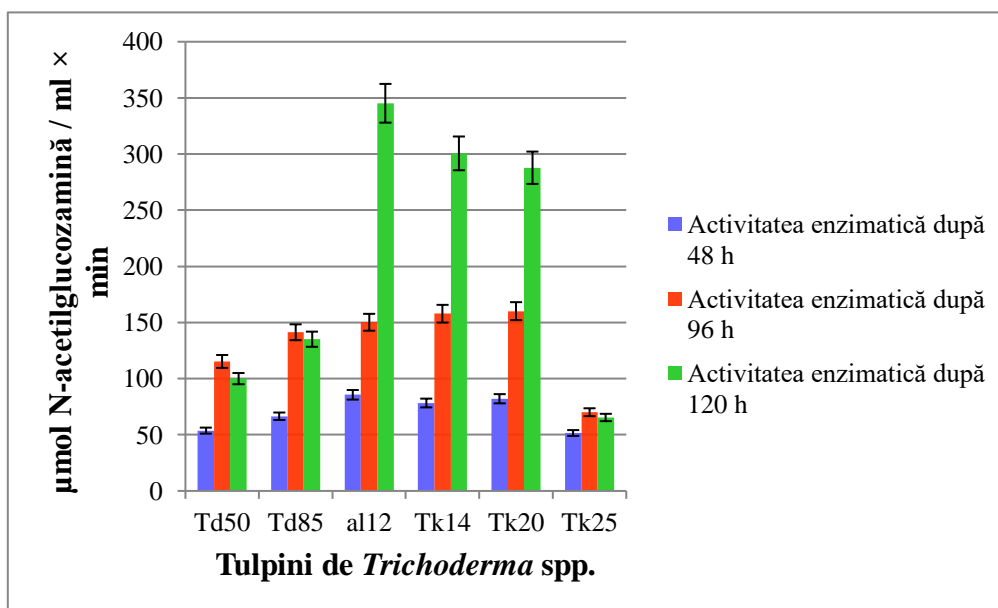


Figura 3.1. Variația activității enzimatică a chitinazei 26 la cele șase tulpini de *Trichoderma spp.*, pe parcursul a 120 h.

Se observă creșterea activității enzimatică a chitinazei pentru tulpinile *Td85*, *al12*, *Tk20* și *Tk25*, începând de la 48 h până la 120 h de incubare. Rezultatele sunt în acord cu cele publicate de Parmar și colab. (2015) care au observat o creștere a activității chitinazice după 48 h, 72 h și 96 h de incubare, variind între 5,62 U/mg și 8,9 U/mg. Trebuie menționat că pentru tulpinile *Td50*, *Td85*, *Tk25*, activitatea chitinazică începe să scadă ușor la 120 h de incubare (Fig. 3.1).

Dintre tulpinile studiate, se evidențiază:

- *al12* cu activitate chitinazică $345,2 \mu\text{mol NAG ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$,
- *Tk14* cu $300,6 \mu\text{mol NAG ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ și

- *Tk20* cu o activitate de $287,8 \mu\text{mol NAG ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Tulpinile studiate de noi au fost selectate pe baza metodei calitative de evidențiere a producerii chitinazei, pe un mediu agarizat specific (Agrawal și Kotasthane, 2012). Dintre tulpinile studiate (Petrișor și colab., 2015), *Td50*, *al12* și *Tk20* au activitate chitinazică mai mare comparativ cu tulpinile *Td85*, *Tk14* și *Tk25*, prin metoda evidențierii pe placă. Totuși, aceste rezultate calitative sunt ușor diferite față de cele cantitative obținute cu metoda spectrofotometrică. De asemenea, și Agrawal și Kotasthane (2012) au observat că activitatea chitinazică evidențiată pe mediu nu este întotdeauna corelată cu activitatea chitinazică cuantificată spectrofotometric. Ei au constatat că izolatele cu activitate scăzută și foarte scăzută în mediu agarizat prezintă o activitate medie sau mare la determinarea cantitativă spectrofotometrică. Aceasta s-ar putea datora, probabil, timpului de incubare diferit la cele două metode.

3.2 Evaluarea exprimării genelor responsabile de activitatea chitinazelor în cultura de tomate

Nivelul de exprimare al genei *chit26* a fost determinat prin comparație cu o genă control („house-keeping gene”) (*EF1 α*) al cărei nivel de exprimare nu depinde de tratamentul cu *Trichoderma spp.* Valorile medii Ct pentru fiecare variantă experimentală (maximum 12 valori) au fost folosite pentru a calcula nivelul de exprimare al genei testate (*expression fold*) prin algoritmul $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak și Schmittgen, 2001).

Prezența produșilor de reacție specifici a fost verificată prin analiza curbei de topire pentru fiecare reacție. În *Figura 3.2* sunt prezentate exemple de curbe de topire rezultate pentru ambele gene (*chit* și *eEF1 α*).

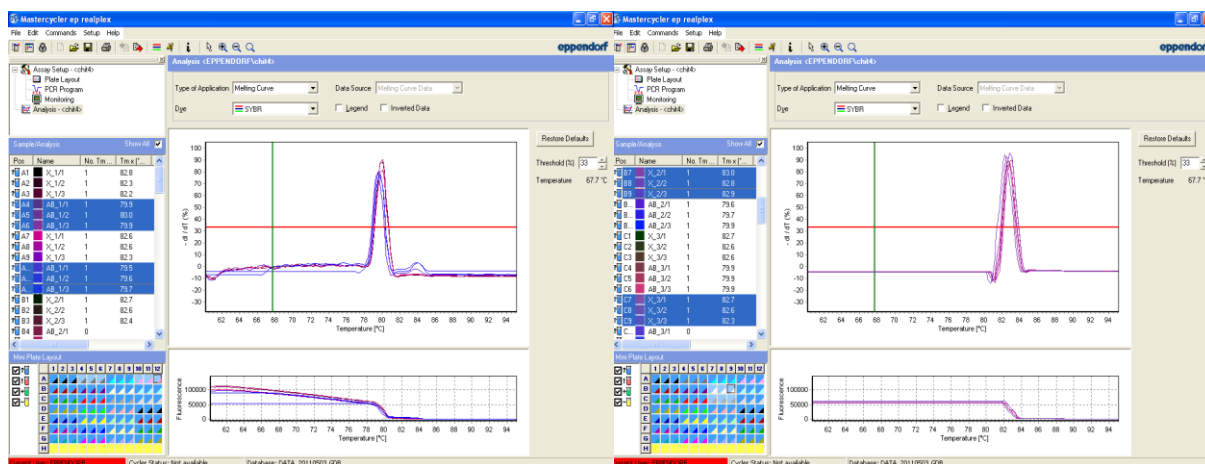


Figura 3.2. Analiza curbei de topire pune în evidență prezența unui singur produs de reacție cu Tm specifică pentru fiecare set de amorse (*chit* - stânga, *eEF1 α* - dreapta).

La tulpinile *al12*, *Tk14* și *Tk20*, exprimarea chitinazei 26 este semnificativ amplificată în prezența *FORL*. În cazul tulpinilor *Td50* și *Td85*, exprimarea chitinazei 26 nu este semnificativ influențată de prezența *FORL*. În mod excepțional, exprimarea chitinazei 26 este inhibată la tulpina *Tk25* în prezența *FORL* (Fig. 3.3).

Nivelul ridicat de exprimare al chitinazei la tulpinile *al12*, *Tk14* și *Tk20* este în concordanță cu activitatea chitinazică crescută, determinată anterior. În ceea ce privește celelalte tulpini care prezintă activitate chitinazică, dar fără o creștere semnificativă a nivelului de exprimare a chitinazei 26, o explicație plauzibilă este că activitatea enzimatică se datorează altor chitinaze codificate de gene care nu au făcut obiectul prezentei analize.

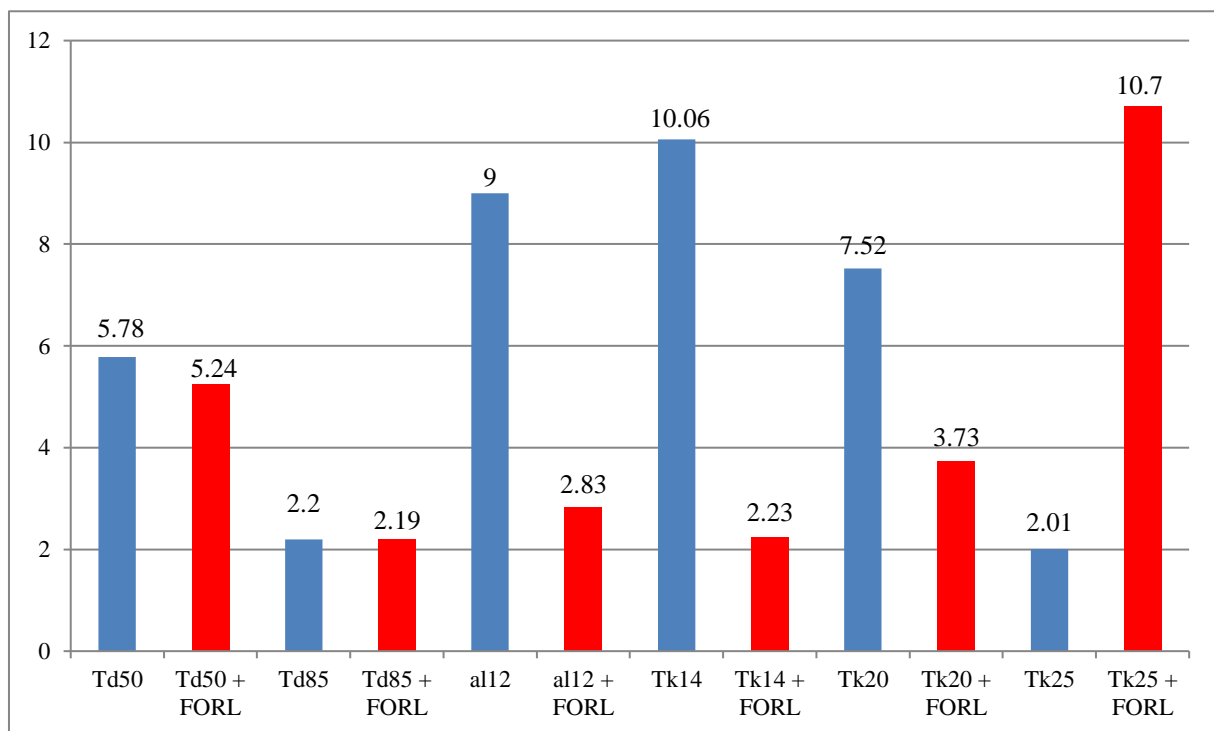


Figura 3.3. Variația nivelului de exprimare (*expression fold*) a genei pentru chitinaza 26, raportat la martor, în prezența sau absența *FORL*.

Capitolul 4

Stimularea creșterii plantelor de tomate cu ajutorul diferitelor tulpini de *Trichoderma* în prezența și în absența infecției cu *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*

Tratamentul plantelor de tomate cu diferite tulpini de *Trichoderma spp.* a avut un efect benefic asupra creșterii și dezvoltării acestora atât în absența agentului patogen (*FORL*), cât și în prezența acestuia, ducând la întârzierea apariției simptomelor de îmbolnăvire.

În prezența *FORL* în sol, toate cele șase tulpini de *Trichoderma spp.* folosite au fost capabile să intensifice procentul de răsărire a tomatelor cu 60%. În prezența patogenului singur, numai 20% din plante au răsărit. Efectul tulpinilor de *Trichoderma spp.* (*Td85*, *al12*, *Tk14* și *Tk20*) asupra plantelor de tomate a fost confirmat acolo unde semințele au fost inoculate numai cu tulpinile benefice, ceea ce a permis obținerea unei răsăririi semnificativ mai mari.

Tulpinile de *Trichoderma spp.* folosite în acest experiment au scăzut severitatea bolii produse de *FORL*, prin comparație cu martorul în care agentul de biocontrol nu a fost adăugat. Rezultatele studiilor efectuate în seră indică reducerea simptomelor bolii cu 30% la plantele de tomate infectate cu *FORL* ale căror semințe au fost tratate cu *Tk20* și *Tk14*, în timp ce plantele tratate cu *Td85*, *al12* arată o reducere semnificativă a bolii în proporție de 20%. Plantele tratate numai cu *Trichoderma spp.* sau cu *FORL* determină o incidență a bolii care variază între 0% și 70%, deși simptomele bolii nu au fost foarte severe.

Înălțimea plantelor de tomate tratate cu *Trichoderma spp.* variază în funcție de tulpina de *Trichoderma spp.* aplicată. Plantele tratate cu *al12* și *Td85* arată o creștere semnificativă (29,8 cm și 28,3 cm) comparativ cu martorul netratat (21,8 cm). Pe de altă parte, în cazul tulpinilor *Tk14* și *Tk20* plantelor de tomate au ajuns la o înălțime asemănătoare, de aproximativ 25 cm. La tratamentul cu *Tk25* s-a observat cea mai mică înălțime a plantelor (24,4 cm), comparativ cu martorul netratat.

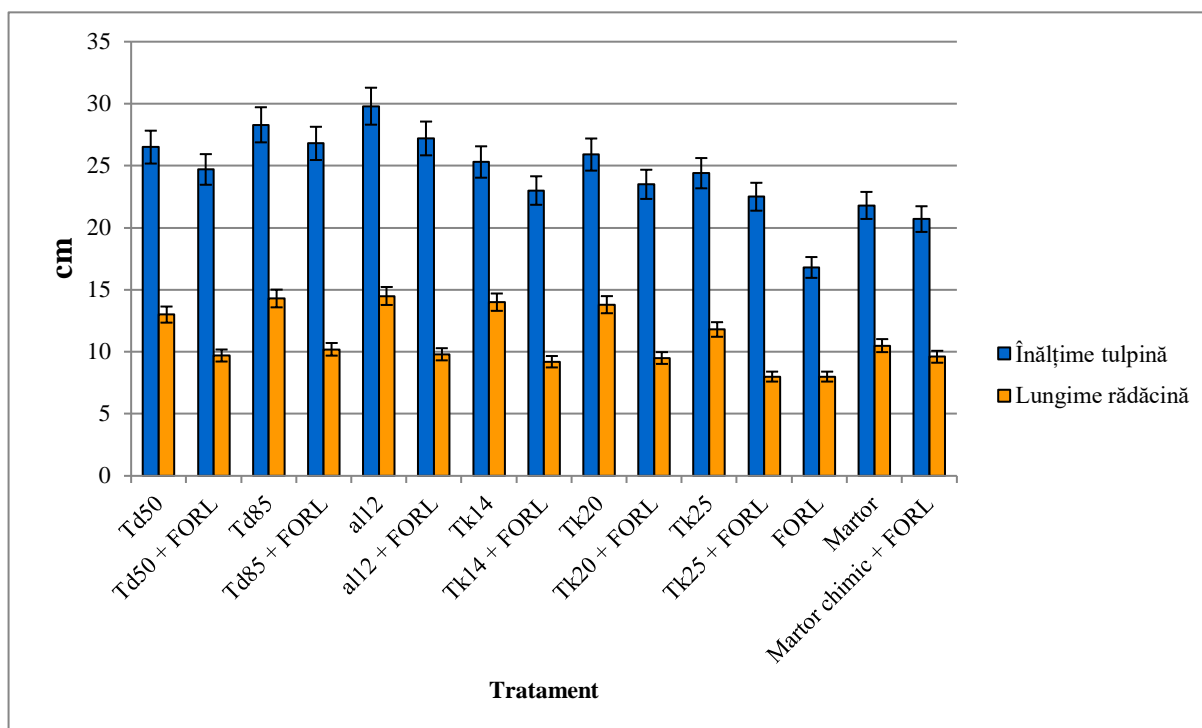


Figura 4.1. Efectul tratamentului cu *Trichoderma spp.* asupra înălțimii tulpinii și lungimii rădăcinii la plantele de tomate infectate sau neinfectate cu *FORL*.

Cea mai mică înălțime a plantelor a fost remarcată la tomatele tratate cu *Tk25*, *Tk20* și *Tk14* și sol inoculat cu *FORL*. Totuși, înălțimea plantelor la aceste variante este superioară matorului infectat cu *FORL*. De asemenea, tratamentul semințelor cu tulpinile *all12* și *Td85* crește semnificativ înălțimea plantelor, comparativ cu matorul inoculat numai cu *FORL*.

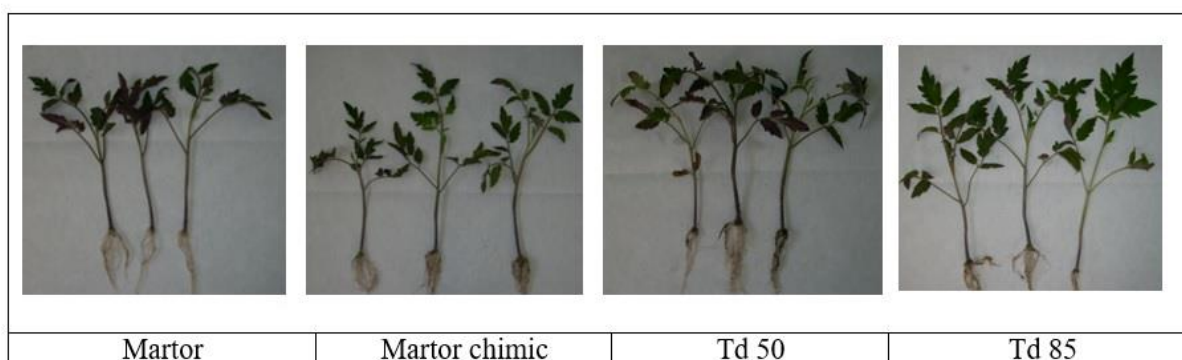


Figura 4.2. Influența aplicării tratamentului cu *Trichoderma spp.* asupra parametrilor de creștere a plantelor de tomate.

Numărul de frunze/plantă a fost diferit între plantele tratate cu *Trichoderma spp.* și mator (Fig. 4.3). Totuși, nu a existat o diferență pronunțată între tulpinile de *Trichoderma spp.* aplicate plantelor de tomate. Se observă un număr ușor scăzut de frunze/plantă la plantele

tratate cu *Tk14* și *Tk20*, comparativ cu plantele unde au fost aplicate celelalte tulpini de *Trichoderma spp.*

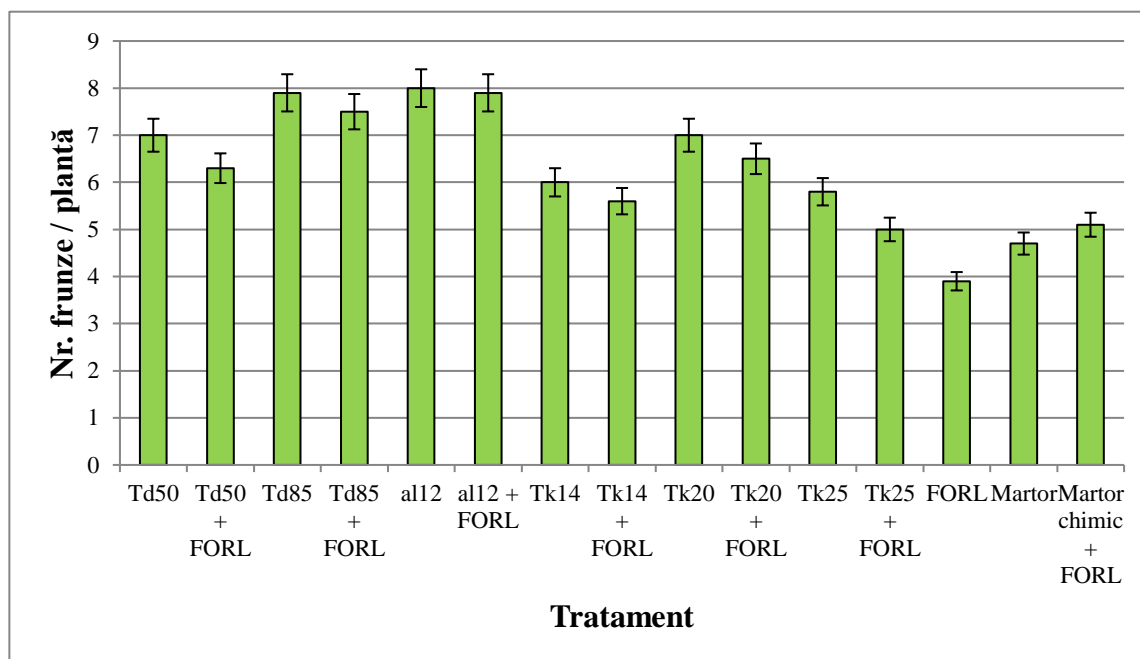


Figura 4.3. Efectul tratamentului cu *Trichoderma spp.* asupra numărului mediu de frunze la plantele de tomate infectate sau neinfectate cu *FORL*.

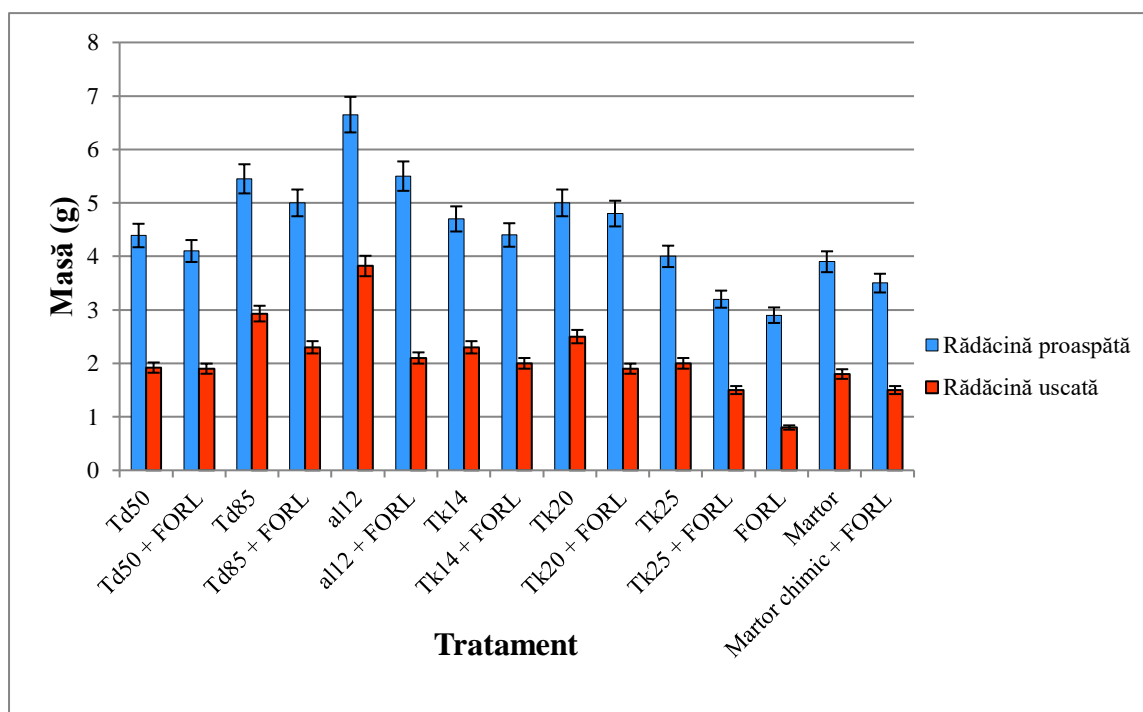


Figura 4.4. Efectul tratamentului cu *Trichoderma spp.* asupra masei rădăcinii la plantele de tomate infectate sau neinfectate cu *FORL*.

Inocularea cu *al12*, *Td85* și *Tk20* afectează semnificativ **greutatea proaspătă și uscată a rădăcinii plantelor** de tomate pretratate cu *FORL* comparativ cu plantele inoculate numai cu *FORL* (Fig. 4.4). Comparativ cu martorul neinoculat, plantele de tomate inoculate cu *Tk14* și *Tk20* arată o creștere a greutateii uscate a rădăcinii, deși nu există o diferență a lungimii rădăcinii acestora. Rezultatele acestui studiu demonstrează efectul benefic al inoculării cu *Trichoderma spp.* asupra producției de masă uscată a răsadurilor de tomate.

Rezultatele studiului de față demonstrează că toate tulpinile de *Trichoderma spp.* au fost capabile să stimuleze parametrii de creștere ai plantelor, în grade diferite. Această stimulare este rezultatul unei creșteri axiale mai bune și a unei cantități de biomasă rezultată mai mare care sunt coroborate cu cele ale altor autori (Gravel și colab., 2007; Contreras-Cornejo și colab., 2009; Salas-Marina și colab., 2011; Sofo și colab., 2011). Stimularea biomasei a fost observată nu numai în părțile aeriene dar și în partea radiculară. Datele obținute de noi demonstrează că deși toate tulpinile de *Trichoderma spp.* folosite în acest studiu sintetizează IAA totuși, producția de IAA variază în funcție de tulpina testată. Tulpinile *Td85* și *al12* produc cantități semnificative de IAA care variază între 13,8 și 15,89 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 4.1).

Tabelul 4.1. Sinteza de IAA și solubilizarea fosfaților la tulpinile de *Trichoderma spp.* *in vitro*.

Tulpini	IAA ($\mu\text{g/ml}$)		Indicele de solubilizare a fosfaților	Concentrație fosfat (mg/l)
	Cu triptofan	Fără triptofan		
Td85	1,9	1,2	0	0,18
Td50	12,8	1,0	0	0,25
al12	13,8	1,3	0	0,30
Tk14	10,9	0,6	0	0
Tk20	11,2	0,9	0	0,35
Tk25	9,5	0,8	0	0

Importanța solubilizării fosfaților de către fungi constă în creșterea absorbției de fosfor cu rol în creșterea plantelor. Din datele pe care le-am obținut se observă că niciuna dintre tulpinile de *Trichoderma spp.* testate nu este capabilă să solubilizeze fosfatul pe mediu Pikovskaya (Tab. 4.1). Deși niciuna dintre tulpini nu dă o zonă de solubilizare (halou), observabilă pe mediu agarizat Pikovskaya, totuși, tulpinile *Td85*, *Td50*, *al12* și *Tk20* arată o ușoară solubilizare a fosfaților cuprinsă între 0,18 și 0,35 mg/l în mediu lichid. Astfel,

stimularea creșterii plantelor de tomate studiate este corelată cu producția de IAA, dar nu și cu solubilizarea fosfaților.

Producția fitohormonilor de către tulpinile de *Trichoderma spp.* poate conduce la o intensitate crescută a fotosintezei care atrage după sine stimularea creșterii plantei.

Conținutul de clorofilă *a*, clorofilă *b* și clorofilă totală în frunzele de tomate ale căror semințe au fost tratate cu *Trichoderma spp.* a fost crescut (la toate variantele studiate) față de matorul netratat, cu excepția *Tk25* care prezintă un conținut mai mic (Fig. 4.6).

Acest studiu indică faptul că tratamentul seminței cu tulpinile *al12*, *Td85* și *Td50* determină o creștere semnificativă a pigmentilor asimilatori comparativ cu matorul netratat.

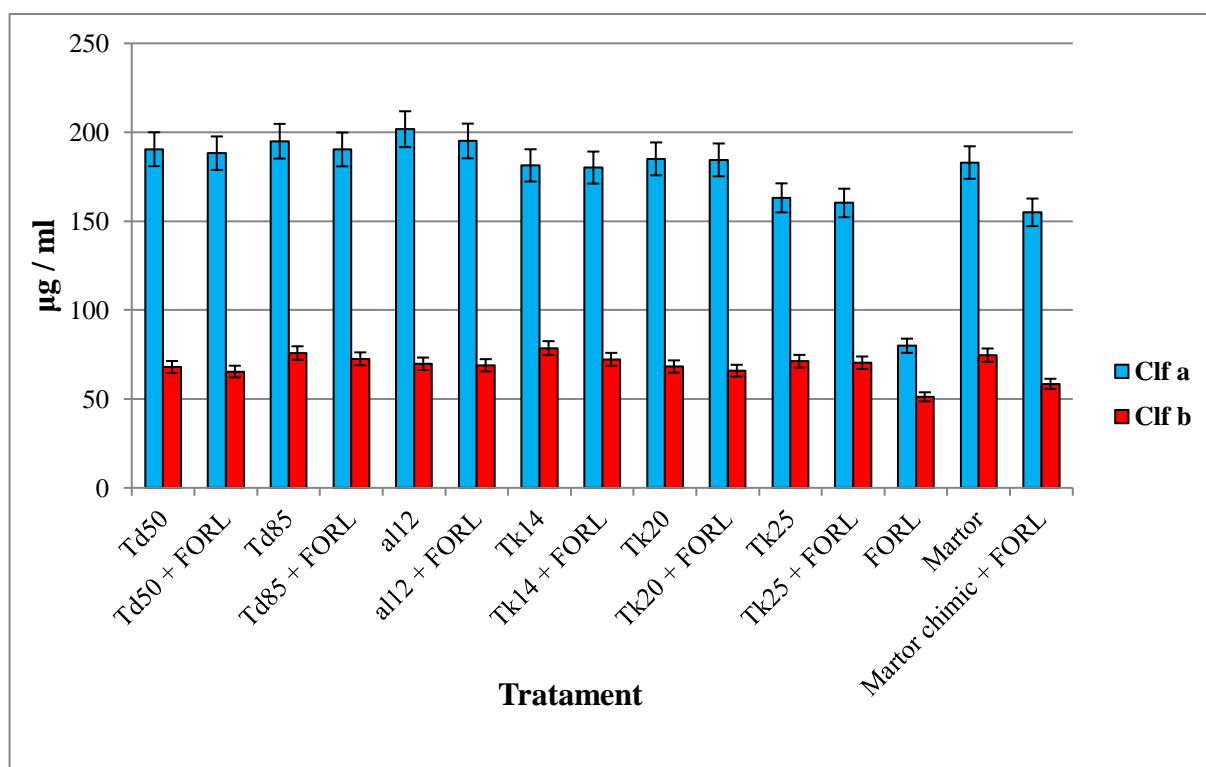


Figura 4.6. Efectul tratamentului cu tulpini de *Trichoderma spp.* asupra conținutului de pigmenți fotosintetici la plantele de tomate neinfectate și infectate cu *FORL*.

Astfel, conținutul în clorofilă al tomatelor inoculate cu *al12* (201,71 µg/ml), *Td85* (194,95 µg/ml) și *Td50* (190,46 µg/ml) a fost mult mai mare comparativ cu matorul netratat (182,95 µg/ml). Toate aceste date susțin că plantele tratate cu *Trichoderma spp.* au o activitate fotosintetică intensă.

Probabil că scăderea conținutului de clorofilă *a* și clorofilă *b* este rezultatul unei creșteri a activității clorofilazei în frunzele plantelor de tomate infectate cu *FORL*.

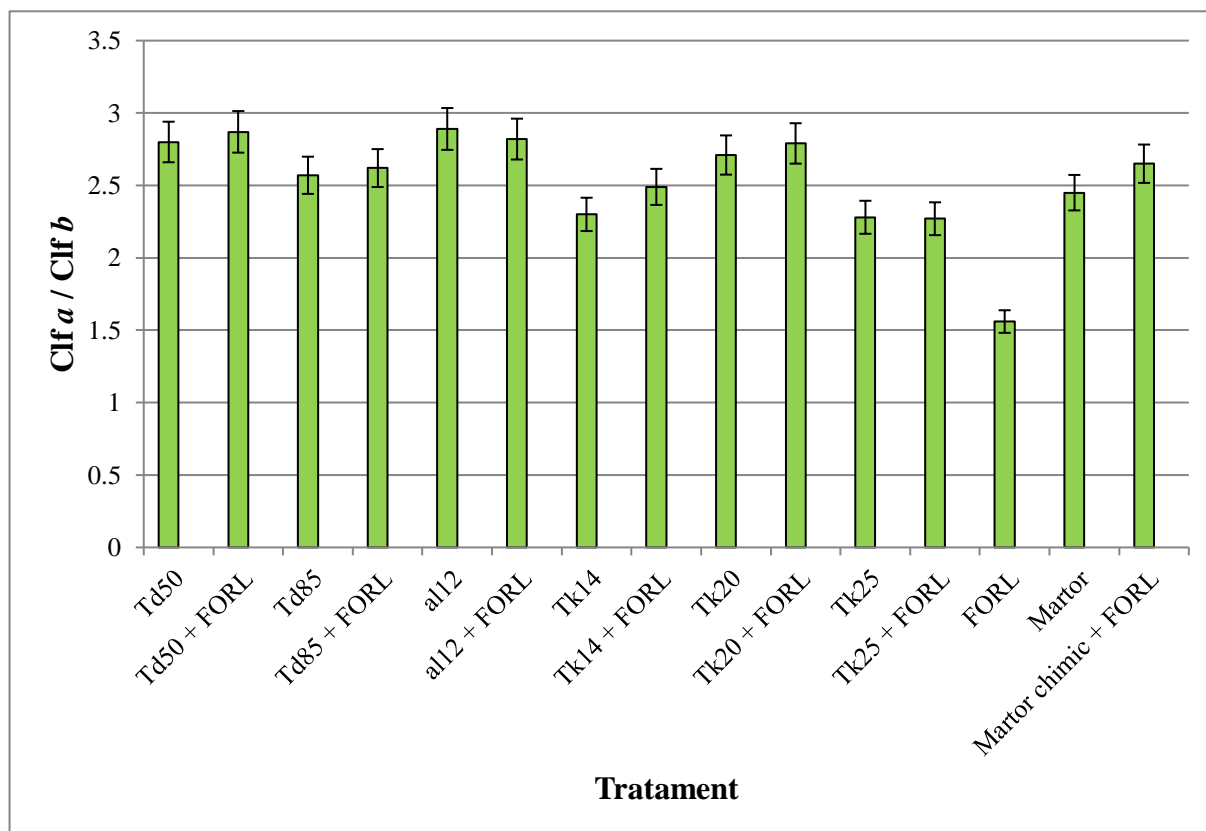


Figura 4.7. Efectul tratamentului cu tulpini de *Trichoderma spp.* asupra raportului Clf *a* / Clf *b* la plantele de tomate neinfectate și infectate cu *FORL*.

Raportul Clf *a* / Clf *b* este un indicator de stres. Acesta scade la toate variantele infectate cu *FORL* la care s-a aplicat tratamentul cu tulpini de *Trichoderma spp.* de la valori de 2,87 (la plantele tratate cu *Trichoderma spp.* și infectate cu *FORL*) până la 1,56 (la plantele infectate cu *FORL* și netratate cu *Trichoderma spp.*) (Fig. 4.7).

Rezultatele noastre relevă faptul că plantele tratate cu *Trichoderma spp.* au avut un conținut de carotenoizi crescut față de martorul netratat. De asemenea, rezultatele obținute de noi nu evidențiază o diferență semnificativă a conținutului de fenoli la plantele infectate cu *FORL* față de cele neinfectate. Totuși, conținutul de fenoli totali scade ușor în frunzele plantelor infectate comparativ cu martorul netratat, dar acest conținut crește față de varianta care a fost infectată cu *FORL* și la care nu s-a aplicat tratament cu *Trichoderma spp.* (Fig. 4.8 și Fig. 4.9). Toate aceste date, împreună cu cele privind clorofilele, confirmă faptul că la plantele tratate cu *Trichoderma spp.* se remarcă o intensă activitate fotosintetică.

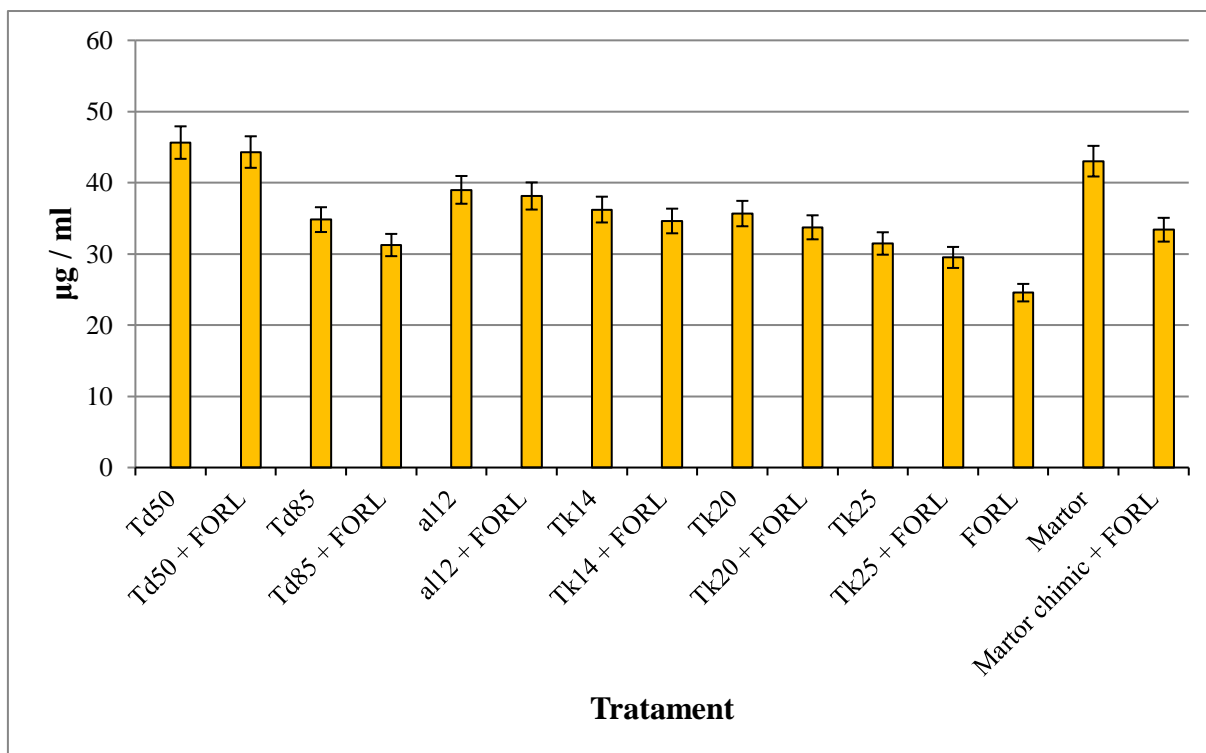


Figura 4.8. Efectul tratamentului cu tulpini de *Trichoderma spp.* asupra conținutului de carotenoizi și xantofile (µg/ml) la plantele de tomate neinfectate și infectate cu *FORL*.

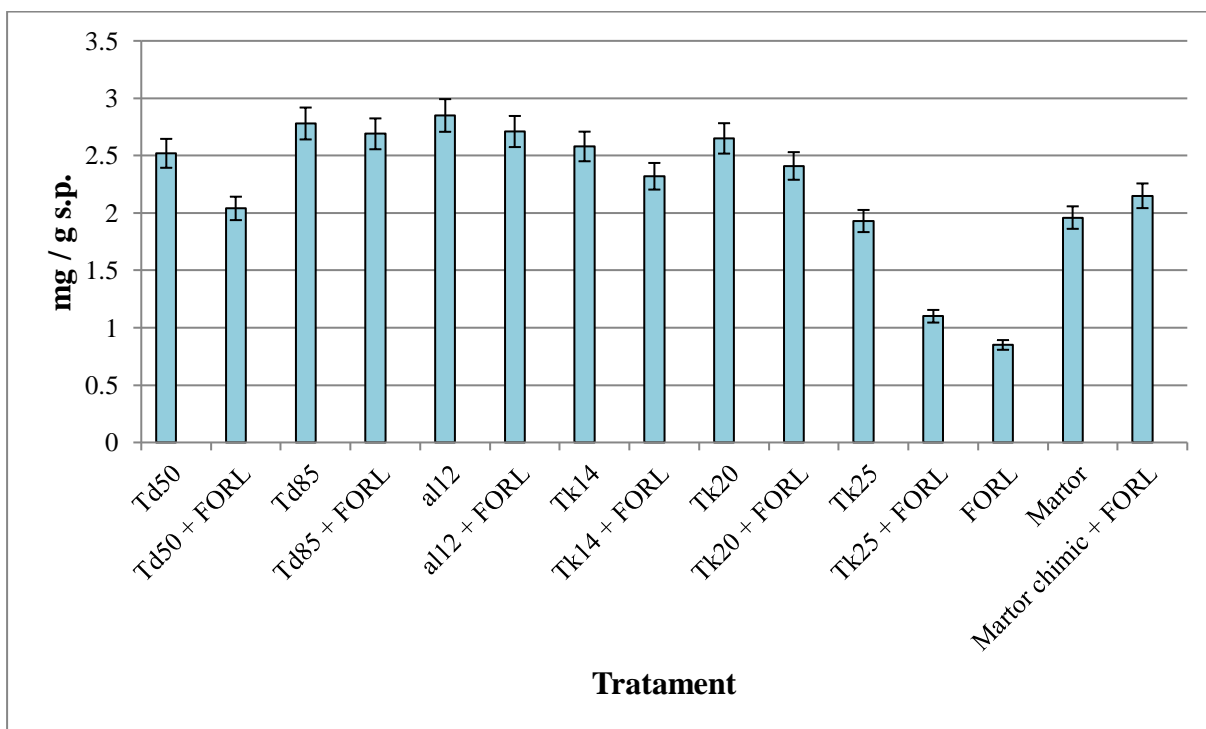


Figura 4.9. Efectul tratamentului cu tulpini de *Trichoderma spp.* asupra conținutului de fenoli totali (mg/g substanță proaspătă) la plantele de tomate neinfectate și infectate cu *FORL*.

Capitolul 5

5.1. Concluzii

Necesitatea creșterii productivității și calității recoltelor în agricultură a justificat folosirea excesivă a fertilizanților chimici, ceea ce a dus la probleme serioase de poluare a mediului. Folosirea biofertilizanților și a biopesticidelor este o alternativă pentru obținerea unor producții mari cu impact ecologic foarte scăzut. Microorganismele solului influențează ecosistemele prin contribuția la creșterea și nutriția plantelor, la structura și fertilitatea solului, și, implicit, la sănătatea plantelor. Speciile de *Trichoderma spp.* sunt capabile să colonizeze suprafața rădăcinilor și să determine modificări substanțiale în metabolismul plantei.

Rezultatele obținute de noi subliniază importanța abordării moleculare pentru identificarea speciilor care poate servi, de asemenea, ca un instrument pentru cunoașterea relațiilor filogenetice dintre diferitele tulpini de *Trichoderma spp.*

În urma analizei filogenetice pe baza secvențelor *ITS* și *eEF1a1* din șase izolate de *Trichoderma spp.*, au fost identificate două specii distincte. *Trichoderma asperellum* și *Trichoderma longibrachiatum*. Specia „dominantă” a fost *T. asperellum* cu patru din cele șase tulpini (*Td50*, *Td85*, *al12* și *Tk25*), urmată de *T. longibrachiatum* cu două tulpini (*Tk14* și *Tk20*).

Tulpinile *Td85* și *Tk20* au avut cea mai mare activitate antagonistă față de cele trei tulpini fitopatogene de *Fusarium spp.*, acestea fiind urmate, în ordine, de *Td50*, *Tk14*, *al12* și *Tk25*.

Toate tulpinile de *Trichoderma spp.* studiate produc chitinază. Dintre cele șase tulpini studiate, *Td50*, *al12* și *Tk20* se evidențiază cu cea mai mare activitate chitinazică. Dintre tulpinile studiate se evidențiază cu activitate chitinazică tulpinile *al12* (345,2 $\mu\text{mol NAG} / \text{ml} \times \text{min}$), *Tk14* (300,6 $\mu\text{mol NAG} / \text{ml} \times \text{min}$) și *Tk20* (287.8 $\mu\text{mol NAG} / \text{ml} \times \text{min}$).

Activitatea chitinazică este demonstrată și susținută și de determinările exprimării genelor implicate. Gena care codifică chitinaza a fost exprimată mai puternic la plantele de tomate infectate cu *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici*, față de cele sănătoase,

neinfectate. În acest sens, s-au evidențiat plantele de tomate tratate cu tulpinile *Tk14*, *al12* și *Tk20*.

Tulpinile *Td85* și *al12* (identificate ca *Trichoderma asperellum*) reduc semnificativ severitatea dezvoltării fuzariozei și stimulează creșterea plantelor datorită producerii de IAA. Aceste tulpini demonstrează numeroase caracteristici de stimulare a plantelor, inclusiv capacitatea de a produce IAA, celuloze și chitinaze.

În plus, tulpinile *Td85* și *al12* induc creșterea înălțimii și a lungimii rădăcinilor atât la plantele de tomate sănătoase, cât și la cele infectate cu *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. Mai mult, inocularea semințelor de tomate cu aceste două tulpini reduce semnificativ dezvoltarea fuzariozei la plantele de tomate, ceea ce este în concordanță cu rezultatele obținute la testele *in vitro* cu culturi duble.

5.2. Originalitatea tezei

➤ Tulpinile de *Trichoderma spp.* utilizate în aceste cercetări au fost identificate utilizând tehnica PCR pentru a amplifica regiunile *ITS*, precum și fragmente din gena *eEF1a1* care codifică pentru factorul de elongare 1- α (*tef1*). Cele 6 tulpini de *Trichoderma spp.* au fost încadrate în două specii distincte: *Trichoderma asperellum* și *Trichoderma longibrachiatum*.

➤ A fost apreciat gradul de antagonism al tulpinilor de *Trichoderma spp.* față de trei tulpini fitopatogene din genul *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*, *Fusarium tricinctum* și *Fusarium solani*). Tulpinile *T. asperellum* Td85 și *T. longibrachiatum* Tk20 au avut cea mai mare activitate antagonistă, acestea fiind urmate de *T. asperellum* Td50, *T. longibrachiatum* Tk14, *T. asperellum* al12 și *T. asperellum* Tk25.

➤ Toate tulpinile de *Trichoderma spp.* au fost examinate calitativ pentru producerea de enzime extracelulare prin metoda culturii pe mediu specific. Tulpinile Td50, al12 și Tk20 prezintă o zonă colorată în roșu mai mare ca diametru, comparativ cu tulpinile Td85, Tk14 și Tk25. Aceste tulpini au activitate chitinazică mai mare față de tulpinile Td85, Tk14 și Tk25 care au o activitate chitinazică mai scăzută.

➤ Evaluarea exprimării genelor responsabile de activitatea chitinazelor în cultura de tomate a fost analizată prin revers-transcriere și qPCR. Gena ce codifică chitinaza a fost exprimată mai puternic la plantele de tomate infectate cu *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* față de cele sănătoase. S-au evidențiat în acest sens plantele de tomate tratate cu tulpinile *T. longibrachiatum* Tk14 și Tk20 și *T. asperellum* al12.

➤ Tratamentul plantelor de tomate cu diferite tulpini de *Trichoderma spp.* a avut un efect benefic asupra creșterii și dezvoltării acestora atât în absența agentului fitopatogen (*Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*), cât și în prezența acestuia, ducând la întârzierea apariției simptomelor de boală.

➤ Toate cele șase tulpini de *Trichoderma spp.* au fost capabile să intensifice procentul de răsărire a tomatelor cu 60%, în prezența *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* în sol. Dacă în sol a fost prezent patogenul singur, numai 20% din plante au

răsărit. Efectul tulpinilor de *Trichoderma spp.* (*Td85*, *al12*, *Tk14* și *Tk20*) pe tomate a fost confirmat la plantele unde semințele au fost inoculate numai cu tulpinile benefice ceea ce a permis o răsărire semnificativ mai mare.

➤ Tulpinile *Td85* și *al12*, identificate ca *Trichoderma asperellum*, reduc semnificativ severitatea dezvoltării fuzariozei și stimulează creșterea plantelor datorită producerii IAA. Tulpinile demonstrează numeroase caracteristici de stimulare a plantelor, inclusiv capacitatea de a produce IAA, celuloze și chitinaze.

➤ În plus, aceste două tulpini induc creșterea înălțimii plantelor și a lungimii rădăcinilor atât la plantele de tomate sănătoase, cât și la cele infectate cu *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*.

5.3. Perspective de dezvoltare ulterioară

Fermierii români sunt în căutarea unor metode cât mai curate și mai naturale de susținere a culturilor, în special a celor de legume. Cu atât mai mult cu cât, de cele mai multe ori, producătorii sunt primii consumatori ai propriilor produse.

Astfel, rezultatele obținute de noi pot să constituie baza unor cercetări viitoare în vederea obținerii unor biopreparate pe bază de *Trichoderma asperellum* (tulpinile *Td85* și *all2*). Aceste biopreparate vor putea fi utilizate în tratamentele fitosanitare pentru combaterea agenților fitopatogeni care produc pagube însemnate și afectează producția vegetală.

De asemenea, vom continua cercetările pentru identificarea și caracterizarea mecanismelor moleculare implicate în interacțiunea *Trichoderma asperellum* cu fitopatogenii.

Lista lucrărilor publicate din domeniul tezei

Reviste Web of Science (cotate ISI și indexate ISI)

1. Petrișor Cristina, **Paica Alexandru***, Burnichi Floarea (2019), Physiological and growth response of tomato plants after *Trichoderma spp.* seed treatments, *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Chemia*, LXIV(2), 567-577, ISSN 1224-7154, (FI=0.305) – 1 citare
2. Petrișor Cristina, **Paica Alexandru*** (2019), Overview on utilities and analysis techniques of organic volatile compounds (VOCS) produced by fungi belonging to *Trichoderma spp.*, *Proceedings of the Romanian Academy, Series B*, 21(2), 91-98, ISSN 1454-8267; Indexat ISI
3. Petrișor Cristina, Paica Alexandru, Constantinescu, Florica (2017), Effect of secondary metabolites produced by different *Trichoderma spp.* isolates against *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* and *Fusarium solani*, *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, XVI, 407–411, ISSN 2285-5653, Indexat ISI – 5 citări
4. Petrișor Cristina; **Paica Alexandru**, Constantinescu Florica (2016), Influence of abiotic factors on in vitro growth of *Trichoderma* strains, *Proceedings of the Romanian Academy, Series B*, 18(1), 11-14, ISSN 1454-8267; Indexat ISI–6 citări
5. Petrișor Cristina, **Paica Alexandru**, Constantinescu Florica (2016), Temperature and pH influence on antagonistic potential of *Trichoderma sp.* strains against *Rhizoctonia solani*, *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, LX, 275-278; ISSN 2285-5653, Indexat ISI – 6 citări
6. **Paica Alexandru**, Petrișor Cristina, Constantinescu Florica (2015), Influence of abiotic factors on biological control ability of different *Trichoderma spp.* strains, *Annals of the University of Craiova*, XX(LVI), 543-550, Indexat ISI – 4 citări

Reviste BDI

1. Petrișor Cristina, **Paica Alexandru**, Constantinescu Florica (2015), Screening of *Trichoderma sp.* strains for producing hydrolytic enzymes, *Romanian Journal for Plant Protection*, VIII, 7-10; ISSN 2248 129X.
2. **Paica Alexandru**, Siciua Oana-Alina, Petrișor Cristina (2015), Comparative analysis of different DNA isolation methods for *Trichoderma spp.* strains used as biocontrol agents, *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 19(3), 22-25, ISSN 2066-1797

Bibliografie selectivă

1. Agrawal T, Kotasthane AS (2012), Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India, *SpringerPlus*, **1**(1), 73.
2. Baker R (1988), *Trichoderma* spp as plant-growth stimulants, *Crit Rev Biotechnol*, **7**, 34-38.
3. Carsolio C, Gutiérrez A, Jiménez B, Van Montagu M, Herrera-Estrella A (1994), Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**(23), 10903-10907.
4. Chang Y-C, Chang Y-C, Baker R, Kleifeld O, Chet I (1986), Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*, *Plant Dis*, **70**, 145-148.
5. Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ (2015), Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains, *Mycologia*,. **107**(3), 558-590.
6. Colla G, Rouphael Y, Di Mattia E, El-Nakhel C, Cardarelli M (2015), Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops, *J Sci Food Agric*, **95**(8), 1706-1715.
7. Contreras-Cornejo HA, 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 Physiol*, **149**(3), 1579-1592.
8. Datta SK, Muthukrishnan S (1999), *Pathogenesis-related Proteins in Plants*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA.
9. De Souza JT, Bailey BA, Pomella AWW, Erbe EF, Murphy CA, Bae H, Hebbar PK (2008), Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance, *Biol Control*, **46**(1), 36-45.

10. Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komoń M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP (2005), An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*, *Fungal Genet Biol*, **42**(10), 813-828.
11. Druzhinina IS, Kubicek CP (2005), Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *J Zhejiang Univ-SCI B*, **6**(2), 100-112.
12. Druzhinina IS, Kopchinskiy AG (2006), *TrichOKEY v. 2 – A DNA oligonucleotide BarCode program for the identification of multiple sequences of Hypocrea and Trichoderma*, in: (Eds: Meyer W, Pearce C), International Proceedings of the 8th International Mycological Congress, Cairns, Australia, Medimond, Bologna, Italy.
13. El-Mohamedy RS, El-Baky MA (2008), Evaluation of different types of seed treatment on control of root rot disease, improvement growth and yield quality of pea plant in Nobarria province, *Res J Agric Biol Sci*, **4**(6), 611-622.
14. Gams W, Bissett J (1998) (eBook 2002), Morphology and identification of *Trichoderma*, in: *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics* (eds: Kubicek CP and Harman GE), vol. **1**, Taylor and Francis Ltd, London, pp 3-34
15. Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007), Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA), *Soil Biol Biochem*, **39**(8), 1968-1977.
16. Harman GE, Björkman T (1998), Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement, in: *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Uses* (eds: Harman GE and Kubicek CP), vol. **2**, Taylor and Francis, London, pp 229-265.
17. Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004), *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Rev Microbiol*, **2**(1), 43-56.
18. Harman GE (2006), Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp, *Phytopathology*, **96**(2), 190-194.
19. Hatvani L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Druzhinina IS, Kubicek CP, Nagy A, Nagy E, Vágvölgyi C, Kredics L (2007), Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species, *Phytopathology*, **97**(4), 532-537.

20. Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, Kredics L (2013), *Trichoderma* as a Human Pathogen, in: *Trichoderma: biology and applications* (Eds: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M), CABI, Wallingford, United Kingdom, pp 292-313.
21. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012), Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes, *Microbiology*, **158**(1), 17-25.
22. Howell CR (2003), Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts, *Plant Dis*, **87**(1), 4-10.
23. Howell CR (2007), Effect of seed quality and combination fungicide-*Trichoderma* spp seed treatments on pre- and postemergence damping-off in cotton, *Phytopathology*, **97**(1), 66-67.
24. Huub JM, Linthorst HJM, Van Loon LC (1991), Pathogenesis-related proteins of plants, *Crit Rev Plant Sci*, **10**(2), 123-150.
25. Inbar J, Abramsky M, Cohen D, Chet I (1994), Plant-growth enhancement and disease-control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions, *Eur J Plant Pathol*, **100**(5), 337-346.
26. Kleifeld O, Chet I (1992), *Trichoderma harzianum*: interaction with plants and effect on growth-response, *Plant Soil*, **144**(2), 267-272.
27. Komoń-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, Woo S, Lorito M, Kredics L, Kubicek CP, Druzhinina IS (2007), Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide, *Appl Environ Microbiol*, **73**(22), 7415-7426.
28. Kopchinskiy A, Komoń M, Kubicek CP, Druzhinina IS (2005), *TrichoBLAST*: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications, *Mycol Res*, **109**(6), 658-660.
29. Kredics L, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, Antal Z (2011), *Trichoderma*, in: *Molecular Detection of Human Fungal Pathogens* (Ed: Liu D), Taylor and Francis Group, London, pp 509-526.
30. Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP (2002), Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach, *Mycol Res*, **106**(7), 757-767.

31. Kumar R, Singh S, Singh OV (2008), Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **35**(5), 377-391.
32. Leubner-Metzger G, Meins Jr F (1999), Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2), in: *Pathogenesis-related proteins in plants* (Eds: Datta SK, Muthukrishnan S), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp 49-76.
33. Li YT, Hwang SG, Huang YM, Huang CH (2018), Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato, *Crop Prot*, **110**, 275-282.
34. Livak KJ, Schmittgen TD (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, **25**(4), 402-408.
35. Lynch JM, Wilson KL, Ousley MA, Whipps JM (1991), Response of lettuce to *Trichoderma* treatment, *Lett Appl Microbiol*, **12**(2), 59-61.
36. Mach RL, Peterbauer CK, Payer K, Jaksits S, Woo SL, Zeilinger S, Kullnig CM, Lorito M, Kubicek CP (1999), Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals, *Appl Environ Microbiol*, **65**(5), 1858-1863.
37. Ousley MA, Lynch JM, Whipps JM (1993), Effect of *Trichoderma* on plant-growth: a balance between inhibition and growth promotion, *Microb Ecol*, **26**(3), 277-285.
38. Ousley MA, Lynch JM, Whipps JM (1994a), Potential of *Trichoderma* spp as consistent plant-growth stimulators, *Biol Fertil Soils* **17**(2) 85-90.
39. Ousley MA, Lynch JM, Whipps JM (1994b), The effects of addition of *Trichoderma* inocula on flowering and shoot growth of bedding plants, *Sci Hortic*, **59**(2), 147-155.
40. Park MS, Bae KS, Yu SH (2006), Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea, *Mycobiology*, **34**(3), 111-113.
41. Paulitz T, Windham M, Baker R (1986), Effect of peat-vermiculite mixes containing *Trichoderma harzianum* on increased growth response of radish, *J Am Soc Hortic Sci*, **111**(5), 810-814.
42. Perveen K, Bokhari NA (2012), Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolated from soil of date palm field against *Fusarium oxysporum*, *Afr J Microbiol Res*, **6**(13), 3348-3353.

43. Petrisor C, Paica A, Constantinescu F (2015), Screening of *Trichoderma* sp. strains for producing hydrolitic enzymes, *Rom J Plant Prot*, **8**, 7-10.
44. Rojan PJ, Tyagi RD, Prévost D, Brar SK, Pouleur S, Surampalli RY (2010), Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean, *Crop Prot*, **29**, 1452-1459.
45. Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, Castro-Longoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways, *Eur J Plant Pathol*, **131**(1), 15-26.
46. Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Petrini O (2002), *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*, *Mycologia*, **94**(1), 146-170.
47. Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Petrini O, Schroers HJ, Druzhinina IS (2006), The *Trichoderma koningii* aggregate species, *Stud Mycol*, **56**, 67-133.
48. Seiboth B, Herold S, Kubicek CP (2012), Metabolic engineering of inducer formation for cellulase and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei*, in: *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways. Subcellular Biochemistry* (Eds: Wang X, Chen J, Quinn P), vol **64**, Springer, Dordrecht, pp 367-390.
49. Sofo A, Scopa A, Manfra M, De Nisco M, Tenore G, Troisi J, Di Fiori R, Novellino E (2011), *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* × *P. canescens*), *Plant Growth Regul*, **65**(2), 421-425.
50. Summerbell RC (2003), *Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia* and their relatives. Pathogenic and opportunistic members of the Eurotiales, Hypocreales, Ophiostomatales and Pseudeurotiaceae ss str, in: *Pathogenic Fungi in Humans and Animals* (Ed: Howard DH), 2nd edition, Marcel Dekker, Inc, New York, pp 237-498.
51. van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998), Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria, *Annu Rev Phytopathol*, **36**, 453-483.
52. van Loon LC, van Strien LA (1999), The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol Mol Plant Pathol*, **55**(2), 85-97.

53. Viterbo A, Horwitz BA (2010), Mycoparasitism, *in: Cellular and molecular biology of filamentous fungi*, (Eds: Borkovich KA, Ebbole DJ), ASM Press, Washington DC, pp 676-693).
54. Windham MT, Elad Y, Baker R (1986), A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp, *Phytopathology*, **76**(5), 518-521.
55. Zeilinger S, Galhaup C, Payer K, Woo SL, Mach RL, Fekete C, Lorito M, Kubicek CP (1999), Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host, *Fungal Genet Biol*, **26**(2), 131-140.
56. *** International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* (2020), <http://www.trichoderma.info>.