Martina STVORIĆ
Veleučilište u Križevcima, Križevci, Hrvatska
mstvoric@vguk.hr

INTEGRATIVNA DETERMINACIJA VRSTA RODA *TRICHODERMA*: USPOREDBA MORFOLOŠKIH I MOLEKULARNIH METODA

SAŽETAK

Vrste iz roda *Trichoderma* obuhvaćaju velik broj ekološki i gospodarski značajnih gljiva široko rasprostranjenih u tlu, rizosferi biljaka i različitim organskim supstratima. Zbog njihove uloge u biološkoj kontroli fitopatogena, razgradnji organske tvari te primjenama u biotehnologiji i proizvodnji enzima, točna i pouzdana identifikacija vrsta ključan je preduvjet njihove daljnje primjene. Tradicionalna morfološka determinacija temelji se na makroskopskim i mikroskopskim obilježjima uzgojenih kultura, pri čemu se analiziraju karakteristike kolonija te detaljna građa konidiofora, fijalida, konidija i, kada su prisutne, hlamidospora. Ove se strukture opisuju na temelju oblika, veličine, rasporeda i načina stvaranja, no morfološka varijabilnost unutar roda često ograničava pouzdanost identifikacije. Molekularna identifikacija započinje izolacijom genomske DNA, nakon čega slijedi amplifikacija ciljnih genskih regija metodom lančane reakcije polimerazom (PCR). Najčešće analizirane regije uključuju ITS (Internal Transcribed Spacer), gene za translacijski elongacijski faktor 1-α (*tef1-α*) te drugu podjedinicu RNA-polimeraze II (*rpb2*). Dobivene sekvencije uspoređuju se s referentnim sekvencijama u međunarodnim bazama podataka, kao što su GenBank te specijalizirane baze za rod *Trichoderma*, pri čemu se identifikacija vrši na temelju stupnja podudarnosti i filogenske pripadnosti. Cilj ovog preglednog rada jest prikazati i usporediti morfološke i molekularne metode identifikacije vrsta roda *Trichoderma*, istaknuti njihove prednosti i ograničenja te naglasiti važnost integrativnog pristupa koji kombinira fenotipske i genske podatke u suvremenoj taksonomiji.
Ključne riječi: *Trichoderma*, morfološka determinacija, molekularna identifikacija, barkod lokusi, integrativna taksonomija

UVOD

Rod *Trichoderma* pripada koljenu Ascomycota i porodici Hypocreaceae te obuhvaća brojne vrste koje nastanjuju različite ekološke niše. Najčešće se izoliraju iz tla, rizosfere biljaka, raspadajućeg biljnog materijala i drva. Vrste ovoga roda poznate su po brzom rastu, sposobnosti razgradnje organskih tvari te izraženu antagonističkom djelovanju prema brojnim fitopatogenim gljivama (Khan i sur., 2020.). Upravo zbog tih svojstava naširoko se primjenjuju u biološkoj zaštiti bilja, bioremedijaciji i industrijskoj proizvodnji enzima.

Razvojem molekularne sistematike značajno se promijenilo razumijevanje raznolikosti vrsta iz roda *Trichoderma*. Mnoge vrste koje su se prije smatrale morfološki jedinstvenima danas su prepoznate kao kompleksi kriptičnih vrsta koje se mogu pouzdano razlikovati tek analizom DNA sekvencija (Druzhinina i sur., 2010.). Zbog toga se suvremena determinacija temelji na kombiniranju morfoloških i molekularnih podataka. Ovim će se radom prikazati razvoj metoda determinacije vrsta roda *Trichoderma*, usporedit će se njihove mogućnosti i ograničenja te će se objasniti zašto se integrativni pristup smatra suvremenim standardom.

Taksonomska raznolikost roda *Trichoderma*

Vrste iz roda *Trichoderma* pripadaju koljenu Ascomycota, razredu Sordariomycetes i porodici Hypocreaceae te obuhvaćaju velik broj vrsta naširoko rasprostranjenih u različitim kopnenim ekosustavima. Vrste ovoga roda najčešće se izoliraju iz tla, osobito iz rizosfere biljaka, ali se mogu pronaći i u kompostu, razgrađenu biljnom materijalu, drvu te različitim organskim supstratima (Contreras-Cornejo i sur., 2016.; Topolovec-Pintarić, 2019.). Njihova ekološka prilagodljivost i metabolička raznolikost omogućuju im uspješno naseljavanje različitih staništa (Druzhinina i Kubicek, 2013.; Silva i sur., 2014.).

Taksonomska raznolikost roda *Trichoderma* značajno se povećala razvojem molekularnih metoda identifikacije (Druzhinina i Kubicek, 2005.). Dok se prije broj vrsta temeljio primarno na morfološkim karakteristikama, danas je poznato da mnoge morfološki slične populacije zapravo predstavljaju genski različite, tzv. kriptične vrste (Cai i Druzhinina, 2021.). Kao rezultat toga, broj opisanih vrsta kontinuirano raste, a rod trenutačno obuhvaća nekoliko stotina validno opisanih taksona.

Unutar roda prisutni su brojni kompleksni skupovi blisko srodnih vrsta, među kojima su najpoznatiji kompleks *T. harzianum*, kompleks *T. koningii*, kompleks *T. virens* te kompleks *T. longibrachiatum*. Vrste unutar ovih kompleksa često pokazuju vrlo slična morfološka obilježja, što otežava njihovu pouzdanu identifikaciju isključivo na temelju fenotipa. Upravo su se zbog toga ti kompleksi pokazali ključnima u razvoju molekularne taksonomije roda *Trichoderma*.

Ekološki gledano, vrste roda *Trichoderma* imaju važnu ulogu u razgradnji organske tvari i kruženju hranjivih elemenata u tlu (Woo i sur., 2023.). Također su poznate po izraženoj antagonističkoj aktivnosti prema brojnim fitopatogenim gljivama, što ih čini važnim organizmima u biološkom suzbijanju biljnih bolesti. Ova svojstva dodatno su potaknula istraživanja njihove raznolikosti i distribucije u različitim agroekološkim sustavima.

Suvremena taksonomija roda *Trichoderma* temelji se na integraciji morfoloških, molekularnih i filogenskih podataka. Poseban naglasak stavlja se na višegenske analize koje uključuju ITS regiju, *tef1-α* i *rpb2* gene, čime se postiže veća razlučivost među blisko srodnim vrstama. Ovakav integrativni pristup omogućuje preciznije razgraničenje vrsta te bolju interpretaciju njihove evolucijske povezanosti i ekološke uloge.

Zbog kombinacije velike morfološke varijabilnosti i prisutnosti kriptičnih vrsta, rod *Trichoderma* jedan je od najizazovnijih taksona u mikologiji. Istodobno, njegova taksonomska složenost čini ga modelnim sustavom za razvoj i primjenu suvremenih molekularnih i integrativnih metoda u identifikaciji gljiva.

Morfološke metode determinacije

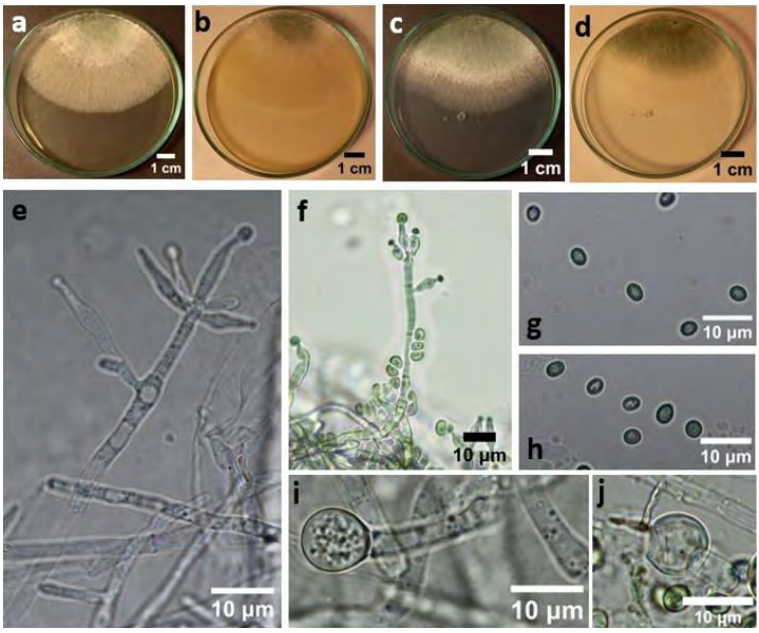
Morfološka determinacija vrsta roda *Trichoderma* obilježena je tradicionalnim pristupom identifikaciji koji se temelji na makroskopskim i mikroskopskim obilježjima gljivičnih kultura (Devi i sur, 2012.). Iako je u suvremenoj taksonomiji u velikoj mjeri nadopunjena molekularnim metodama, morfologija i dalje ima važnu ulogu u preliminarnoj identifikaciji i karakterizaciji izolata.

Makroskopska i mikroskopska obilježja kolonija

Makroskopska analiza uključuje promatranje rasta i izgleda kolonija na standardnim hranjivim podlogama, najčešće na krumpirovu dekstroznom agaru (PDA) ili sličnim medijima (Gams i Bissett, 2002.). Vrste roda *Trichoderma* karakterizira brz rast micelija, pri čemu kolonije u kratkom vremenu mogu prekriti veći dio Petrijeve zdjelice (Samuels, 2006.). U početnim fazama razvoja kolonije su obično bijele zbog obilnog vegetativnog micelija, a tijekom sporulacije postupno prelaze u različite nijanse zelene boje, što je posljedica stvaranja velikog broja konidija (Siddiquee, 2017.). Često se uočava i zonalna struktura kolonije u obliku koncentričnih prstena, koja je povezana s ritmom rasta i sporulacije (Jaklitsch i sur., 2012.). Površina kolonije može biti pamučasta, vunasta, kompaktna ili praškasta, ovisno o vrsti i uvjetima uzgoja (Topolovec-Pintarić, 2019.). Također se može pojaviti difuzna pigmentacija podloge, koja varira od žućkastih do zelenkastih tonova (Siddiquee, 2017.).

Mikroskopska analiza ključna je za identifikaciju vrsta iz roda *Trichoderma*, a podrazumijeva promatranje struktura poput konidiofora, fijalida, konidija i hlamidospora (slika 1) (Chaverri i sur., 2003.). Konidiofori su obično razgranati, često piramidalnog izgleda, s izraženim grananjem koje završava skupinama fijalida (Gams i Bissett, 2002.). Fijalide su najčešće bačvaste do kruškolike, rijetko cilindrične, raspoređene pojedinačno ili u pršljenovima, te na tim mjestima nastaju konidije (Samuels i sur., 2012.). Konidije su male, jednostanične, glatke i najčešće kuglaste do subkuglaste ili blago elipsoidne. U

zrelom stadiju nalaze se u sluzavim nakupinama na vrhovima fijalida, što je karakteristično obilježje roda (Gams i Bissett, 2002.). Osim toga, kod pojedinih vrsta mogu se razvijati i hlamidospore, koje imaju ulogu u preživljavanju nepovoljnih uvjeta (Harman i Kubicek, 2002.).



Slika 1. Morfološka obilježja vrste *Trichoderma koningiopsis* (a-b) tri dana stare aksenične kulture na MA, c-d) tri dana stare aksenične kulture na PDA, e-f) konidiofori s fijalidama, g-h) konidije, i) terminalna hlamidospora, j) interkalarna hlamidospora (Snimila: M. Stvorić, 2023.)

Figure 1. Morphological characteristics of the species Trichoderma koningiopsis (a-b) three-day-old axenic culture on MA, c-d) three-day-old axenic culture on PDA, e-f) conidiophores with phialides, g-h) conidia, i) terminal chlamydospore, j) intercalary chlamydospore (Photo: M. Stvorić, 2023.)

Prednosti i ograničenja morfološke identifikacije

Morfološke metode imaju nekoliko važnih prednosti. Relativno su jednostavne za provedbu, ne zahtijevaju složenu opremu te omogućuju brzu preliminarnu identifikaciju izolata. Također pružaju uvid u fenotipske karakteristike gljive, što može biti korisno u ekološkim i fiziološkim istraživanjima. Unatoč navedenim prednostima, morfološka determinacija ima značajna ograničenja. Fenotipska obilježja mogu varirati ovisno o uvjetima uzgoja, kao što su temperatura, sastav hranjive podloge i starost kulture. Nadalje, mnoge vrste unutar roda *Trichoderma* pokazuju vrlo slične morfološke karakteristike, što otežava njihovo pouzdano razdvajanje (Kumar i Sharma,

2016). Poseban su problem kriptične vrste unutar kompleksa, kao što su *T. harzianum* i *T. koningii*, koje se ne mogu jasno razlikovati isključivo na temelju morfologije (Cai i Druzhinina, 2021.). Zbog toga se morfološke metode danas najčešće koriste u kombinaciji s molekularnim tehnikama u okviru integrativnog pristupa identifikaciji.

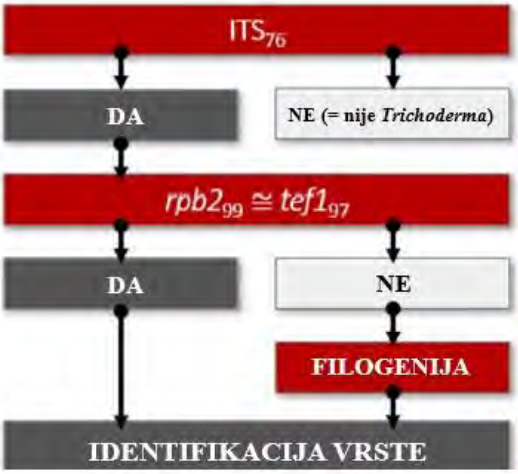
Molekularna analiza vrsta roda *Trichoderma*

Razvoj molekularnih metoda značajno je unaprijedio determinaciju vrsta roda *Trichoderma*, omogućujući pouzdaniju identifikaciju u odnosu na tradicionalne morfološke pristupe. Velika morfološka sličnost među vrstama te postojanje kriptičnih vrsta često otežavaju njihovo razlikovanje isključivo na temelju fenotipskih obilježja (Kumar i Sharma, 2016.). Zbog toga se u suvremenoj mikologiji sve češće primjenjuju metode koje se temelje na analizi DNA.

Prvi korak molekularne analize je izolacija genomske DNA iz čiste kulture gljive (Iotti i sur., 2005.). Nakon izolacije slijedi umnožavanje odabranih ciljnih regija DNA metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) (Gezgin i sur., 2023.). Za identifikaciju gljiva najčešće se koristi unutarnja transkribirana razmaknica (Internal Transcribed Spacer, ITS genska regija) ribosomske DNA, koja je prihvaćena kao standardni DNA barkod za gljive zbog odgovarajuće razine varijabilnosti među vrstama (Xu, 2016.). Iako ITS regija omogućuje identifikaciju velikog broja vrsta roda *Trichoderma*, kod pojedinih kompleksa blisko srodnih vrsta, ITS regija nije dovoljno varijabilna (Cai i Druzhinina, 2021.). Zbog toga se u novijim istraživanjima često analiziraju i dodatni molekularni biljezi, poput gena za translacijski elongacijski faktor 1-α (*tef1-α*), gena za drugu podjedinicu RNA-polimeraze II (*rpb2*) te drugih proteinski kodirajućih gena (Cai i sur., 2022.). Kombinirana analiza više biljega (ITS, rpb2 i tef1-α) (slika 2) omogućuje znatno veću razlučivost i pouzdaniju determinaciju vrsta (Dou i sur., 2020.).

Nakon PCR umnožavanja dobiveni produkti podvrgavaju se sekvenciranju. Dobivene nukleotidne sekvencije uspoređuju se s referentnim sekvencijama pohranjenima u međunarodnim bazama podataka, kao što su GenBank ili specijalizirane baze podataka i identifikacijski sustavi za rod *Trichoderma* – TrichoBLAST (baza provjerenih referentnih sekvencija i alat za njihovu usporedbu), TrichoKEY (identifikacijski alat utemeljen prije svega na ITS-sekvencijama), MIST (Multilocus Identification System for Trichoderma) – sustav za višelokusnu identifikaciju uporabom markera ITS, *tef1* i *rpb2*. Najčešće se za usporedbu koristi BLAST algoritam, kojim se određuje stupanj podudarnosti analizirane sekvencije s prethodno identificiranim vrstama (Kopchinskiy i sur., 2005.). Novija literatura za identifikaciju vrsta iz roda *Trichoderma* preporučuje upravo TrichoBLAST i TrichoKEY, a ne oslanjanje isključivo na GenBank (Cai i sur., 2022.). GenBank sadrži velik broj sekvencija, ali nisu sve jednako pouzdano taksonomski određene, pa se za konačnu

identifikaciju preporučuju specijalizirane referentne baze. Uz usporedbu sekvencija, molekularna determinacija često uključuje i filogenske analize (Jaklitsch i Voglmayr, 2015.). Izradom filogenskih stabala moguće je prikazati evolucijske odnose među izolatima te potvrditi njihovu pripadnost određenoj vrsti ili kompleksu vrsta.



Slika 2. Barkod lokusi važni za identifikaciju vrsta iz roda *Trichoderma* (Cai F., Druzhinina I. S., 2021. https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-020-00464-4, pristupljeno 30. 6. 2026.)
Figure 2. Barcode loci important for the identification of species from the genus *Trichoderma* (Cai F., Druzhinina I. S., 2021. https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-020-00464-4, accessed 30. 6. 2026)

Osnovne prednosti molekularnih metoda su visoka točnost, mogućnost razlikovanja morfološki vrlo sličnih ili kriptičnih vrsta te pouzdana ponovljivost rezultata. Međutim, njihova primjena zahtijeva specijaliziranu laboratorijsku opremu, odgovarajuću stručnost te kvalitetne referentne baze podataka.

Usporedba morfoloških i molekularnih metoda

Morfološke i molekularne metode imaju različite prednosti te se međusobno nadopunjuju. Morfološka analiza omogućuje brzu preliminarnu identifikaciju i pruža informacije o fenotipskim obilježjima izolata, dok molekularne metode osiguravaju pouzdanu determinaciju do razine vrste. Brojna istraživanja pokazala su da pojedine vrste roda *Trichoderma* posjeduju gotovo identična morfološka obilježja, zbog čega ih nije moguće razlikovati isključivo mikroskopskom analizom. Istodobno, molekularna analiza bez morfološke provjere može dovesti do pogrešne interpretacije ako su sekvencije loše kvalitete ili ako referentne baze nisu dovoljno ažurirane. Stoga se u suvremenoj taksonomiji preporučuje integrativni pristup koji kombinira morfološke

značajke, molekularne biljege, filogenske analize te, prema potrebi, ekološke i fiziološke podatke.

Integrativna determinacija vrsta roda *Trichoderma*

Integrativna taksonomija pristup je u kojemu se za identifikaciju vrsta koristi više neovisnih izvora podataka. Kod vrsta iz roda *Trichoderma* to podrazumijeva kombiniranje morfoloških obilježja s analizom DNA sekvencija i filogenskim metodama. Takav pristup povećava pouzdanost identifikacije, smanjuje mogućnost pogrešaka te omogućuje otkrivanje novih i kriptičnih vrsta (Cai i Druzhinina, 2021.). Istodobno pruža čvršću osnovu za istraživanja biološke kontrole, ekologije tla i biotehnološke primjene tih gljiva.

ZAKLJUČAK

Pouzdana determinacija vrsta iz roda *Trichoderma* iznimno je važna za primjenu u znanosti, poljoprivredi i biotehnologiji. Morfološke metode vrijedan su alat za početnu identifikaciju, ali zbog njihove ograničene razlučivosti često nisu dovoljne za određivanje vrste. Molekularne metode značajno povećavaju točnost identifikacije, osobito kada se koriste višestruki molekularni biljezi. Integrativni pristup, koji objedinjuje morfološke i molekularne podatke, danas je najpouzdaniji i najprihvaćeniji način determinacije vrsta roda *Trichoderma*. Napredak tehnologija sekvenciranja omogućio je razvoj novih pristupa poput sekvenciranja cijelog genoma, metabarkodiranja i višegenske filogenije. Očekuje se da će integracija ovih metoda dodatno unaprijediti taksonomiju roda *Trichoderma* i omogućiti bolje razumijevanje njihove evolucije, ekologije i funkcionalne raznolikosti.

INTEGRATIVE DETERMINATION OF SPECIES OF THE GENUS *TRICHODERMA*: COMPARISON OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

SUMMARY

The genus *Trichoderma* includes a large number of ecologically and economically important fungi widely distributed in the soil, rhizosphere of plants and various organic substrates. Due to their role in biological control of phytopathogens, decomposition of organic matter and applications in biotechnology and enzyme production, accurate and reliable species identification is a key prerequisite for their further use. Traditional morphological determination is based on macroscopic and microscopic characteristics of cultured cultures, analyzing the characteristics of colonies and the detailed structure of conidiophores, phialides, conidia and, when present, chlamydospores. These structures are described based on shape, size,

arrangement, and mode of formation, but morphological variability within the genus often limits the reliability of identification. Molecular identification begins with the isolation of genomic DNA, followed by amplification of target gene regions using the polymerase chain reaction (PCR) method. The most frequently analyzed regions include ITS (Internal Transcribed Spacer), and genes for translation elongation factor 1-α (*tef1-α*) and the second subunit of RNA polymerase II (*rpb2*). The obtained sequences are compared with reference sequences in international databases, such as GenBank and specialized databases for the genus *Trichoderma*, with identification being made based on the degree of similarity and phylogenetic affiliation. The aim of this review is to present and compare morphological and molecular methods for identifying species of the genus *Trichoderma*, highlight their advantages and limitations, and emphasize the importance of an integrative approach that combines phenotypic and genetic data in modern taxonomy.

Keywords: *Trichoderma*, morphological determination, molecular identification, barcode loci, integrative taxonomy

LITERATURA

Cai F., Dou K., Wang P., Chenthamara K., Chen J., Druzhinina I. S. (2022). The current state of *Trichoderma* taxonomy and species identification. In Advances in *Trichoderma* biology for agricultural applications (pp. 3-35). Cham: Springer International Publishing.

Cai F., Druzhinina I. S. (2021). In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. Fungal diversity, 107(1), 1-69.

Chaverri P., Castlebury L. A., Overton B. E., Samuels G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia, 95(6), 1100-1140.

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.

Devi T. P., Prabhakaran N., Kamil D., Borah J. L., Pandey P. (2012). Development of species specific markers for detection of *Trichoderma* species. Vegetos, 25(2), 207-217.

Dou K., Lu Z., Wu Q., Ni M., Yu C., Wang M., Xie H., Chen J., Zhang C. (2020). MIST: A multilocus identification system for *Trichoderma*. Applied and Environmental Microbiology, 86(18), e01532-20.

Druzhinina I. S., Kubicek C. P. (2013). Ecological genomics of *Trichoderma*. The ecological genomics of fungi, 89-116.

Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Komoń-Zelazowska M., Mulaw T. B., Bissett J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. BMC Evolutionary Biology, 10(1), 94.

Druzhinina I., Kubicek C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters?. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 6(2), 100-112.

Gams W., Bissett J. (2002). Morphology and identification of *Trichoderma*. *Trichoderma* and *Gliocladium*, 1, 3-34.

Gezgin Y., Güralp G., Barlas A. B., Eltem R. (2023). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates used as biocontrol agents by DNA barcoding. European Journal of Biology, 82(1), 59-69.

Harman G. E., Kubicek C. P. (2002). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. CRC press., 7.

Iotti M., Barbieri E., Stocchi V., Zambonelli A. (2005). Morphological and molecular characterisation of mycelia of ectomycorrhizal fungi in pure culture. Fungal Divers, 19, 51-68.

Jaklitsch W. M., Stadler M., Voglmayr H. (2012). Blue pigment in *Hypocrea caerulescens* sp. nov. and two additional new species in sect. *Trichoderma*. Mycologia, 104(4), 925-941.

Jaklitsch W. M., Voglmayr H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in southern Europe and Macaronesia. Studies in mycology, 80, 1-87.

Khan R. A. A., Najeeb S., Hussain S., Xie B., Li Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. Microorganisms, 8(6), 817.

Kopchinskiy A., Komoń M., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2005). TrichoBLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. Mycological research, 109(6), 658-660.

Kumar M., Sharma P. (2016). Morphological characterization of biocontrol isolates of *Trichoderma* to study the correlation between morphological characters and biocontrol efficacy. International Letters of Natural Sciences, 55.

Samuels G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology, 96(2), 195-206.

Siddiquee S. (2017). Morphology-based characterization of *Trichoderma* species. In Practical handbook of the biology and molecular diversity of *Trichoderma* species from tropical regions (pp. 41-73). Cham: Springer International Publishing.

Silva R. N., Steindorff A. S., Monteiro V. N. (2014). Metabolic diversity of *Trichoderma*. In Biotechnology and biology of *Trichoderma* (pp. 363-376). Elsevier.

Topolovec-Pintarić S. (2019). *Trichoderma*: invisible partner for visible impact on agriculture. In *Trichoderma*-the most widely used fungicide. IntechOpen, 15.

Woo S. L., Hermosa R., Lorito M., Monte E. (2023). *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. Nature Reviews Microbiology, 21(5), 312-326.

Xu J. (2016). Fungal DNA barcoding. Genome, 59(11), 913-932.

Pregledni rad