

**BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU**

Dejana D. Kosanović

**Vrste roda *Trichoderma*, uzročnici zelene plesni
šampinjona [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] i
njihova osetljivost na fungicide i biofungicide**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

**FACULTY OF BIOLOGY
UNIVERSITY OF BELGRADE**

Dejana D. Kosanović

***Trichoderma* species causing green mould disease of
button mushroom [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach]
and their sensitivity to fungicides and biofungicides**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

dr Ivana Potočnik, viši naučni saradnik, mentor
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu

dr Jelena Vukojević, redovni profesor, mentor
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Mirjana Stajić, vanredni profesor
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Bojan Duduk, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu

Beograd, _____

Mojim radom su rukovodile mentor dr Ivana Potočnik, viši naučni saradnik Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu, i mentor prof. dr Jelena Vukojević, redovni profesor na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Rad je urađen u Laboratoriju za primenjenu fitopatologiju, Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu-Zemunu.

Ovog rada ne bi bilo da nije bilo ljudi kojima se najsrdačnije zahvaljujem:

dr Ivani Potočnik, višem naučnom saradniku Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu, na velikoj pomoći, podršci, razumevanju, strpljenju i savetima koje mi je tokom svih godina zajedničkog rada pružila,

redovnom profesoru dr Jeleni Vukojević i vanrednom profesoru dr Mirjani Stajić na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu na dragocenim stručnim savetima, pomoći i podršci oko izrade disertacije i publikovanju radova,

članu komisije dr Bojanu Duduku, naučnom savetniku, šefu Laboratorije za primenjenu fitopatologiju, Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Beogradu, za pažnju koju je posvetio ovom radu, na korisnim sugestijama i pomoći oko molekularno-bioloških metoda,

koleginicama i kolegama iz Laboratorije za primenjenu fitopatologiju i celom kolektivu Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine na pomoći, savetima i podršci,

Sladani i Novici Novaković, vlasnicima kompostare “Uča & co.”, Vranovo, Smederevo, na poklonjenom kompostu za gajenje šampinjona i pokrivci za eksperimentalni rad,

svim vlasnicima gajilišta šampinjona iz kojih su prikupljeni izolati,

šefovima dr Marijani Stojanović i prof. dr Katici Jovanovoj-Nešić, koleginicama dr Aleksandri Inić-Kanada, dr Aleksandri Sojković, Irini Maslovarić, Ivani Lukić, Emiliji Marinković, Ani Filipović i kolektivu Instituta za virusologiju, vakcine i serume – Torlak u Beogradu,

mojoj porodici, Draganu, Marici i Oliveri Kosanović na čiju podršku sam uvek mogla da računam.

Autor

REZIME

Pojedine vrste roda *Trichoderma* su uzročnici zelene plesni šampinjona (*Agaricus bisporus*) i nanose velike materijalne štete u gajilištima. Od 2006. do 2010. godine prikupljeno je 20 izolata roda *Trichoderma* iz 13 gajilišta u Srbiji i jednog iz Bosne i Hercegovine. Dvanaest izolata je klasifikovano na osnovu standardnih mikoloških metoda i analizom ITS1/ITS4 sekvence u pet vrsta: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* i *Trichoderma harzianum*. Osam izolata nije identifikovano do nivoa vrste ali je pokazano da su filogenetski bliski sa vrstom *T. harzianum*. Najvišu virulentnost na ubranom šeširu *A. bisporus* je pokazala vrsta *T. harzianum*, a najnižu *T. virens* i *T. aggressivum* f. *europaeum*.

Većina izolata je najbolje rasla na podlozi koja je imala pH = 5, potom na pH = 6, par izolata na pH = 7, dok je najslabiji rast zabeležen na pH = 8 – 9. Generalno, svetlost je imala inhibitorni efekat na rast izolata. Fungicidi su u širokoj upotrebi u kontroli bolesti šampinjona, iako je kontrola zelene plesni otežana. Stoga, jedan od ciljeva istraživanja je bio da se ispita *in vitro* toksičnost nekoliko dostupnih komercijalnih fungicida na prikupljene izolate roda *Trichoderma*. Testirani izolati su bili najosetljiviji na prothloraz-Mn, hlorotalonil i karbendazim ($EC_{50} < 1$ mg/L), osetljiviji na iprodion ($EC_{50} = 0,84 - 6,72$ mg/L), umereno rezistentni na tiofanat-metil ($EC_{50} = 3,75 - 24,13$ mg/L) i rezistentni na trifloksistrobin ($EC_{50} = 10,25 - 178,23$ mg/L). Proučavajući toksičnost fungicida na *A. bisporus*, najbolju selektivnu toksičnost su pokazali prothloraz-Mn (0,05) i karbendazim (0,02), iprodion i hlorotalonil umereno (0,16), tiofanat-metil najnižu (1,24), dok toksičnost trifloksistrobina za *A. bisporus* nije testirana zbog nezadovoljavajuće toksičnosti za *Trichoderma* spp. izolate.

Najbolju selektivnu toksičnost za patogenu gljivu i gljivu domaćina su pokazali prothloraz-Mn i karbendazim sa vrednostima nižim od 0,1. Pošto se karbendazim povlači sa tržišta, prothloraz-Mn je fungicid koji se može preporučiti za primenu u gajilištima za suzbijanje zelene plesni.

Antifungalna aktivnost dva biofungicida, na bazi *Bacillus subtilis* i ulja čajnog drveta, je testirana *in vitro* na sve *Trichoderma* spp. izolate. *B. subtilis* je bio visoko toksičan za sve testirane izolate ($EC_{50} < 1,3$ mg/L), dok ulje čajnog drveta nije pokazalo značajnu antifungalnu aktivnost ($EC_{50} = 11,9 - 370,8$ mg/L).

Efikasnost biofungicida protiv vrste *T. harzianum* je ocenjena u oglednom gajilištu. Biofungicidi su primenjeni zasebno ili u kombinaciji sa fungicidom, prothloraz-Mn, u proporciji 20:80%. Prothloraz-Mn se pokazao efikasnijim od oba biofungicida kao i od kombinovane primene biofungicida i fungicida. Biofungicid na bazi *B. subtilis* je bio efikasniji od ulja čajnog drveta u pogledu sprečavanja pojave simptoma bolesti. Takođe, *B. subtilis* je pokazao manji antagonistički efekat u efikasnosti protiv patogena od ulja čajnog drveta kada se primenjuju u kombinaciji sa prothloraz-Mn fungicidom.

Ključne reči: *Agaricus bisporus*, *Trichoderma* spp, filogenija, antifungalna aktivnost, komercijalni fungicidi, biofungicidi, selektivna toksičnost.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikologija

UDK broj: [635.82 : [632.482+582.282]] : 632.951

ABSTRACT

Trichoderma species, the causal agents of green mould disease, induce great losses in button mushroom (*Agaricus bisporus*) farms. Twenty *Trichoderma* isolates were collected on 13 Serbian *A. bisporus* farms and one in Bosnia and Herzegovina during 2006 – 2010. Twelve isolates were classified into five species by standard mycological studies and ITS1/ITS4 sequence analyses, namely *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and *Trichoderma harzianum*. Eight isolates were not identified to the species level but were shown to be related to *T. harzianum*. The isolates of *T. harzianum* exhibited the highest virulence to the harvested *A. bisporus* pilei and *T. virens* and *T. aggressivum* f. *europaeum* the lowest.

Fungicides are widely used to control mushroom diseases although green mould control is encumbered with difficulties. The aims of this study were therefore to research *in vitro* toxicity of several commercial fungicides to *Trichoderma* isolates originating from Serbian and Bosnia-Herzegovina farms, and to evaluate the effects of pH and light on their growth. The majority of isolates demonstrated optimal growth at pH 5.0, and the rest at pH 6.0. A few isolates also grew well at pH 7. The weakest mycelial growth was noted at pH 8.0 – 9.0. Generally, light had an inhibitory effect on the growth of tested isolates. The isolates showed the highest susceptibility to prochloraz-Mn, chlorothalonil and carbendazim (ED₅₀ less than 1 mg/L), and were less sensitive to iprodione (ED₅₀ ranged 0.84 – 6.72 mg/L), weakly resistant to thiophanate-methyl (ED₅₀ = 3.75 – 24.13 mg/L), and resistant to trifloxystrobin (ED₅₀ = 10.25 – 178.23 mg/L). Considering the toxicity of fungicides to *A. bisporus*, prochloraz-Mn and carbendazim showed the best selective toxicity (0.05 and 0.02 respectively), iprodione and chlorothalonil moderate (0.16), and thiophanate-methyl the lowest (1.24), while trifloxystrobin toxicity to *A. bisporus* was not tested because of its inefficiency against *Trichoderma* isolates.

The best selective toxicity to both pathogen and the host showed prochloraz-Mn and carbendazim with values less than 0.1. Carbendazim was withdrawn from the market and therefore prochloraz-Mn could be recommended for mushroom cultivation in Serbia.

Antifungal activity of two biofungicides based on *Bacillus subtilis* and tea tree oil were tested *in vitro* to all *Trichoderma* isolates. *B. subtilis* was highly toxic to all tested *Trichoderma* isolates, their ED₅₀ values were below 1.3 mg/L. Tea tree oil did not exhibit a significant antifungal activity (ED₅₀ = 11.9 – 370.8 mg/L).

The efficacy of biofungicides was evaluated against *T. harzianum* in a mushroom growing room, and they were applied alone or in combination with the fungicide at a respective proportion of 20:80%. Prochloraz-Mn showed higher efficacy than both tested biofungicides or their respective mixtures. The biofungicide based on *B. subtilis* demonstrated greater efficacy in preventing disease symptoms than tea tree oil. *B. subtilis* combined with the fungicide revealed less antagonism in efficacy against pathogen than tea tree oil.

Key words: *Agaricus bisporus*, *Trichoderma* spp, phylogenetic relationship, antifungal activity, fungicides, biofungicides efficacy, synergy factor, selective toxicity.

Science Field: Biology

Special Topic: Mycology

UDC number: [635.82 : [632.482+582.282]] : 632.951

LISTA SKRAĆENICA

<i>act1</i>	Aktin
ANOVA	Analiza varijanse
ATP	Adenozin-trifosfat
BE	Biološka efikasnost
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>cal1</i>	Kalmodulin
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CMD	Podloga od kukuruznog brašna
DMI fungicid	Inhibitor demetilacije ergosterola
EC₅₀	Koncentracije fungicida koja inhibira rast micelije 50%
<i>ech42</i>	Endohitinaza 42
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
MA	Malt agar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Krompir dekstrozni agar
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<i>rpb2</i>	RNK polimeraza B subjedinice 2
ssu-mDNK	Mala subjedinica mitohondrijalne rDNK
<i>tef1</i>	Translacioni elongacioni faktor 1-alfa

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Klasifikacija roda <i>Trichoderma</i>	1
1.2. Sekundarni metaboliti roda <i>Trichoderma</i> i njihova primena	7
1.3. Celulolitički enzimski sistem vrsta roda <i>Trichoderma</i> i primena	10
1.4. Vrste roda <i>Trichoderma</i> uzročnici zelene plesni šampinjona	11
1.4.1. Interakcija između <i>Trichoderma</i> spp. i <i>Agaricus bisporus</i> u kompostu	14
1.4.2. Epidemiologija uzročnika zelene plesni šampinjona	16
1.4.3. Prevencija i suzbijanje <i>Trichoderma</i> spp. u gajilištu <i>Agaricus bisporus</i>	17
1.4.3.1. Prevencija pojave bolesti	17
1.4.3.2. Suzbijanje zelene plesni hemijskim i biološkim sredstvima	18
2. CILJEVI RADA	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Uzorkovanje	22
3.2. Izolacije i uslovi gajenja	24
3.3. Molekularne metode	25
3.4. Test virulentnosti	26
3.5. <i>In vitro</i> test za određivanje antifungalne aktivnosti	27
3.6. <i>In vivo</i> test za procenu efikasnosti fungicida u suzbijanju <i>Trichoderma harzianum</i>	28
3.7. Testirana antifungalna jedinjenja	30
3.7.1. Fungicidi	30
3.7.2. Biofungicidi	32
3.8. Statistička analiza	32
4. REZULTATI I DISKUSIJA	33
4.1. Simptomi zelene plesni	33
4.2. Morfo-fiziološke karakteristike i identifikacija dobijenih izolata	34
4.2.1. <i>Trichoderma atroviride</i> P. Karsten	35
4.2.2. <i>Trichoderma koningii</i> Oudem	38
4.2.3. <i>Trichoderma virens</i> (Miller, Giddens & Foster) Arx	39

4.2.4. <i>Trichoderma aggressivum</i> Samuels & Gams f. <i>europaeum</i>	39
4.2.5. <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.....	40
4.2.6. <i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	40
4.2.7. <i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	41
4.2.8. <i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	41
4.3. Filogenetski odnosi izolata	42
4.4. Uticaj uslova kultivacije na rast <i>Trichoderma</i> spp.	44
4.4.1. Sastav podloge	44
4.4.2. Temperatura	50
4.4.3. pH podloge.....	52
4.4.4. Uticaj svetlosti na rast <i>Trichoderma</i> izolata	54
4.5. Provera patogenosti i virulentnosti <i>Trichoderma</i> spp. izolata.	55
4.6. Antifungalna aktivnost testiranih fungicida na izolate	
<i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	59
4.6.1. Imidazoli: Prohloraz-Mn.....	60
4.6.2. Hlornitrili: Hlorotalonil.....	63
4.6.3. Benzimidazoli	65
4.6.3.1. Karbendazim	65
4.6.3.2. Tiofanat-metil	67
4.6.4. Dikarboksimidi: Iprodion.....	69
4.6.5. Strobilurini: Trifloksistrobin.....	71
4.7. Antifungalna aktivnost testiranih biofungicida na izolate	
<i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	73
4.7.1. Biofungicid na bazi ulja čajnog drveta	73
4.7.2. Biofungicid na bazi <i>Bacillus subtilis</i>	75
4.8. Selektivna fungitoksičnost testiranih fungicida i biofungicida za	
<i>Trichoderma</i> spp. i <i>Agaricus bisporus</i>	77
4.9. Efikasnost fungicida prohloraz-Mn, biofungicida na bazi ulja čajnog drveta i	
<i>Bacillus subtilis</i> u suzbijanju <i>Trichoderma harzianum</i> u uslovima <i>in vivo</i>	79
5. ZAKLJUČCI.....	85
6. LITERATURA	87

1. Uvod

1.1. Klasifikacija roda *Trichoderma*

Vrste roda *Trichoderma* su filamentozne gljive koje uglavnom žive u zemljištu, a njihov teleomorfni stadijum pripada rodu *Hypocrea* (Ascomycotina, Pyrenomycetes, Hypocreales, Hypocreaceae). Vrste ovog roda su najčešće gajene mikromicete za primenu u različitim biotehnološkim procesima zahvaljujući svojim specifičnim karakteristikama. Imaju naglašenu sposobnost kompeticije za prostor i hranljive materije, poznate su po antagonističkom efektu na veliki broj fitopatogenih organizama, mikoparazitizmu, antibiozama, stimulativnom efektu na klijanje semena i rast biljaka i indukciji odbrambenih mehanizama (**Papavizas**, 1985; **Kubicek i Penttilä**, 1998; **Sivasithamparam i Ghisalberti**, 1998). Međutim, većina vrsta su paraziti gajenih gljiva, a nekoliko predstavnika su izazivači oportunističkih infekcija kod imunokompromitovanih osoba (**Gams i Meyer**, 1998; **Kuhls i dr.**, 1999).

Iako je danas identifikovano preko 100 vrsta roda *Trichoderma*, do 1969. godine se smatralo da postoji samo jedna vrsta, *Trichoderma viride* Pers., jer se vrste morfološki vrlo malo razlikuju (**Druzhinina i dr.**, 2006). **Persoon** (1794) je na osnovu uzoraka prikupljenih u Nemačkoj, prvi opisao rod *Trichoderma* i četiri vrste unutar roda. Kasnija istraživanja su pokazala da je samo jedna od njih, *T. viride*, zaista i pripadala rodu *Trichoderma* (**Druzhinina i dr.**, 2006). Braća **Tulasne** iz Francuske su u 19. veku ustanovila da je *T. viride* anamorf *Hypocrea rufa* (**Tulasne i Tulasne**, 1865), a holomorf je potvrđen uspešnom izolacijom jedne askospore *H. rufa* i dobijanjem anamorfa tj. *T. viride* u kulturi (**Brefeld**, 1891). **Gilman i Abbott** (1927) su na osnovu izgleda kolonija, oblika i pigmentacije konidija ponudili ključ za identifikaciju vrsta roda *Trichoderma*. Međutim, na osnovu morfoloških karakteristika **Bisby** (1939) nije mogao da razlikuje vrste i zaključio je da postoji samo jedna vrsta, *T. viride*. Monofiletski rod se zadržao sve dok **Rifai** (1969) nije opisao devet agregatnih vrsta: *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai i *T. viride*.

Rifai i Webster (1966a, b) i **Rifai** (1969) su istakli da svaka agregatna (kompleksna) vrsta najverovatnije obuhvata dve ili više vrsta koje se ne mogu razlikovati na osnovu morfo-fizioloških karakteristika. Dve decenije kasnije povećan je broj kriterijuma za klasifikaciju baziranu na morfološkim karakteristikama, uključene su i pojedine vrste roda *Gliocladium*, i 27 vrsta je klasifikovano u pet sekcija: *Trichoderma*, *Pachibasium*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* i *Hypocreanum* (**Bisset** 1984, 1991a, b, c, 1992; **Gams i Bissett**, 1998). Bilo je očigledno da je identifikacija otežana zbog velikih morfoloških sličnosti među vrstama. Razvojem molekularno-bioloških metoda identifikacije izmenjena je taksonomija zasnovana na morfološkom konceptu, određene su nove vrste i definisani filogenetski odnosi unutar roda *Trichoderma* (**Kullnig-Gradinger i dr.**, 2002; **Druzhinina i Kubicek**, 2005). Molekularno-filogenetska analiza je u velikoj meri potvrdila taksonomiju zasnovanu na fenotipskim karakteristikama koju je predložio **Bissett** (1984, 1991a, b, c, 1992) (Tabela 1). Zabeležene razlike su bile pridruživanje sekcije *Saturnisporum* sekciji *Longibrachiatum*, podela sekcije *Pachybasium* na podsekcije *Pachybasium* A i *Pachybasium* B, dok su *T. hamatum*, *T. pubescens* Bissett i *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg iz podsekcije *Pachybasium* A pridružene sekciji *Trichoderma* (**Kuhls i dr.**, 1997; **Kindermann i dr.**, 1998; **Samuels i dr.**, 1998; **Kullnig-Gradinger i dr.**, 2002).

Tabela 1. Klasifikacija roda *Trichoderma/Hypocrea* prema **Druzhiniĭa i Kubicek** (2005)

<i>Sekcija</i>	<i>Grupa/Grana</i>	<i>Anamorf</i>	<i>Teleomorf</i>
<i>Longibrachiatum</i>		<i>T. longibrachiatum</i>	<i>H. orientalis</i>
		<i>T. citrinoviride</i>	<i>H. schweinitzii</i>
		<i>T. reesei</i>	<i>H. jecorina</i>
		<i>T. ghanense</i>	
		<i>T. pseudokoningii</i>	<i>H. pseudokoningii</i>
		<i>T. saturnisporum</i>	
		<i>T. konilangbra</i>	
		<i>T. effusum</i>	
		<i>T. sinensis</i>	
		<i>T. sp. MA</i>	
<i>Trichoderma</i>			<i>H. andinensis</i>
			<i>H. novazelandia</i>
			<i>H. cerebriiformis</i>
			<i>H. poronoidea</i>
			<i>H. peltata</i>
			<i>H. pezizoides</i>
			<i>H. avellanea</i>
	<i>Rufa</i>	<i>T. viride</i>	<i>H. rufa</i>
		<i>T. atroviride</i>	<i>H. atroviridis</i>
		<i>T. koningii</i>	<i>H. koningii</i>
		<i>T. strigosum</i>	
		<i>T. ovalisporum</i>	
		<i>T. erinaceum</i>	
	<i>Pachybasium A</i>	<i>T. hamatum</i>	<i>H. stilbohypoxyli</i>
		<i>T. pubescens</i>	
		<i>T. asperellum</i>	
<i>Pachybasium B</i>	<i>Pachybasioides</i>	<i>T. polysporum</i>	<i>H. neorufa</i>
		<i>T. minutisporum</i>	<i>H. flavocanidia</i>
		<i>T. piluliferum</i>	<i>H. pachybasioides</i>
			<i>H. minutispora</i>
			<i>H. pilulifera</i>
			<i>H. parapilulifera</i>
			<i>H. stellata</i>
			<i>H. laciwombatensis</i>
	<i>Hypocreanum</i>		<i>H. citrina</i>
			<i>H. lactea</i>
			<i>H. sulphurea</i>
			<i>H. pulvinata</i>
	<i>Chlorospora</i>		<i>H. aureoviridis</i>
			<i>H. candida</i>
			<i>H. cremea</i>
			<i>H. surrotunda</i>
			<i>H. sinuosa</i>

		<i>H. chlorospora</i> <i>H. thelephoricola</i> <i>H. costaricensis</i> <i>H. thailandica</i> <i>H. verecentiflava</i> <i>H. lixii</i>
Lixii/catoptron	<i>T. harzianum</i> <i>T. aggressivum</i> <i>T. tomentosum</i> <i>T. cerinum</i> <i>T. velutinum</i> <i>T.sp. DAOM 175928</i>	
		<i>H. tawa</i> <i>H. atrogelatinosa</i> <i>H. ceracea</i> <i>H. cinnamomea</i> <i>H. straminea</i> <i>H. catoptron</i> <i>H. virens</i> <i>H. crassa</i> <i>H. semiorbis</i> <i>H. hunua</i>
Virens	<i>T. virens</i> <i>T. crassum</i>	
Semiorbis		
	<i>T. fertile</i> <i>T. oblongisporum</i> <i>T. strictipilis</i> <i>T. longipile</i>	<i>H. strictipilosa</i>
Strictipilis		
		<i>H. cuneispora</i> <i>H. aureoviridis</i> var. <i>macrospora</i>
Stromatica	<i>T. stromaticum</i> <i>T. rossicum</i> <i>T. sp. PPRI 3559</i>	
Ceramica		<i>H. ceramica</i> <i>H. estonica</i> <i>H. lutea</i> <i>H. megalomagna</i>
Lutea	<i>T. bravicomcompactum</i>	
Psychrophila		<i>H. psychrophila</i> <i>H. megacitrina</i>
Neklasifikovane vrste	<i>T. spirale</i> <i>T. helicum</i>	<i>H. gelatinosa</i> <i>H. chromosperma</i> <i>H. sulawensis</i> <i>H. nigrovirens</i> <i>H. phyllostachidis</i>

U taksonomiji roda *Trichoderma*, molekularna sistematika je kasnih devedesetih godina prošlog veka postala standard. Za istraživanja su prvo korišćene tehnike RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) i RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), a kasnije i analiza genskih sekvenci (Tabela 2) (**Lieckfeldt i dr.**, 1998). **Kindermann i dr.** (1998) su uradili prvu filogenetsku analizu kompletnog roda *Trichoderma* zasnovanu samo na ITS sekvenci, a kasnije su **Kullnig-Gradinger i dr.** (2002) u komparativnu analizu vrsta uključili i sekvence ITS1/2 regiona, 5. introna *tef1* lokusa, eksona *ech42* lokusa i ssu-mRNK gena i identifikovali 47 vrsta roda *Trichoderma*. Studije koje su usledile (**Chaverri i dr.**, 2003a, 2004; **Bissett i dr.**, 2003; **Druzhinina i dr.**, 2005, 2006) proširile su broj opisanih vrsta roda *Trichoderma*. Međutim očekuje se i dalje povećanje broja analizom uzoraka iz Azije, Afrike, Centralne i Južne Amerike (**Druzhinina i dr.**, 2006).

Tabela 2. Genske sekvence koje se koriste za identifikaciju i filogeniju vrsta roda *Trichoderma* /*Hypocrea*

Lokus	Fragment	Dužina (kb)	Referenca
ITS 1 i 2 (Internal transcribed spacer)		0.4	Kullnig-Gradinger i dr. , 2002
ssu-mDNK (Mala subjedinica mitohondrijalne rDNK)		0.4	Kullnig-Gradinger i dr. , 2002
28S rDNK		0.5	Kullnig-Gradinger i dr. , 2002
<i>cal1</i> (Kalmodulin)	Intron	0.45	Chaverri i dr. , 2003a
<i>act1</i> (Aktin)	1. intron	0.35	Chaverri i dr. , 2003a
	2. intron	0.8	Druzhinina i Kubicek , 2005
<i>rpb2</i> (RNK polimeraza B subjedinice 2)		0.4	Chaverri i dr. , 2004
<i>ech42</i> (Endohitinaza 42)	Poslednji veliki ekson	0.6	Kullnig-Gradinger i dr. , 2002
<i>tef1</i> (Translacioni elongacioni faktor 1-alfa)	5. mali intron	0.1	Kullnig-Gradinger i dr. , 2002
	4. veliki intron	0.35	Druzhinina i Kubicek , 2005
	Poslednji veliki ekson	0.7	Chaverri i dr. , 2004

Imajući u vidu da je većina vrsta roda *Trichoderma* identifikovana u “molekularnoj eri”, genske sekvence se sada nalaze deponovane u banci gena, GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Upotrebom BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) programa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) moguće je determinisati sve poznate vrste ovog roda. Konstruisana su i dva bioinformatička algoritma za brzu identifikaciju vrsta roda *Trichoderma/Hypocrea* koji se redovno ažuriraju. Prvi, oligonukleotidni barkod **TrichOKey** je metod za brzu molekularnu identifikaciju izolata do nivoa roda, grane/grupe i vrste na osnovu ITS1/2 sekvence rDNK (Tabela 1) (**Druzhinina i dr.**, 2005). Drugi dizajnirani program, **TrichoBLAST** (**Kopchinskiy i dr.**, 2005), se zasniva na identifikaciji vrsta putem analize pet najfrekventnijih filogenetskih markera: ITS1/2 sekvence, 4. velikog i 5. malog introna *tef1* lokusa, 6. velikog eksona *tef1* lokusa i eksona *rpb2* lokusa. Sve poznate vrste roda *Trichoderma* su u privilegovanom položaju jer se mogu identifikovati PCR tehnikom, DNK sekvenciranjem i primenom jednostavnih bioinformatičkih algoritama (**Druzhinina i dr.**, 2006). Danas se sve više koriste molekularno-biološke metode pri identifikaciji vrsta a sekvencioniranjem celog genoma čak sedam predstavnika roda (*T. reesei* Mandels & Reese, *T. virens* (Miller, Giddens and Foster) Arx., *T. atroviride* P. Karsten, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* i *T. citrinoviride* Bissett) potvrđen je značaj ovog roda za čoveka. *T. reesei* se koristi u industriji, *T. virens*, *T. atroviride*, *T. harzianum* i *T. asperellum* su od značaja za poljoprivredu, a *T. longibrachiatum* i *T. citrinoviride* su oportunistički patogeni čoveka (**Sivasithamparam i Ghisalberti**, 1998; **Kuhls i dr.**, 1999, **Mukherjee i dr.**, 2013).

1.2. Sekundarni metaboliti roda *Trichoderma* i njihova primena

Rod *Trichoderma* se ističe među pripadnicima Ascomycotina po sintezi brojnih sekundarnih metabolita (Tabeli 3) koji se masovno proizvode i primenjuju u različitim biotehnološkim procesima. Sekundarni metaboliti su male molekulske mase (< 3 kDa) i ne učestvuju direktno u procesima rasta, razvoja i razmnožavanja, već imaju važnu ulogu u interakciji između različitih organizama (**Sivasithamparam i Ghisalbert**, 1998).

Antagonističko svojstvo nekih vrsta roda *Trichoderma* primenjuje se u zaštiti bilja od bolesti još od ranih tridesetih godina prošlog veka. Suzbijanje fitopatogenih gljiva upotrebom mikroorganizama zasniva se na antibiozi, parazitizmu, kompeticiji i stimulaciji rasta i odbrambenog mehanizma biljaka. Na taj način se, u skladu sa regulativama EU za očuvanjem životne sredine i zdravlja ljudi, smanjuje primena hemijskih sredstava i razvijaju se alternativne mere zaštite.

Među prvim antifungalnim supstancama izolovanih iz pojedinih *Trichoderma* vrsta je 6-pentil- α -piron, jedinjenje koje je prvo sintetički dobijeno a tek kasnije izolovano iz *T. viride* (**Collins i Hilim**, 1972). Ovo jedinjenje je odgovorno za karakterističan miris kokosa koji je prisutan kod "grupe Viride" kojoj pripadaju *T. viride*, *T. atroviride* i *T. koningii* Oudem. (**Bisby**, 1939; **Dodd i dr.**, 2003). Dokazano je da je 6-pentil- α -piron inhibitor rasta fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*, uzročnika bolesti krompira, kupusa, paradajza, luka i drugih poljoprivrednih kultura (**Dennis i Webster**, 1971).

Tabela 3. Biološka aktivnost sekundarnih metabolita predstavnika roda *Trichoderma*

Metabolit	Vrsta	Aktivnost	Referenca	Dodatna aktivnost
Manitol	<i>Trichoderma hamatum</i> , <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	/	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	Antimutagen
2,5-dimetoksibenzokuinon	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	/	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	Citotoksična
Viridiofungin A, B, i C	<i>Trichoderma viride</i>	Antifungalna	Harris i dr., 1993	Inhibitor sinteze skvalena
1,8-dihidroksi-3-metil antrakuinon	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>	Baktericid	Duke, 1992	/
1,6,8-trihidroksi-3-metil antrakuinon	<i>Trichoderma viride</i>	Antiseptik, viridicin	Duke, 1992	Citotoksična
Trihodermol	<i>Trichoderma</i> spp.	Antifungalna	Adachi i dr., 1983	/
Harzianopiridon	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antifungalna	Dickinson i dr., 1989	Regulator rasta biljaka
Harzianolid	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antifungalna	Almassi i dr., 1991	/
Dehidro harzianolid	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antifungalna	Almassi i dr., 1991	/
Harzianična kiselina	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antimikrobna	Sawa i dr., 1994	/
6-pentil- α -piron	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>	Antifungalna	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	Regulator rasta biljaka
Konigin A, B, E, D	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	Antifungalna	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	/
Trichodermin	<i>Trichoderma polysporum</i> , <i>Trichoderma sporulosum</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma virens</i>	Antifungalna	Godtfredsen i Vangedal, 1965	Mikotoksin
Harzianum A	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antifungalna	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	/
Mikotoksin T2	<i>Trichoderma lignorum</i>	Antifungalna	Bamburg i Strong, 1969	Mikotoksin
Ergokonin A, B	<i>Trichoderma koningii</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Antifungalna	Augustiniak i dr., 1991	/
Viridin	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	Antifungalna	Grove i dr., 1965	Intibitor germinacije spora
Dermadin	<i>Trichoderma hamatum</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	Antibiotik	Tamura i dr., 1975	/
N, N-dimetilamin homotalin	<i>Trichoderma koningii</i>	Antifungalna	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	/
Gliotoksin	<i>Trichoderma hamatum</i> , <i>Trichoderma lignorum</i> <i>Trichoderma virens</i>	Antibiotik Antifungalna	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	Inhibitor sinteze acetolaktata
Trihopolin I, II	<i>Trichoderma polysporum</i>	Antifungalna	Fujita i dr., 1981	Antitumorska, Imunosupresivna
Melanoksadin	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma</i> sp.	/	Sivasithamparam i Ghisalbert, 1998	Inhibitor sinteze melanina
Gliovirin	<i>Trichoderma virens</i>	Antifungalna	Howell i Stipanovic, 1983	/

Značajna karakteristika predstavnika roda *Trichoderma* je mogućnost parazitiranja na drugim vrstama gljiva. Međutim, njihova antifungalna aktivnost ogleda se u antibiozi, kompeticiji i stimulaciji rasta i odbrambenog mehanizma biljaka. Supresija fitopatogenih gljiva je najčešće posledica sinergističkog delovanja hitinaza i antifungalnih supstanci koje proizvode (Metcalf i Wilson, 2001). *T. virens* deluje supresivno na zemljišne fitopatogene, kao što su *R. solani* i *Pythium ultimum*, proizvodeći sekundarne metabolite, gliotoksin i gliovirin, koji stimulišu sintezu terpenoida učesnika u odbrambenom mehanizmu biljaka. Dokazano je da su *T. virens*, *T. koningii* i *T. harzianum* tolerantnije na terpenoide biljaka u odnosu na *R. solani* i *P. ultimum* i zbog toga kolonizuju koren biljke i potiskuju patogene gljive (Howell i dr., 2000). Zahvaljujući opisanim svojstvima, *Trichoderma* spp. se smatraju agresivnim kompetitorima, brzo rastu i kolonizuju supstrat potiskujući fitopatogene organizme (Papavizas, 1985; Samuels, 1996).

U biološkoj zaštiti gajenih biljaka od bolesti koriste se *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. koningii* i *T. virens*. Ove vrste su komercijalno dostupne i primenjuju se protiv brojnih fitopatogenih rodova, uzročnika biljnih oboljenja: *Armillaria*, *Botrytis*, *Chondrostereum*, *Colletotrichum*, *Dematophora*, *Diaporthe*, *Endothia*, *Fulvia*, *Fusarium*, *Fusicladium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Monilinia*, *Nectria*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Pseudoperenopora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Venturia* i *Verticillium* (Lumbsden i dr., 1993; Monte, 2001). Preparati za biološku zaštitu na bazi *Trichoderma* vrsta se dodaju u zemljište ili se njima tretiraju semena, rastu zajedno sa korenom biljke, sintetišu sekundarne metabolite, stimulišu rast i odbrambeni mehanizam biljke i parazitiraju na drugim zemljišnim vrstama gljiva (Howell i dr., 2000).

Medicinska istraživanja su pokazala da dermadin, sekundarni metabolit izolovan iz *T. koningii* i *T. viride*, inhibira rast bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (Tamura i dr., 1975). Takođe, gliotoksin se pokazao kao efikasna antifungalna supstanca protiv *Trichophyton gypseu*, uzročnika bolesti ljudi poznate pod nazivom “atletsko stopalo” (Herrick, 1945).

1.3. Celulolitički enzimski sistem vrsta roda *Trichoderma* i primena

Tokom Drugog svetskog rata zelena plesan, tada identifikovana kao *Trichoderma viride*, nanela je velike štete američkim vojnicima u južnom Pacifiku produkujući ekstracelularne enzime, celulaze, koji su uništavali pamučnu uniformu, veš i šatore. Reese i Mandels su prvi istraživali mogućnosti inhibicije aktivnosti celulaze, a posle rata ove enzimi su primenjivani za reciklažu biljnih sirovina i dobijanje biogoriva. Hidrolizom celulozne biomase dobija se glukozni sirup koji fermentacijom prelazi u bioetanol. Kasnije je ustanovljeno da je ispitivani izolat (QM6a) anamorfni stadijum tropske vrste *Hypocrea jecorina* i identifikovan je kao *T. reesei* u čast istraživača koji su ga proučavali (Montenecourt, 1983). Od tada se *T. reesei* najčešće koristi u industriji za dobijanje celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima (Xu i dr., 2009). Celulaze *T. reesei* se koriste i za proizvodnju ekološkog deterdženata za izbeljivanje, uklanjanje hemiceluloze iz papira i održavanje boja u tekstilnoj industriji (Kubicek i dr., 1993; Buchet i dr., 1994).

Pored *T. reesei*, utvrđeno je da i *T. viride* i *T. koningii* sintetišu celulolitičke enzime (Muntañola-Cvetković, 1987):

1. **endo- β -(1,4)-glukanaze (endocelulaze)** koji prekidaju vodonične veze polimera u kristalnoj strukturi celuloze,
2. **egzo- β -(1,4)-celobiohidrolaze (egzocelulaze)** koje odvajaju disaharid, celobiozu, sa krajeva lanca polimera i
3. **β -glukozidaze** koje razlažu celobiozu do glukoze.

Sa ciljem boljeg razumevanja produkcije celulaza i hemicelulaza sekvenciran je i ceo genom *T. reesei*. Ustanovljeno je da se sastoji od 34,1 miliona baznih parova i 9143 gena (Martinez i dr., 2008), što je manje u odnosu na genome drugih askomiceta i drugih predstavnike roda *Trichoderma*, *T. virens* ima 12518 gena, a *T. atroviride* 11865 gena (Kubicek, 2013). Istraživanja su pokazala da *T. reesei* poseduje manje gena za glikozil-hidrolazu, ukupno 200, u poređenju sa *T. virens*, 260, i *T. atroviride*, 257 gena. Međutim, *T. reesei* je bogata genima koji kodiraju za sintezu enzima kao što su: GH27 α -galaktozidaze, GH43 α -arabinofuranozidaze/ β -ksilozidaze, GH67 i GH79 α -metil-

glukuronidaze. Nekoliko gena koji kodiraju za sintezu navedenih enzime nisu karakteristični za gljive i smatra se da su horizontalnim genskim transferom prešli iz bakterija u *T. reesei* (**Kubicek**, 2013).

1.4. Vrste roda *Trichoderma* uzročnici zelene plesni šampinjona

Jestive gljive iz podrazdela Basidiomycotina se gaje još od VII veka u Kini, a prve pokušaje gajenja šampinjona [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] učinio je francuski botaničar Tournefort u XVIII veku kada je inokulisao konjski stajnjak sporama gljive i prekrrio ga zemljištem (**Joly**, 1979; **Chang i Miles**, 2004). Prva gajilišta formirana su krajem XIX veka u Pensilvaniji (SAD), prestonici gajenja šampinjona u svetu (**Wuest i Beyer**, 1996).

Gajenje *A. bisporus* je izvanredan primer biotehnološkog iskorišćavanja poljoprivrednog otpada, slame i životinjskog stajnjaka, za dobijanje veoma ukusne hranljive vrste sa od nedavno poznatim lekovitim svojstvima (**Chang i dr.**, 1996). Poslednje tri do četiri decenije beleži se ekspanzija proizvodnje *A. bisporus*, svetskih razmera. Tokom dugog niza godina usavršavanja tehnologije kompostiranja i gajenja, šampinjon je ostao na prvom mestu po obimu proizvodnje u odnosu na šii-take [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] i bukovaču [*Pleurotus* spp. (Jacq: Fr.) Kumm], sa godišnjom proizvodnjom od preko 3 miliona tona (**Molin**, 1995). Od ukupne svetske proizvodnje Evropske zemlje učestvuju sa 50%, od toga 87% u zemljama članicama EU, a 13% u ostalim (**Chang**, 1999).

Uslovi u gajilištima, umerena temperatura i vlaga, kao i dostupnost hranljivih materija u kompostu, idealni su za razvoj mikopatogena koji za samo par dana mogu naneti ogromne štete (**Staunton i dr.**, 1999). Gubici izazvani pojavom *Verticillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk, *Mycogone perniciosus* (Magnus) Delacroix, *Cladobotryum* spp. i *Trichoderma* spp., uzročnika suve i mokre truleži, paučinaste i zelene plesni, u Evropi i Severnoj Americi zajedno sa troškovima zaštite su ogromni i jedino se mogu porediti sa istim izazvanim virusima (**Muthumeenakshi dr.**, 1998).

Svojstva vrsta roda *Trichoderma* kao što su antagonističko dejstvo na druge mikroorganizme, proizvodnja antibiotika i celulolitičkih enzima omogućavaju im kompeticiju i parazitiranje na gajenim vrstama gljiva ili njihovom supstratu (**Papavizas, 1985; Kubicek i Penttilä, 1998; Sivasithamparam i Ghisalberti, 1998; Gams i Meyer, 1998**). U poslednjih nekoliko decenija uočena je pojava zelene plesni šampinjona i dokazano je da je izaziva nekoliko vrsta roda *Trichoderma* (**Kredics i dr., 2010**).

Davnih pedesetih godina XX veka, uočeno je da *T. viride* i *T. koningii* sporadično izazivaju štete u gajilištima šampinjona (**Sinden i Hauser, 1953**). Do osamdesetih godina prošlog veka, vrste ovog roda su bile zanemarljiv problem u gajilištima šampinjona, pojavljujući se kao kompetitori miceliji šampinjona u kompostu lošeg kvaliteta (**Sinden, 1971**). Prve pojave zelene plesni u epidemijskim razmerama, devedesetih godina XX veka, nanele su ogromne gubitke (3 - 4 miliona funti) u proizvodnji šampinjona u Velikoj Britaniji 1985/86. godine (**Seaby, 1987**) i Republici Irskoj 1990/91. godine (**Doyle, 1991**). Ubrzo, 1994. godine bolest se pojavila i u Holandiji i Belgiji (**Geels, 1997**) a 1997. godine i u Španiji i Francuskoj (**Hermosa i dr., 1999; Mamoun i dr., 2000**). Takođe, devedesetih godina zelena plesan je nanela ogromne štete u gajilištima šampinjona u SAD i Kanadi (**Rinker, 1993; Romaine i dr., 1996**). Iz svih gajilišta izolovana je vrsta *T. harzianum*, međutim, na osnovu morfologije, odgajivačkih karakteristika i patogenosti izdvojila su se tri biotipa poreklom iz Britanije (Th1, Th2 i Th3) i jedan iz Severne Amerike (Th4) (**Seaby, 1987**). Proverom patogenosti utvrđeno je da je biotip Th2 agresivna forma odgovorna za pojavu bolesti u Evropi (**Seaby, 1989**). Kasnije, molekularno-biološkim i filogenetskim proučavanjima (RFLP, RAPD sa šest prajmera i analizom sekvence ITS1 regiona), otkriveno je da su Th1 - *T. harzianum sensu stricto* (**Gams i Meyer, 1998**) i Th3 - *T. atroviride* P. Karsten antagonisti mnogih gljiva (**Castle i dr., 1998**). Biotipovi odgovorni za pojavu bolesti su izdvojeni kao nove vrste i forme, Th2 sa Britanskih ostrva kao *T. aggressivum* f. *europaeum*, a Th4 iz Severne Amerike kao *T. aggressivum* f. *aggressivum* (**Muthumeenakshi i dr., 1994**). Obe forme su filogenetski veoma srodne *T. harzianum* (Th1) i pretpostavlja se da su nedavno evoluirale iz nezavisnih izvora prilagođavanjem postojećih populacija na uslove sredine u gajilištima šampinjona (**Hermosa i dr., 2000**). Tokom poslednje decenije, agresivna forma zelene

plesni pojavila se u gajilištima šampinjona u Mađarskoj (**Hatvani i dr.**, 2007), Poljskoj (**Szczecz i dr.**, 2008), Meksiku (**Romero-Arenas i dr.**, 2009), Australiji (**Clift i Shamshad**, 2009) i Hrvatskoj (**Hatvani i dr.**, 2012).

Pripadnici roda *Trichoderma* izazivaju najveće kvalitativne i kvantitativne štete i u gajilištima *Pleurotus* spp. (*T. pleurotum* S.H. Yu & M.S. Park i *T. pleuroticola* S.H. Yu & M.S. Park) i *Lentinus edodes* (*T. harzianum*) u svetu (**Hatvani i dr.**, 2007). Poslednjih par godina, u gajilištima šampinjona u Srbiji, pored paučinaste truleži, koju izazivaju mikopatogeni roda *Cladobotryum*, najveće štete nanosi bolest sa simptomima nalik zelenoj plesni. Do danas nije bilo literaturnih podataka o prouzrokovaču ove bolesti u Srbiji.

Zelena plesan se pojavljuje u vreme prorastanja micelije šampinjona kroz supstrat kao gusta, u početku bela masa micelije koja nakon sporulacije poprima tamno zelenu boju, pege i nekroze boje rđe se javljaju na šesiru i dršci plodonosnih tela *A. bisporus* (**Kredics i dr.**, 2010). Prateća pojava je masovni razvoj grinja poznatih kao crveni pauk (*Pygmephorus* spp.) koje se hrane sporama *Trichoderma* spp. (**Seaby**, 1996a; **Samuels i dr.**, 2002).

Kolonije *Trichoderma* spp. obrazuju belu vazдушnu miceliju, koja nakon sporulacije poprima smaragdno zelenu boju. Konidiofori su uspravni, bezbojni i piramidalno razgranati i obrazuju se u koncentričnim krugovima. Primarne i sekundarne grane se formiraju pod uglom od 90° u odnosu na glavnu osu i na vrhu se završavaju jednom ili grupom fijalida. Fijalide su međusobno postavljene pod uglom od 90°, flašolikog su oblika, široke u sredini i sužene u osnovi i na vrhu. Konidije su jednoćelijske, suve, ovalne ili elipsoidne, zelene boje, dimenzija 3 - 5 x 2 - 4 µm. Micelija obrazuje i jednoćelijske, loptaste hlamidospore (**Seaby**, 1998).

1.4.1. Interakcija između *Trichoderma* spp. i *Agaricus bisporus* u kompostu

Agresivnost *T. aggressivum* vezana je za bolju adaptaciju na kompost u odnosu na *T. harzianum*, ne zasniva se na specifičnoj sposobnosti da razlaže komponente komposta već na svojstvu da toleriše antagonizam drugih mikroorganizama prisutnih u supstratu što joj omogućava da kolonizuje veliku površinu komposta pre direktne interakcije sa *A. bisporus*. Kada se smanji količina dostupnih hranljivih materija u kompostu *T. aggressivum* f. *europaeum* parazitira *A. bisporus* liziranjem hifa (**Savoie i dr.**, 2001).

Williams i dr. (2003) su utvrdili da se *T. aggressivum* ne susreće često kao parazit na *A. bisporus*, što ukazuje da se antagonizam vrsta roda *Trichoderma* prema miceliji šampinjona ne zasniva prvenstveno na parazitizmu. Ustanovljeno je da samo agresivne forme zelene plesni luče himoelastaze i tripsin proteaze, dok su celulaze prisutne kod svih *Trichoderma* vrsta, i parazitskih i saprobnih. Neki *T. atroviride* izolati mogu da kolonizuju sterilisani kompost i podsećaju na *T. aggressivum*, ukazujući da enzimi nisu jedino odgovorni za agresivnu kolonizaciju.

Uspešna kompetitivnost predstavnika roda *Trichoderma* za prostor i hranljive materije omogućena je sintezom ekstracelularnih enzima, toksičnih sekundarnih metabolita i isparljivih organskih jedinjenja. Primećeno je da *Trichoderma* vrste ne prorastaju kompost bez pristustva micelije *A. bisporus* ili se vrlo slabo razvijaju (**Romaine i dr.**, 2005). **Mumpuni i dr.** (1998) su utvrdili da *T. aggressivum* luči isparljive metabolite koji imaju fungistatično dejstvo na rast *A. bisporus*. Takođe, micelija *T. aggressivum* ne samo da je tolerantnija na jedinjenja koja luči *A. bisporus* od *T. harzianum* i *T. atroviride*, nego ona i stimulišu njen rast. U momentu kad *T. aggressivum* sporuliše, rast micelije *A. bisporus* se rapidno smanjuje i razvijaju se tipični simptomi zelene plesni. **Krupke i dr.** (2003) su identifikovali metabolit koji luči *T. aggressivum* f. *aggressivum*, 3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metilsokumarin, koji ne proizvode druge "neagresivne" vrste roda *Trichoderma*. Ovo jedinjenje inhibira rast i obrazovanje plodonosnih tela *A. bisporus* tokom razvoja zelene plesni. Sprečavanjem plodnošenja šampinjona, omogućava se *T. aggressivum* da usvaja prosta ugljenikova jedinjenja koja su nastala dejstvom ekstracelularnih enzima *A. bisporus* pri razlaganju komponenti

komposta. *T. aggressivum* takođe proizvodi niz ekstracelularnih hidrolitičkih enzima koji razlažu različite polimere koji se koriste kao izvor hranljivih materija. Najvažnije su ekstracelularne β -1,3 glukanaze koje razlažu ćelijski zid *A. bisporus* i slame žitarica iz komposta, dok hitinaze i proteaze omogućavaju saprobnu ishranu na kompostu bogatom bakterijama i gljivama.

Guthrie i Castle (2006) su odredili aktivnost intracelularnih i ekstracelularnih hitinaza u dvojnoj kulturi *T. aggressivum* i *A. bisporus*. Ustanovili su da je 3 N-acetilglukozaminidaza koju stvara *A. bisporus* odgovorna za rezistentnost smeđih sojeva šampinjona [*A. bitorquis* (Quel.)Sacc.] na zelenu plesan, dok je 3 N-acetilglukozaminidaza koju luči *T. aggressivum* verovatno važan indikator antagonističke aktivnosti. Smeđi šampinjoni, carski ili portabela (*A. bitorquis*) su pored rezistentnosti na zelenu plesan, tolerantni i na uzročnike bakterijske pegavosti i suve truleži (**Dragt i dr.**, 1995).

1.4.2. Epidemiologija uzročnika zelene plesni šampinjona

Prirodno stanište *T. aggressivum* je još uvek nepoznato. Mogući prenosioci zaraze su vazduh, vozila, kontaminirana odeća i životinjski vektori, insekti, nematode i grinje (**Kredics i dr.**, 2010). Utvrđeno je prisustvo *T. pleuroticola* na plodonosnim telima samoniklih vrsta bukovače. Međutim, ispitivanjem prisustva *Trichoderma* vrsta na samoniklim šampinjonima u Mađarskoj, *T. aggressivum* nije pronađena a utvrđeno je prisustvo *T. atroviride*, *T. tomentosum*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis* i *T. virens* (**Kredics i dr.**, 2010). Pretpostavlja se da je širenje epidemije *T. aggressivum* f. *europaeum* u Velikoj Britaniji od jednog proizvođača komposta do drugog započelo preko zajedničkih kupaca. Vozila koja nose velike količine prašine, spora, ostataka micelije i insekata predstavljaju veliki potencijalni rizik širenja među proizvodnim postrojenjima. Takođe, tokom širenja bolesti, velika količina zaraženog supstrata se rasipa u okolini gajilišta što je takođe doprinelo širenju inokuluma. Ustanovljeno je da se tokom sušnog i vetrovitog perioda intenzitet zaraze poveća do 60%, ukazujući da prašina koju prenose vazdušne struje daje doprinos širenju zarazi (**Seaby**, 1996a). Ovaj autor je utvrdio prisustvo roda *Trichoderma* na svim površinama u gajilištima i okolini, kantinama i na odeći osoblja, a saopštava i da predstavnici ovog roda ne preživljavaju izlaganje temperaturi od 60°C u toku 30 min. Veštačka inokulacija sedmog dana izaziva intenzivnu pojavu bolesti, dok inokulacija 14. dana ne izaziva kolonizaciju supstrata. Eksperimentalno je dokazano da je sav kompost tek zasejan sa *A. bisporus* dodirnut rukama kontaminiranim sa *T. aggressivum* bio zaražen, ali je ustanovljeno da su bakterije iz komposta zaustavljale njen rast. **Royse i dr.** (1999) su istakli da se sekundarna zaraza prvenstveno vrši osobljem i zaraženom opremom a zanemarljivo vazduhom.

1.4.3. Prevencija i suzbijanje *Trichoderma* spp. u gajilištu *Agaricus bisporus*

1.4.3.1. Prevencija pojave bolesti

Prevencija pojave uzročnika bolesti *A. bisporus* podrazumeva niz postupaka u održavanju striktno higijene u gajilištima i okolini. Često se više uzročnika bolesti *A. bisporus* pojavljuje istovremeno. Moguće strategije za prevenciju pojave zelene plesni i drugih bolesti je primena dezinfekcionih sredstava u gajilištu i pokrivci, regulacija pH vrednosti pokrivke iznad 7,5, primena sintetičkih fungicida i biološke mere borbe korišćenjem antagonističkih bakterija, biljnih ekstrakata i etarskih ulja, kao i gajenjem sojeva otpornih na patogene.

Nakon svakog branja uklanjaju se ostaci drški ubranih plodonosnih tela, pod gajilišta se svakodnevno pere, površine se ne čiste suve jer se sa česticama prašine raznose i konidije patogenih gljiva, izbegava se suviše rasprskavanje vode jer se i na taj način prenose spore. Ukoliko dođe do pojave prvih znakova bolesti obolela plodonosna tela se pokrivaju vlažnom tkaninom i solju, krečom ili mešavinom kreča i gipsa, ili rastvorom natrijum hipohlorita. Aerodinamične i suve spore *Cladobotryum* spp. se rasejavaju strujanjem vazduha i ventilacionim sistemom, dok spore vrsta rodova *Trichoderma*, *Verticillium* i *Mycogone* koje su slepljene u mukoznoj masi prenose insekti, grinje, nematode i osoblje u gajilištu (Adie i Grogan, 2000). Na kraju turnusa, temperatura u gajilištu se povećava do 60 - 70°C i vrši pasterizacija vodenom parom najmanje 12 sati pre pražnjenja gajilišta ili se površina pokrivke istrošenog komposta tretira nekim dezinfekcionim sredstvom (Staunton i Dunn, 2001).

Osoblje koje vrši zasejavanje i postavlja pokrivku ne sme imati dodira sa istrošenim supstratom ili obolelim plodonosnim telima. Između turnusa, prostorije gajilišta se dezinfikuju formaldehidom (7,5 - 14,8 L aktivne materije/1000 L vode), preparatima na bazi persirćetne kiseline (0,3%, 30 mL/10 L vode) ili asepsolom nakon zagrevanja prostorije iznad 18°C koja se drži zatvorena najmanje 24 h nakon tretiranja (Potočnik, 2009).

1.4.3.2. Suzbijanje zelene plesni hemijskim i biološkim sredstvima

Po protokolu za gajenje gljiva u zemljama EU, nakon primenjenih mera odgovarajuće higijene pokrivka za gajenje šampinjona se dezinfikuje a zatim preventivno tretira hemijskim sredstvima. Uzgajivači u Srbiji koriste formalin, natrijum-dihloroizocijanurat, persirćetnu kiselinu, natrijum hipohlorit, kreč, sumpor i kalijum permanganat za dezinfekciju pokrivke. Kalcijum hlorid i jedinjenja na bazi hlora se uobičajeno koriste za suzbijanje bakterija. Tretiranje fungicidima se vrši četvrtog dana od postavljanja pokrivke na supstrat, i to onima sa najmanjom toksičnošću i najkraćom karencom koji ne ugrožavaju korisne organizme i u minimalnoj efektivnoj dozi primene (**Anonymous**, 2006).

Primena fungicida je ograničena kada su i parazit i domaćin pripadnici istog carstva (Fungi). Hemijska sredstva koja se koriste u zaštiti moraju biti efikasna i selektivno toksična tj. da suzbijaju rast patogena a neinhibiraju rast micelije i prinos *A. bisporus* (**Staunton i dr.**, 1999).

Danas je u zemljama EU pri proizvodnji šampinjona dozvoljeno korišćenje samo prohloraz-Mn fungicida (grupa imidazola), u Australiji i Južnoafričkoj Republici karbendazima (grupa benzimidazola) i prohloraz-Mn, dok se u Severnoj Americi zvanično preporučuje više preparata: hlorotalonil (grupa hloronitrila), tiofanat-metil (benzimidazol), tiabendazol (benzimidazol) i sredstvo na bazi *B. subtilis* (**Beyer i dr.**, 2004; **Allan i dr.**, 2008; **Grogan**, 2008). Nijedan od navedenih fungicida nije registrovan za zaštitu šampinjona u Srbiji, već za zaštitu drugih gajenih kultura. Najviše se koriste prohloraz-Mn, karbendazim i tiofanat-metil, a po navodima uzgajivača i *in vivo* testovima, prohloraz-Mn se pokazao kao najefikasniji (**Potočnik**, 2009).

Međutim, malo je podataka o uspešnom suzbijanju uzročnika zelene plesni šampinjona. Ranije je kao prevencija vršen tretman „semena“ šampinjona preparatima iz grupe benzimidazola sve dok **Romaine i dr.** (2008) nisu ustanovili rezistentnost *T. aggressivum* izolata na benomil i tiofanat-metil u Severnoj Americi. **Rinker i Alm** (2008) su ustanovili da je primena tiabendazola, benomila, i tiofanat-metila u *in vitro* i *in vivo* uslovima bila uspešna u inhibiciji različitih vrsta roda *Trichoderma*, izuzev agresivnog

tipa, dok hlorotalonil nije bio efikasan. **Romaine i dr.** (2008) preporučuju primenu imazalil sulfata (grupa imidazola) protiv *Trichoderma* sojeva rezistentnih na benzimidazole. Iako je prohloraz-Mn jedini fungicid koji se koristi u Evropi utvrđena je smanjena osetljivost mikopatogenih rodova *Verticillium* i *Cladobotryum* u Španiji i Velikoj Britaniji (**Gea i dr.**, 2005; **Grogan**, 2008). Međutim, rezistentnost *V. fungicola* na prohloraz-Mn još nije povezana sa ozbiljnijim gubicima u prinosu, verovatno zbog toga što njegov teleomorf nije pronađen, čime se smanjuje rizik od razvoja rezistentnosti usled unakrsne rekombinacije (**Grogan**, 2008).

Takođe je utvrđeno da koncentracija prohloraz-Mn fungicida rapidno pada u pokrivci 45 dana nakon tretiranja, do 15%. Prohloraz-Mn se mnogo brže razlaže i time smanjuje efikasnost u prisustvu zaostale tečnosti iz kanistera prskalice usled prisustva mikroorganizama koji ga razgrađuju (**Grogan**, 2008). Tokom primene fungicida određuje se povoljan balans između vremena u okviru kog je fungicid efikasan u suzbijanju patogena i njegovog razlaganja na netoksične sastojke. Zbog toga se prohloraz-Mn primenjuje u dve podeljene doze od po 0,6 g aktivne materije/1,8 L vode/m² pokrivke, četvrtog dana od nanošenja pokrivke i nakon prve berbe, oko 20. dana od pokrivanja supstrata (**Grogan i dr.**, 2000).

Rezistentnost mikopatogenih gljiva na fungicide je jedan od najvećih problema sa kojima se sreće savremena proizvodnja *A. bisporus* (**Grogan i Gaze**, 2000). Pored razvoja rezistentnosti na fungicide, veliki problem predstavlja potencijalno štetno i neselektivno dejstvo hemijskih preparata na ljude, druge organizme i životnu sredinu. Zbog toga se ukazala potreba za razvojem preparata prirodnog porekla, biofungicida. To su formulisani biljni ekstrati, ulja i komponente, mikroorganizmi sa kompetitivnim ili antagonističkim dejstvom na štetne organizme kao i izazivači otpornosti gajenih biljaka i gljiva.

Savoie i dr. (2001) su saopštili značajnu inhibiciju rasta *T. aggressivum* dejstvom *Bacillus* vrsta u laboratorijskim uslovima. **Bhatt i Singh** (2002) su utvrdili antagonističko dejstvo jednog soja bakterija izolovanih iz pokrivke na *T. harzianum* *in vitro* i u oglednom gajilištu, a dobijen je i veći prinos šampinjona tokom primene. U Mađarskoj, **Györfi i Geösel** (2008) su izdvojili dva soja *Bacillus* sp. koji su *in vivo* ispoljili zadovoljavajuću efikasnost u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. aggressivum* f. *aggressivum*, i

pozitivno uticali na prinos *A. bisporus*. **Védie i Rousseau** (2008) su objavili preliminarne rezultate o efikasnosti preparata Serenade® na bazi *B. subtilis* u suzbijanju zelene plesni. Takođe, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* i *B. licheniformis* su imali zadovoljavajuću efikasnost u suzbijanju *T. pleurotum*, patogena bukovače (**Nagy i dr.**, 2012).

I pored primene biopreparata, organska proizvodnja šampinjona je teško izvodljiva zbog primene fungicida u proizvodnji žitarica čija se slama koristi za pripremu komposta (**Potočnik**, 2009).

Etarska ulja aromatičnih i lekovitih biljaka kao i njihove komponente su potencijalni izvor biofungicida. Nedavno je u laboratorijskim uslovima utvrđena značajna antifungalna aktivnost etarskih ulja origana (*Origanum vulgare*) i majčine dušice (*Thymus vulgaris*) i njihovih najzastupljenijih komponenti, karvakrola i timola na *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. harzianum* i *T. atroviride* (**Soković i Van Griensven**, 2006; **Angelini i dr.**, 2008). Nana (*Mentha piperita*) sa glavnom komponentom mentolom je takođe ispoljila jaku antifungalnu aktivnost na različite *Trichoderma* vrste (**Soković i dr.**, 2009). Međutim, efikasnost etarskih ulja u suzbijanju bolesti u oglednim gajilištima do sada nije testirana. Sintetisan je preparat koji sadrži ulje čajnog drveta, etarsko ulje dobijeno iz australijske biljke *Melaleuca alternifolia* (Maiden. & Betcher.) Cheel. čiji mehanizam delovanja nije potpuno rasvetljen ali je utvrđeno da inhibira klijanje spora i rast micelije patogenih gljiva (**Carson i dr.**, 2006; **Reuveni i dr.**, 2006). **Angelini i dr.** (2008) su zabeležili zadovoljavajuću efikasnost ulje čajnog drveta u suzbijanju *T. harzianum* prilikom njegovog dodavanja u supstrat za gajenje bukovače i šampinjona. Ulja geranijuma (*Pelargonium graveolens*), cimeta (*Cinnamomum verum*) i karanfilića (*Eugenia caryophyllata*) su ispoljila visoku antifungalnu aktivnost na druge patogene šampinjona *V. fungicola*, *M. pernicioza* i *Cladobotryum* sp. (**Tanović i dr.**, 2006; 2009). Iako fungitoksično dejstvo mnogih biofungicida nije jako oni mogu služiti kao dopuna hemijskim sredstvima kako bi se prisustvo hemijskih preparata svelo na najmanju meru (**Potočnik**, 2009).

2. CILJEVI RADA

Svrha ovog istraživanja je da se dobiju saznanja o karakteristikama i prirodi patogena koje se mogu primeniti za razvoj efikasne strategije zaštite *A. bisporus* od zelene plesni. Stoga, osnovni zadatak ove disertacije je brza i tačna identifikacija mikopatogena izazivača bolesti *A. bisporus* i ispitivanje njihove osetljivosti na različite antifungalne supstance hemijskog i biološkog porekla.

Imajući u vidu navedeno postavljeni su sledeći ciljevi:

- utvrđivanje prisustva mikopatogena iz roda *Trichoderma* u gajilištima šampinjona,
- izolacija mikopatogena iz supstrata i plodonosnih tela šampinjona sa simptomima bolesti i provera njihove patogenosti,
- proučavanje morfo-fizioloških osobina vrsta roda *Trichoderma*,
- molekularno-biološka identifikacija pripadnika roda *Trichoderma* do nivoa vrste analizom sekvenci ITS1/ITS4 regiona,
- ispitivanje osetljivosti izolata na šest sintetičkih fungicida iz različitih hemijskih grupa i dva biofungicida,
- ispitivanje efikasnosti suzbijanja *Trichoderma harzianum* biofungicidima na bazi ulja čajnog drveta i *Bacillus subtilis* i poređenje sa komercijalnim fungicidom prothloraz-Mn u uslovima oglednog gajilišta *A. bisporus*,
- razvoj uspešne strategije suzbijanja zelene plesni zasnovane na smanjenoj upotrebi hemijskih sredstava, primenom fungicida prirodnog porekla,
- proučavanje prirode zajedničkog dejstva fungicida i biofungicida na suzbijanje patogena i prinos šampinjona (sinergizam ili antagonizam).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje

Uzorci inficiranih supstrata i obolelih plodonosnih tela *Agaricus bisporus* sa simptomima zelene plesni su sakupljeni u peiodu od 2006. do 2010. godine iz 13 gajilišta u Srbiji i jednog u Bosni i Hercegovini (Tabela 4).

Tabela 4. Lista izolata mikopatogena i njihovo poreklo.

Oznaka izolata	Lokalitet	Supstrat	Godina izolacije
T ₁	Komirić, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2006
T ₅	Komirić, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2006
T ₁₀	Požarevac, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2006
T ₃₃	Zemun Polje, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2006
T ₃₇	Novi Slankamen, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2007
T ₃₉	Veliko Gradište, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2007
T ₅₂	Zemun (Institut), Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2008
T ₅₄	Kula, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2008
T ₆₀	Zemun, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2008
T ₆₃	Bečej, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2009

T ₆₄	Zemun (Institut), Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2009
T ₆₉	Sarajevo, Bosna i Hercegovina	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2009
T ₇₁	Mol, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2010
T ₇₆	Lisovići, Barajevo, Srbija	Supstrat	2010
T ₇₇	Lisovići, Barajevo, Srbija	Supstrat	2010
T ₈₅	Lisovići, Barajevo, Srbija	Supstrat	2010
T ₈₆	Skobalj, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2010
T ₈₈	Veliko Gradište, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2010
T ₉₀	Zemun Polje, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2010
T ₉₁	Institut Zemun, Srbija	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>	2010

3.2. Izolacije i uslovi gajenja

Iz plodonosnih tela *A. bisporus* sa karakterističnim simptomima zelene plesni uzeti su fragmenti veličine 2 x 2 x 5 mm, površinski su dezinfikovani u 0,1% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl) i postavljeni na krompir dekstrozni agar (PDA) u aseptičnim uslovima, primenom standardnih mikoloških metoda (**Dhingra i Sinclair**, 1995). Sve reizolacije su urađene na PDA. Čiste kulture mikromiceta čuvaju se na 5°C u mikoteci Laboratorije za primenjenu fitopatologiju i fungicide, Insituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun.

Analiziran je uticaj različitih uslova gajenja na rast micelije proučavanih izolata. Isecci micelije prečnika 10 mm, sa ivica četiri dana starih kolonija sa PDA, korišćeni su kao inokulum. Uticaj sastava podloge na rast proučavanih izolata je analiziran nakon tri dana kultivacije na različitim hranljivim podlogama.

Hranljive podloge

- Krompir dekstrozni agar (PDA): krompir - 200 g, dekstroza - 20 g, agar - 17 g i bidestilovana voda - 1 L, regulacija pH pomoću 1M NaOH ili 1M HCl (**Booth**, 1971);

- Malt agar (MA): industrijski slad - 500 mL, agar - 17 g, bidestilovana voda - 500 mL, regulacija pH pomoću 1M NaOH ili 1M HCl (**Booth**, 1971);

- Podloga od kukuruznog brašna (CMD): kukuruzno brašno - 50 g, dekstroza - 6 g, agar - 18 g, bidestilovana voda - 1 L, regulacija pH pomoću 1M NaOH (**Conant i dr.**, 1971).

Sve pripremljene podloge su sterilisane u autoklavu pri pritisku od 1,3 atmosfere i temperaturi od 121°C 20 minuta. Nakon hlađenja do 50°C, 25 mL podloge je razliveno u sterilne Petri kutije pod aseptičnim uslovima. Inokulumi prečnika 10 mm uzeti sa ivice kolonija su postavljeni na sredinu Petri kutija sa podlogom za testiranje. Uticaj temperature na rast izolata je praćen na PDA, MA i CMD nakon tri dana inkubacije na temperaturama od 17°C, 20°C, 25°C, 30°C i 35°C.

Uticaj pH podloge na rast testiranih izolata je proučavan kultivacijom na PDA pH: 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 i 9,0, tri dana na temperaturi od 20°C.

Izolati su gajeni na sobnoj temperaturi (22 ± 2°C) u mraku i u prisustvu neonske lampe. Rast micelije na PDA podlozi u šest ponavljanja je meren nakon tri dana.

Morfo-fiziološke karakteristike izolata proučavane su na kulturama gajenim od dva do šest dana na PDA na 20 i 25°C. Analizirane su makroskopske i mikroskopske karakteristike kolonija: izgled, boja, oblik i miris kolonija, brzina rasta, prisustvo zoniranosti, pigmentacija podloge, sporulacija, izgled konidiofora i oblik i dimenzije konidija. Mereno je 20 konidija po izolatu (DMLS mikroskop, Leica DC300 digitalna kamera, IM1000 softverski program) i određena je srednja vrednost dimenzija i odnosa dužina/širina konidija (**Ghisalberti i Rowland**, 1993; **Seaby**, 1996b; **Dodd i dr.**, 2003; **Chaverri i dr.**, 2003b).

3.3. Molekularne metode

Za molekularnu identifikaciju korišćeni su izolati gajeni na PDA podlozi na 25°C. Nukleinske kiseline su izolovane po protokolu (**Day i Shattock**, 1997), a PCR je urađen korišćenjem univerzalnog para prajmera ITS1/ITS4 (**White i dr.**, 1990). Smeša za PCR analizu (25 µL) je sadržala 20 ng DNK templata, 1×PCR Master Mix (Fermentas, Vilnius, Litvanija) i po 0,4 µM prajmera. Uzorak bez DNK je bio negativna kontrola. Trideset i pet PCR ciklusa je izvršeno za amplifikaciju (**White i dr.**, 1990). PCR produkt (6 µL) je vizuelizovan u 1% agaroznom gelu, obojen etidijum bromidom i posmatran na UV transiluminatoru. Amplifikovani produkti su prečišćeni pomoću mi-PCR Purification Kit-a (Metabion International AG, Martinsried, Nemačka) i sekvencionirani u oba smera, korišćenjem forward ITS1 i reverse ITS4 prajmera. Dobijene sekvence su analizirane korišćenjem Pregap4, iz Staden programskog paketa (**Staden i dr.**, 2000), i Clustal X (**Thompson i dr.**, 1997) MEGA version 5 (**Tamura i dr.**, 2011). Sekvence su deponovane (dodeljen im je referentni broj) i upoređene sa sekvencama dostupnim u NCBI (National Centre for Biotechnology Information) banci podataka. Filogenetsko stablo je konstruisano korišćenjem MEGA version 5, Maximum Parsimony metode (**Nei i Kumar**, 2000).

3.4. Test virulentnosti

Urađena su dva testa virulentnosti testiranih *Trichoderma* izolata. Prvi test virulentnosti je izveden inokulacijom ubranih šešira *A. bisporus* suspenzijom spora (3×10^6 konidija/mL) pripremljenih od četiri dana starih izolata po metodi **Bonnen i Hopkins** (1997). Drške su uklonjene i gornja strana šešira je inokulisana sa 20 µL suspenzije spora. Test patogenosti za svaki izolat je izveden u tri ponavljanja. Sterilna voda je korišćena kao negativna kontrola. Inokulisani šeširi su držani na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Simptomi su ocenjeni po skali **Collopy i dr.** (2001): 0 - bez simptoma; 1 - bled prsten oko inokulisane zone; 2 - svetlo smeđ prsten oko inokulisane zone; 3 - tamno smeđ prsten na mestu inokulacije; 4 - tamno smeđ prsten, sporulacija i pojava nekrotičnih lezija oko mesta inokulacije i 5 - simptomi se šire izvan mesta inokulacije, izražena pojava nekrotičnih lezija i obilna sporulacija.

Drugi način provere virulentnosti izolata izveden je po modifikovanoj metodi **Fletcher i Yarham** (1976), tj. inokulacijom ubranih plodonosnih tela *A. bisporus* pipetiranjem 1 mL suspenzije micelije i spora izolata (10^6 spora/mL) u šupljinu plodonosnih tela odakle je prethodno uklonjena drška. Suspenzije spora za inokulaciju su dobijene od izolata *Trichoderma* spp. gajenih četiri dana na PDA na temperaturi od 20°C . Inokulisani šeširi i kontrola, u koju je pipetirana destilovana voda, su postavljeni u Petri kutije na vlažan filter-papir i inkubirani četiri dana na sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Posle pojave micelije parazita na lamelama himenofora patogen je reizolovan i upoređen sa originalnim izolatima.

3.5. *In vitro* test za određivanje antifungalne aktivnosti

Osetljivost izolata vrsta roda *Trichoderma* na fungicide je testirana po delimično modifikovanoj metodi **Leroux i Gredt** (1972). Micelija izolata *Trichoderma* spp. stara četiri dana inokulisana je na PDA podlogu obogaćenu različitim koncentracijama fungicida (0,01, 0,10, 1,00, 10,00, 100,00 i 1000,00 mg/L) i inkubirana na 20°C. Ovim preliminarnim ispitivanjima su određene koncentracije fungicida kojima se postiže inhibicija rasta izolata između 5% i 95% u odnosu na kontrolu. Za određivanje parametara osetljivosti je korišćena skala sa simetrično raspoređenim koncentracijama u utvrđenom opsegu kako bi se dobila što pouzdanija vrednost koncentracije fungicida koja inhibira rast micelije 50% (EC₅₀) (**Robertson i dr.**, 1984). Na osnovu prethodnih rezultata izabrane su koncentracije fungicida: za prochloraz-Mn 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 1 i 10 mg/L; za tiofanat-metil 6,25, 12,5, 25 i 50 mg/L; za iprodion 0,47, 0,94, 1,87, 3,75 mg/L; za karbendazim i hlorotalonil 0,19, 0,37, 0,75 i 1,5 mg/L; za trifloksistrobin 0,1, 1, 10 i 100 mg/L; za biofungicid na bazi ulja čajnog drveta 0,01, 0,1, 1, 10, 100 i 1000 mg/L i za biofungicid koji sadrži *Bacillus subtilis* 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 i 10 mg/L.

Fungicidi su dispergovani u sterilnoj destilovanoj vodi a zatim uz neprekidno mešanje aseptično dodavani u rastoplјenu PDA podlogu prethodno ohlađenu do 50°C. Odnos fungicida i podloge je bio 1:9. U kontroli je fungicid zamenjen destilovanom vodom i svi testovi su izvedeni u tri ponavljanja. Nakon sedam dana inkubacije mereno je šest radijalno raspoređenih rastojanja od ivice kolonije do ivice inokuluma. Za probit analizu su uzimani rezultati najmanje četiri koncentracije i preračunati na procenat inhibicije u odnosu na kontrolu. Određene su koncentracije koje inhibiraju rast micelije 50% odnosno 90% (EC₅₀ i EC₉₀) i nagib regresione linije (b) (**Leroux i Gredt**, 1972). Kriterijum za značajno razlikovanje dve regresione linije je bilo nepreklapanje intervala poverenja za EC₅₀ i EC₉₀ na nivou verovatnoće 0,05 (**Finney**, 1971). Takođe, određene su i koncentracije koje inhibiraju rast micelije za 20% i 70%. Indeks selektivnosti za svaku aktivnu materiju je izračunat kao odnos srednje EC₅₀ za *Trichoderma* spp. i odgovarajuće procenjene vrednosti za *A. bisporus* (**Chrysai-Tokousbalides i dr.**, 2007).

Prema **Delp i Dekker** (1985) izolat je rezistentan ako je faktor rezistentnosti (RF) veći od 2 ($RF = EC_{50}$ posmatranog izolata/ EC_{50} najosetljivijeg izolata). Nivo rezistentnosti je ocenjen na osnovu skale koju je predložio **Gouot** (1994):

$RF < 3$ – osetljivi izolati,

$RF = 3 - 20$ – umereno rezistentni,

$RF = 20 - 80$ – rezistentni,

$RF > 100$ – visoko rezistentni izolati.

Prema **Gea i dr.** (1996) i **Grogan i dr.** (2000) tehnika monitoringa rezistentnosti mikopatogena na fungicide obuhvata grupisanje na osnovu EC_{50} vrednosti ispitivanih izolata na: 0 - 5 mg/L - visoko osetljive, 5 - 50 mg/L - umereno osetljive i 50 - 500 mg/L – rezistentne.

3.6. *In vivo* test za procenu efikasnosti fungicida u suzbijanju *Trichoderma harzianum*

U oglednom gajilištu je ispitivana efikasnost biofungicida na bazi ulja čajnog drveta i bakterije *Bacillus subtilis*. Ulje čajnog drveta i preparat na bazi *B. subtilis* primenjeni su u standardnoj dozi i u kombinaciji sa fungicidom prochloraz-Mn u odnosu 20:80. Prinos i efikasnost biofungicida su upoređeni sa prochloraz-Mn fungicidom primenjenim u standardnoj dozi. Briketi komposta upakovani u PVC foliju dimenzija 0,60 x 0,40 x 0,25 m (dužina x širina x visina) zasejani micelijom šampinjona (*A. bisporus* A15 (Sylvan, zRt, Mađarska)), mase 18 kg, inkubirani su tokom 18 dana pri temperaturi od 24°C (prorastanje micelije). Površina briketa je podeljena drvenim pregradama na dva jednaka dela tako da je svaki ogledni deo imao ukupnu površinu od 0,12 m². Površina supstrata je pokrivena pokrivkom od crnog treseta (Terahum, Treset d.o.o., Veliko Gradište, Srbija) i kreča slojem debljine 40 - 50 mm. Supstrat je zatim inkubiran na temperaturi od 21°C tokom osam dana, a potom je temperatura snižena na 17°C. Inokulum je pripremljen tako što su konidije i micelija izolata *T. harzianum* T91, prethodno gajenog četiri dana na PDA na temperaturi od 20°C, sastrugani sa površine podloge u Petri kutiji u koju su prethodno dodati 10 mL sterilne destilovane vode i Tween 20 (v/v 0,01%) a zatim proceđeni kroz dvostruki sloj gaze. Suspenzija konidija koncentracije 10³ konidija/mL korišćena je za inokulaciju pokrivke. Biofungicidi na bazi *B. subtilis* i ulja čajnog drveta su primenjeni za tretman pokrivke četvrtog dana od njenog postavljanja, a prochloraz-Mn

je korišćen u dve doze, četvrtog i dvadeset trećeg dana od postavljanja pokrivke (nakon prvog talasa plodonošenja). Pokrivka je inokulisana suspenzijom spora *T. harzianum* T91 šestog dana nakon nanošenja. Tretmani su bili: (a) inokulisana i (b) neinokulisana kontrola, bez tretiranja fungicidima, (c) prohloraz-Mn u standardnoj dozi od 0,6 g aktivne materije u 1,8 L H₂O po m² pokrivke, (d) 80% standardne doze prohloraz-Mn od 0,48 g u 1,8 L H₂O. U ogledu su korišćena tri tretmana uljem čajnog drveta: (e) 80% standardne doze prohloraz-Mn, 0,48 g u 1,8 L H₂O, i 20% standardne doze ulja čajnog drveta, 0,04 g u 1 L H₂O; (f) 20% standardne doze ulja čajnog drveta, 0,04 g u 1 L H₂O i (g) standardna doza ulja čajnog drveta 0,24 g u 1 L H₂O. Uključena su i tri tretmana sa preparatom na bazi *B. subtilis*: (h) *B. subtilis* u standardnoj dozi, 8×10⁹ CFU g⁻¹ u 1 L H₂O; (i) 20% standardne doze *B. subtilis*, 1,6×10⁹ CFU g⁻¹ u 1 L H₂O, i 80% standardne doze prohloraz-Mn, 0,48 g u 1,8 L H₂O; i (j) 20% standardne doze *B. subtilis*, 1,6×10⁹ CFU g⁻¹ u 1 L H₂O. Svaki ogledni deo pokrivke je tretiran sa 100 mL rastvora fungicida ili 225 mL biofungicida i 10 mL suspenzije spora patogena. Ista količina česmenske vode je dodata u polja sa neinokulisanom i netretiranom kontrolom. Tretmani su postavljeni u potpuno slučajnom blok sistemu sa tri ponavljanja. Ubrana plodonosna tela su izmerena i svrstana u dve grupe na osnovu direktne vizuelne observacije: plodonosna tela bez simptomske zelene plesni i plodonosna tela pokrivena micelijom *Trichoderma* spp. Bazidiokarpi su brani u tri uzastopna talasa plodonošenja: prvom od 14. do 23. dana nakon postavljanja pokrivke, u drugom od 24. do 34. i u trećem od 35. do 45. dana. Efekat fungicida na prinos šampinjona je procenjen na osnovu biološke efikasnosti (BE) koja je izračunata kao procenat sveže mase ubranih plodonosnih tela i suve mase komposta u toku zasejavanja (**Chrysai-Tokousbalides i dr.**, 2007):

BE = (sveža masa ubranih plodonosnih tela/suva masa komposta u toku zasejavanja)×100.

Efikasnost fungicida u suzbijanju patogena je izračunata na osnovu formule koju je dao Abbott:

$$\% \text{ efikasnost} = [(I_c - I_t) / I_c] \times 100$$

I_c – pojava bolesti kod inokulisanе kontrole; I_t – pojava bolesti na tretiranim površinama (**Gea i dr.**, 2010). Pojava simptoma bolesti je izražena kao procentualni odnos broja plodonosnih tela sa simptomima i njihovog ukupnog broja.

Sinergističko ili antagonističko dejstvo fungicida je izračunato po Limpel-ovoj formuli (**Richer**, 1987): $E_e = (X + Y) - (XY) / 100$;

Ee – očekivani aditivni odgovor dve inhibitorne supstance (ulja čajnog drveta ili *B. subtilis* preparata i prohloraz-Mn fungicida); *X* i *Y* – procenat inhibicije koju izazivaju ulje čajnog drveta i prohloraz-Mn ili *B. subtilis* i prohloraz-Mn.

Sinergistički faktor (SF) je izračunat na osnovu Abbott-ove formule kao odnos očekivane i postignute inhibicije (Abbott, 1925). Kada je vrednost $SF > 1$ to ukazuje na sinergističku reakciju, $SF < 1$ antagonističku reakciju i $SF = 1$ aditivnu reakciju.

3.7. Testirana antifungalna jedinjenja

U ogledima je testirano šest fungicida (Tabela 5) i dva biofungicida (Tabela 6).

3.7.1. Fungicidi

Benzimidazoli

- Karbendazim, grupa benzimidazola, IUPAC metil-benzimidazol-2-ilkarbamat, prepart Galofungin WP (500 g/kg karbendazima), proizvod kompanije Galenika-Fitofarmacija, Srbija.
- Tiofanat-metil, grupa benzimidazola, IUPAC dimetil 4,4-(o-fenilen)-bis-(3-tioalofanat), preparat testirana formulacija WP (700 g/kg tiofanat-metila), proizvod kompanije Agromarket, Srbija.

Dikarboksimidi

- Iprodion, grupa dikarboksimida, IUPAC 3-(3,5-dihlorofenil)-N-izopropil-2,4-dioksoimidazolidin-1-karboksamid, preparat Kidan EC (255 g/L iprodiona), proizvod kompanije Bayer Crop Science, Nemačka.

Hlorfenili

- Hlorotalonil, grupa hlorfenila, IUPAC tetrahlor-izoftalo-nitril, preparat Bravo 750 SC (720 g/L hlorotalonila), proizvod kompanije Syngenta, Švajcarska.

Inhibitori demetilacije sterola

- Prohloraz-Mn, grupa imidazola, IUPAC N-propil-N-[2-(2,4,6- trihlorofenoksi)etil]-imidazol-1-karboksamid, preparat Octave WP (500 g/kg prohloraz-Mn), proizvod kompanije Bayer Crop Science, Nemačka.

Strobilurini

- Trifloksistrobin, grupa strobilurina, IUPAC (E, E)–metoksiimino-[2[1-(3-trifluormetilfenil)–etilenaminooksi-metil]-fenil]-metilacetat, preparat Zato 50 WG (500 g/kg trifloksistrobina), proizvod kompanije Bayer Crop Science, Nemačka.

Tabla 5. Karakteristike testiranih fungicida.

	Fungicid					
	Karbendazim	Tiofanat-metil	Prohloraz-Mn	Iprodion	Hlorotalonil	Trifloksistrobin
Komercijalni naziv	Galofungin WP	Testirana formulacija WP	Octave® WP	Kidan EC	Bravo 750 SC	Zato 50 WG
Formulacija	500 g/kg	700 g/kg	500 g/kg	255 g/L	720 g/L	500 g/kg
Dostavljač	Galenika-Fitofarmacija	Agromarket	Bayer Crop Science	Bayer Crop Science	Syngenta	Bayer Crop Science
Hemijska klasa	Benzimidazol	Benzimidazol	Imidazol	Dikarboksimid	Hloronitril	Strobilurin

3.7.2. Biofungicidi

Biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

- Ulje čajnog drveta, organski biofungicid dobijen destilacijom iz australijske biljke *Melaleuca alternifolia*, čajnog drveta, preparat Timorex Gold (BM 608) EC (23,8% ulja čajnog drveta, 65,4% rastvarača; 4,0% etanola; 2,3% NaOH i 4,5% surfaktanta), proizvod kompanije Stockton – Agrimor, Petach Tikva, Israel.

Preparat na bazi Bacillus subtilis

- *Bacillus subtilis*, organski biofungicid, preparat Serenade® WP (15,7% *B. subtilis* QST 713 ($5,13 \times 10^{10}$ CFU g⁻¹)), proizvod kompanije AgraQuest, Davis, Canada.

Tabla 6. Karakteristike testiranih antifungalnih supstanci - biofungicidi.

	Biofungicid	
Komercijalni naziv	Timorex Gold (BM 608) EC	Serenade® WP
Sastav	23,8% ulje čajnog drveta	15,7% <i>B. subtilis</i> QST 713 ($5,13 \times 10^{10}$ CFU g ⁻¹)
Dostavljač	Stockton – Agrimor	AgraQuest

3.8. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišćen je softverski paket Statistica za Windows 6.0 (Stat Soft Italija, 1997) i program *Statgraphics* (Statistical Graphics Corporation, USA). Podaci su analizirani serijom testova: ANOVA testom (jednofaktorskom analizom varijanse), *F*-testom, LSD testom i Duncan-ovim testom. Kriterijum za značajnost razlike je bio na nivou verovatnoće $P = 0,05$ (Sokal i Rohlf, 1995; Stanković i Ralević, 2002). Testovi su korišćeni u analizi dimenzija konidija, poređenju srednjih vrednosti prečnika kolonija testiranih izolata na različitim temperaturama, podlogama, pH vrednostima i prisustvu/odsustvu svetlosti. Takođe, primenjeni su u analizi efikasnosti fungicida u suzbijanju pojave simptoma zelene plesni nakon inokulacije sa *T. harzianum* T91 i biološke efikasnosti, tj. uticaja fungicida na prinos *A. bisporus* u oglednom gajilištu.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Simptomi zelene plesni

Uzorci plodonosnih tela *A. bisporus* sa nekrotičnim lezijama i mrljama smeđe i rđa boje sakupljeni su iz 13 gajilišta u Srbiji i jednog gajilišta u Bosni i Hercegovini (Tabela 7, Slika 1a-d), a supstrat sa tamno zelenim kolonijama je uzorkovan iz gajilišta u Lisovićima u Srbiji (Slika 1e, f). Iz uzorkovanog materijala je izolovano i determinisano 20 *Trichoderma* spp. izolata. Simptomi na plodonosnim telima *A. bisporus* su odgovarali simptomima zelene plesni koje izazivaju vrste roda *Trichoderma* na supstratu za gajenje šampinjona ili na pokrivci (Slika 1g i h) (Seaby, 1996a; Rinker i Alm, 2000).



Slika 1. Simptomi zelene plesni na plodonosnim telima *Agaricus bisporus* (a-d), u supstratu za gajenje šampinjona (e, f) i na supstratu (g) i pokrivci (h) u gajilištu.

Tabela 7. Testirani izolati *Trichoderma* spp.

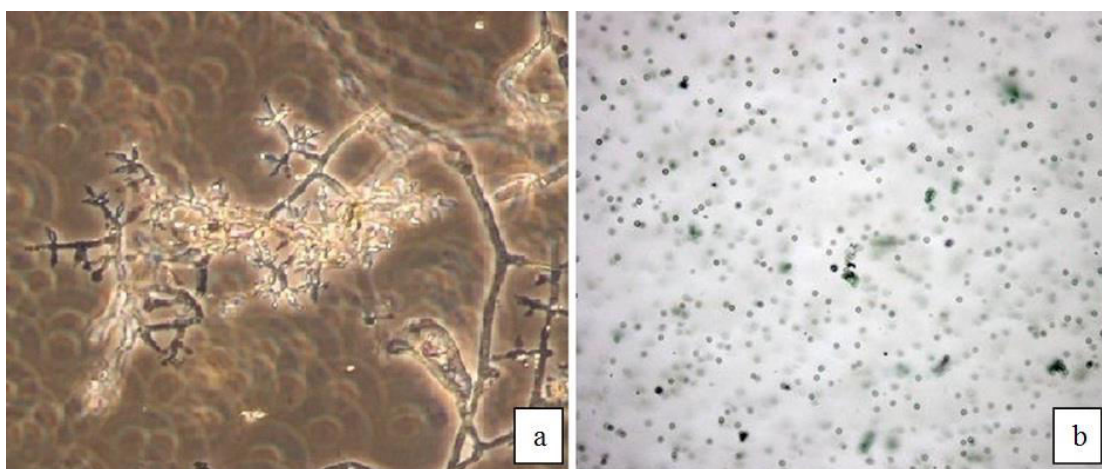
Vrsta	Kod	Poreklo	Godina	Supstrat
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> Samuels & W. Gams	T76	Lisovići, Barajevo, Srbija	2010	Supstrat za gajenje šampinjona
	T77	Lisovići, Barajevo, Srbija	2010	
	T85	Lisovići, Barajevo, Srbija	2010	
<i>Trichoderma atroviride</i> P. Karst.	T33	Zemun Polje, Srbija	2006	Plodonosno telo
	T60	Zemun Polje, Srbija	2008	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	T10	Požarevac, Srbija	2006	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>
	T52	Institute Zemun, Srbija	2008	
	T54	Kula, Srbija	2008	
	T64	Institute Zemun, Srbija	2009	
	T91	Institute Zemun, Srbija	2010	
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	T39	Veliko Gradište, Srbija	2007	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>
<i>Trichoderma virens</i> (J.H.Mill., Giddens & A.A.Foster) Arx	T5	Komirić, Srbija	2006	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>
<i>Trichoderma</i> sp. grupa 1	T1	Komirić, Srbija	2006	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>
<i>Trichoderma</i> sp. grupa 2	T63	Bečej, Srbija	2009	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>
<i>Trichoderma</i> sp. grupa 3	T37	Novi Slankamen, Srbija	2007	Plodonosno telo <i>Agaricus bisporus</i>
	T69	Sarajevo, Bosna i Hercegovina	2009	
	T71	Mol, Srbija	2010	
	T86	Skobalj, Srbija	2010	
	T88	Veliko Gradište, Srbija	2010	
	T90	Zemun Polje, Srbija	2010	

4.2. Morfo-fiziološke karakteristike i identifikacija dobijenih izolata

Na osnovu proučavanih morfo-fizioloških karakteristika *Trichoderma* spp. gajenih na PDA (izgled, miris, brzina rasta kolonija, vreme sporulacije i izgled konidiofora, dimenzije konidija, optimalna temperatura, pH i intenzitet svetlosti) svi izolati su klasifikovani u osam grupa (Tabela 7).

4.2.1. *Trichoderma atroviride* P. Karsten

Isolati T33 i T60 pripadaju prvoj grupi koju karakteriše bela, vazdušasta micelija sa intenzivnim mirisom na kokos. Kolonija boji PDA podlogu u žuto. Fijalide su pojedinačne, u paru, ili u grupi od 3 - 4, flašolike i postavljene pod uglom od 90°. Konidije su blede zelene na početku sporulacije, a kasnije postaju tamno zelene boje (Slika 2). Sporulacija se uočava nakon 48 h inkubacije na 20°C i spore se obrazuju u koncentričnim krugovima (Slika 3a). Dimenzije konidija su 2,6 - 3,9 x 2,0 - 3,3 µm. Odnos dužine i širine konidija se kretao u opsegu od 1,0 do 1,4, sa srednjom vrednošću od 1,2 (Tabela 8). Na osnovu pomenutih karakteristika izolati su identifikovani kao *T. atroviride* P. Karsten. Optimalna temperatura rasta za izolat T33 je 25°C a za izolat T60 30°C, a srednje vrednosti prečnika kolonija nakon 72 h na optimalnoj temperaturi su 89,6 (T33) i 66,6 mm (T60) (Tabela 9). Brzina rasta ovih izolata na 25°C je bila 0,40 - 0,63 mm/h (Tabela 8). **Dodd i dr.** (2003) su saopštili da *T. atroviride* raste brže na 30°C nego na 20°C što je u saglasnosti sa rezultatom dobijenim za T60 izolat. Slatkast miris kokosa *T. atroviride* je takođe karakteristika i drugih vrsta "Grane Viride" (*T. viride* i *T. koningii*) i potiče od antifungalnog metabolita, 6-pentil alfa pirona (**Ghisalberti i Rowland**, 1993; **Keszler i dr.**, 2000), koji se koristi u borbi protiv fitopatogenih gljiva (**Gams i Meyer**, 1998; **Hermosa i dr.**, 2000; **Dodd i dr.**, 2003).



Slika 2. *Trichoderma artroviride* - a) piramidalno razgranati konidiofori sa fijalidama pod uglom od 90°; b) konidije.

Tabela 8. Morfo-fiziološke karakteristike *Trichoderma* spp. izolata.

Sekcija	Grana	Vrsta/Grupa	Izolat	Stopa rasta na 25°C (mm/h)	Dimenzije konidija ^a (dužina x širina)	Odnos dužina/širina konidija ^a
Trichoderma	Rufa	<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	0,40 – 0,62	(2,6) – 3,0 – (3,9) × (2,0) – 2,5 – (3,3)	(1,0) – 1,2 – (1,4)
			T60			
		<i>Trichoderma koningii</i>	T39	0,48	(3,0) – 3,6 – (4,2) × (2,0) – 2,5 – (3,4)	(1,0) – 1,5 – (1,9)
Pachybasium B	Virens	<i>Trichoderma virens</i>	T5	0,67	(2,8) – 3,1 – (4,5) × (2,3) – 2,6 – (3,3)	(1,0) – 1,2 – (1,3)
	Lixii/ Catoptron	<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	0,62 – 0,77	(2,5) – 3,2 – (4) × (2,2) – 2,7 – (3,4)	(1,0) – 1,2 – (1,4)
			T77			
			T85			
		<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	0,60 – 0,75	(2,3) – 3,0 – (3,6) × (2,0) – 2,5 – (3,0)	(1,0) – 1,2 – (1,5)
			T52			
			T54			
			T64			
			T91			
		<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	0,58	(2,6) – 3,2 – (3,6) × (2,5) – 2,8 – (3,5)	(1,0) – 1,1 – (1,4)
		<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	0,78	(2,4) – 3,0 – (3,4) × (2,1) – 2,5 – (2,8)	(1,0) – 1,2 – (1,3)
		<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	0,70 – 0,85	(2,0) – 2,9 – (3,9) × (1,9) – 2,5 – (3,8)	(1,0) – 1,2 – (1,5)
			T69			
			T71			
			T86			
			T88			
			T90			

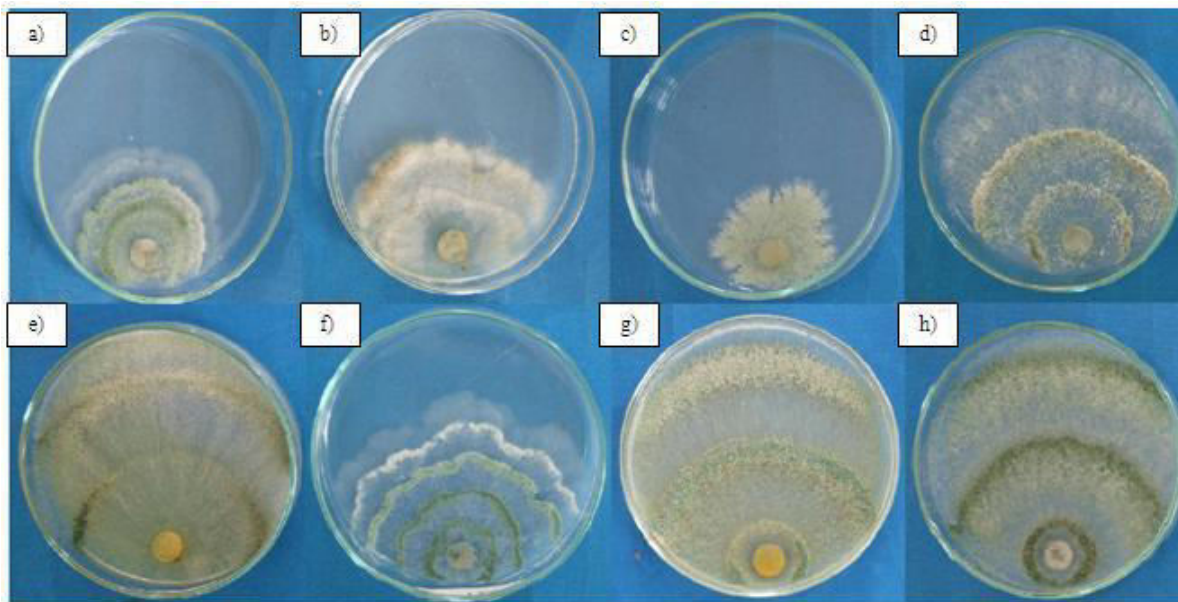
^aSrednja vrednost i opseg za dimenzije konidija i odnos dužina/širina konidija (20 merenja po izolatu); opseg je dat u zagradama.

Tabela 9. Uticaj temperature na rast kolonija *Trichoderma* spp. izolata na PDA nakon 72 h inkubacije.

Vrsta	Kod izolata	Dijametar kolonije $\pm$ SE (mm) ¹					<i>F</i>	SED ²
		17°C	20°C	25°C	30°C	35°C		
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	48,0 $\pm$ 0,8	73,4 $\pm$ 1,6	89,6 $\pm$ 2,8	38,6 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0	493,2	1,7
	T60	31,4 $\pm$ 1,2	50,6 $\pm$ 2,6	57,4 $\pm$ 1,0	66,6 $\pm$ 5,4	0,0 $\pm$ 0,0	91,1	3,1
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	47,6 $\pm$ 0,6	56,0 $\pm$ 1,4	69,4 $\pm$ 2,2	51,0 $\pm$ 3,4	0,0 $\pm$ 0,0	184,0	2,2
<i>Trichoderma virens</i>	T5	28,0 $\pm$ 1,4	40,0 $\pm$ 0,8	96,4 $\pm$ 0,8	31,6 $\pm$ 0,6	30,0 $\pm$ 0,0	1135,7	1,0
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	23,4 $\pm$ 2,6	38,6 $\pm$ 1,6	89,6 $\pm$ 1,4	65,4 $\pm$ 1,2	3,0 $\pm$ 0,4	485,4	1,8
	T77	26,4 $\pm$ 0,6	44,0 $\pm$ 2,0	97,6 $\pm$ 1,4	74,0 $\pm$ 5,0	12,0 $\pm$ 0,0	244,0	2,8
	T85	21,4 $\pm$ 1,2	31,6 $\pm$ 0,8	111,4 $\pm$ 0,8	56,0 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 1,2	2013,1	1,2
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	24,6 $\pm$ 1,2	50,0 $\pm$ 1,4	108,6 $\pm$ 2,0	116,4 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 0,4	1171,5	1,7
	T52	24,4 $\pm$ 0,6	41,6 $\pm$ 0,8	86,6 $\pm$ 5,2	139,4 $\pm$ 0,4	9,0 $\pm$ 0,4	496,3	2,7
	T54	38,6 $\pm$ 1,2	56,0 $\pm$ 0,8	83,4 $\pm$ 2,6	81,4 $\pm$ 3,2	0,0 $\pm$ 0,0	569,7	2,2
	T64	21,0 $\pm$ 1,0	42,0 $\pm$ 2,0	93,4 $\pm$ 1,8	115,0 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,0	1253,2	1,5
	T91	32,6 $\pm$ 1,2	52,6 $\pm$ 3,6	86,6 $\pm$ 0,6	128,4 $\pm$ 2,2	11,0 $\pm$ 0,4	540,8	2,2
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	58,0 $\pm$ 0,8	78,6 $\pm$ 1,2	83,6 $\pm$ 0,6	62,4 $\pm$ 2,0	4,0 $\pm$ 0,0	837,2	1,3
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	48,0 $\pm$ 0,6	69,6 $\pm$ 0,6	113,0 $\pm$ 0,8	129,4 $\pm$ 7,0	8,0 $\pm$ 0,0	234,2	3,5
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	35,0 $\pm$ 1,6	63,0 $\pm$ 0,6	106,6 $\pm$ 2,8	126,4 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	1142,2	1,8
	T69	34,6 $\pm$ 1,6	62,6 $\pm$ 1,4	110,6 $\pm$ 5,4	131,0 $\pm$ 3,8	5,0 $\pm$ 0,4	292,7	3,5
	T71	36,0 $\pm$ 2,0	57,4 $\pm$ 1,2	104,0 $\pm$ 1,2	124,0 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	1849,0	1,3
	T86	36,6 $\pm$ 1,2	64,6 $\pm$ 0,8	100,4 $\pm$ 4,2	133,0 $\pm$ 3,0	2,0 $\pm$ 0,0	4080,6	2,7
	T88	33,4 $\pm$ 1,2	59,4 $\pm$ 1,6	122,6 $\pm$ 0,8	128,6 $\pm$ 0,4	12,0 $\pm$ 0,0	3525,4	1,1
	T90	30,6 $\pm$ 1,2	52,0 $\pm$ 0,8	102,6 $\pm$ 0,6	128,0 $\pm$ 1,0	2,0 $\pm$ 0,0	406,3	0,9

¹Srednja vrednost šest ponavljanja $\pm$ SE, standardna greška srednje vrednosti.

²SED, standardna greška razlika; df, stepeni slobode = 25; *P* = 0,001.



Slika 3. Testirani izolati na PDA, pet dana nakon inokulacije na 30°C: **a.** *Trichoderma artroviride*; **b.** *T. koningii*; **c.** *T. virens*; **d.** *T. aggressivum* f. sp. *europaeum*; **e.** *T. harzianum*; **f.** *Trichoderma* sp. Grupa 1; **g.** *Trichoderma* sp. Grupa 2; **h.** *Trichoderma* sp. Grupa 3.

4.2.2. *Trichoderma koningii* Oudem

Izolat T39 se odlikuje belom, gustom, vazdušastom, radijalno rastućom micelijom koja boji hranjivu podlogu voštano žuto, i poseduje slatkast miris kokosa (Slika 3b). Fijalide su uske, oblika ampule i obrazuju se u grupama od 3 do 5. Žute, glatke, elipsoidne ili ovalne konidije su se formirale 5. dana inkubacije na PDA na 20°C. Dimenzije konidija su 3,0 - 4,2 x 2,0 - 3,4 µm, dok je odnos dužine i širine od 1,0 do 1,9, sa srednjom vrednošću od 1,5 (Tabela 8). Na osnovu pomenutih karakteristika, izolat iz gajilišta u Velikom Gradištu izolovan 2007. godine identifikovan je kao *T. koningii* Oudem. Ovaj takson je relativno homogen i ograničen na istočni deo Severne Amerike i Evropu (**Samuels i dr.**, 2006). Konidije izolata T39 iz Srbije su istih dimenzija kao i izolata iz Mađarske, Holandije, SAD-a i Kanade (**Samuels i dr.**, 2002). Optimalna temperatura za rast je bila 25°C, a dijametar kolonije nakon 72 h je bio 69,4 mm (Tabela 9). Brzina rasta je bila 0,48 mm/h na 25°C, 0,35 mm/h na 30°C, dok je na 35°C rast bio odsutan što je u saglasnosti sa literaturnim podacima (**Samuels i dr.**, 2006). *T. koningii* pripada “Grani Viride” i stvara aromatični 6-pentil alfa piron koji

inhibira klijanje fungalnih spora (**Worasatit i dr.**, 1994) i kao takav se primenjuje u biološkoj zaštiti gajenih biljaka od patogenih gljiva (**Samuels i dr.**, 2006).

4.2.3. *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx.

Izolat T5 se odlikuje belom micelijom prva tri dana nakon zasejavanja na PDA podlogu a kasnije postaje bledo zelena, kao posledica početka sporulacije. Karakteristika izolata je odsustvo radijalnog rasta (Slika 3c). Fijalide su flašolike, obrazuju se u grupi od 2 do 5 na terminalnim granama. Loptaste konidije, tamno zelene i glatkih zidova obrazovale su se nakon 72 h inkubacije na 20°C. Dimenzije konidija su 2,8 - 4,5 x 2,3 - 3,3 µm, a odnos dužine i širine je u opsegu od 1,0 do 1,3 sa srednjom vrednošću od 1,2 (Tabela 8). Na osnovu uočenih karakteristika, izolat T5 je identifikovan kao *T. virens* (Miller, Giddens & Foster) Arx. Nakon 72 h kultivacije, najbolji rast je zabeležen na 25°C (prečnik kolonije - 96,4 mm), sa brzinom rasta od 0,67 mm/h, dok je značajna inhibicija rasta uočena na 30°C (prečnik kolonije- 31,6 mm) (Tabela 9). Na osnovu rezultata **Chaverri i dr.** (2003b), *T. virens* je jedinstven predstavnik roda koji je sposoban da dobro raste i sporuliše na 35°C što je i potvrđeno našim rezultatima (prečnik kolonije - 30,0 mm). Ova vrsta takođe ima pozitivan efekat na rast biljaka jer sintetiše nekoliko vrsta antibiotika i sprečava rast zemljišnih patogena (**Miller i dr.**, 1975; **Howell i dr.**, 2000; **Brimner i Boland**, 2003).

4.2.4. *Trichoderma aggressivum* Samuels & Gams f. *europaeum*

Tri izolata (T76, T77 i T85) su imala iste morfo-fiziološke karakteristike. Obrazovali su belu, rastresitu, glatku, vazdušastu miceliju koja kasnije tokom rasta formira bele grudvičaste tvorevine (Slika 3d). Tokom rasta kolonije PDA medijum se boji bledo žuto. Fijalide su flašolikog oblika, obrazuju se u grupama od 2 do 5 na terminalnim granama. Sporulacija se odvijala u periodu od 2. do 5. dana rasta na PDA podlozi na 20°C. Formirale su se blede zelene konidije, glatkih zidova, dimenzija 2,5 - 4,0 x 2,2 - 3,4 µm i srednje vrednosti odnosa dužine i širine 1,2 (Tabela 8). Na osnovu opisanih karakteristika, izolati su identifikovani kao *T. aggressivum* Samuels & Gams f. *europaeum*. Optimalna temperatura za sve testirane izolate je bila 25°C, sa brzinom rasta 0,62 - 0,77 mm/h i

prečnikom kolonija od 89,6 mm do 111,4 mm nakon tri dana inkubacije. Na temperaturi od 35°C rast izolata je bio izuzetno spor, prečnici kolonija su bili 2,6 mm (T85), 3,0 mm (T76) i 12,0 mm (T77) (Tabela 9). Navedene karakteristike izolata su bile u saglasnosti sa rezultatima **Samuels i dr.** (2002) za *T. aggressivum*, uzročnika epidemija u gajilištima *A. bisporus*.

4.2.5. *Trichoderma harzianum* Rifai

Pet izolata (T10, T52, T54, T64 i T91) se odlikovalo vazdušastom i belom micelijom sa koncentričnim zonama rasta nakon sporulacije (Slika 3e). Obojenost PDA medijuma je varirala od blede ka intenzivno žutoj boji. Fijalide su bile flašolike, u klasterima od 3 do 5. Intenzivna sporulacija, obrazovanje eliptičnih konidija glatkih zidova, zabeležena je nakon 72 h kultivacije na 20°C. Sa sazrevanjem spore su postajale tamnije. Izmerene dimenzije konidija su bile 2,3 - 3,6 x 2,0 - 3,0 µm, odnos dužine i širine je bio između 1,0 i 1,5, a srednja vrednost je bila 1,2 (Tabela 8). Na osnovu prethodnih rezultata, ustanovljeno je da su svi proučavani izolati pripadali vrsti *T. harzianum* Rifai. Optimalna temperatura za sve izolate je bila 30°C, osim za T54 koji je neznatno bolje rastao na 25°C. Brzina rasta na 30°C je bila 0,56 - 0,97 mm/h, a prečnik kolonija od 81,4 mm (T54) do 139,4 mm (T52), dok je najsporiji rast bio na 35°C (Tabela 9). Na osnovu morfologije konidija, fijalida i konidiofora **Hermosa i dr.** (2000) ističe da je *T. harzianum* agregatna grupa kojoj pripadaju prethodno opisani izolati.

4.2.6. *Trichoderma* sp. Grupa 1

Izolat T1 je karakterisala bujna micelija bez pigmentacije koja je obrazovala grudvičaste agregate, sa granularnom ili puderastom površinom, zonirano raspoređene u koncentričnim prstenovima (Slika 3f). Elipsoidne glatke konidije obrazovale su se na flašolikim fijalidama nakon 48 h inkubacije na 20°C. Konidije su bile od svetlo do tamno zelene boje, zavisno od zrelosti, dimenzija 2,6 - 3,6 x 2,5 - 3,5 µm i odnosa dužine i širine između 1,0 i 1,4 sa srednjom vrednošću od 1,1 (Tabela 8). Micelija je dobro rasla na svim testiranim temperaturama osim na 35°C (4,0 mm), dok je maksimalni rast zabeležen na

25°C (prečnik kolonije - 83,6 mm) sa brzinom rasta od 0,58 mm/h (Tabela 9). Na osnovu dobijenih rezultata, ovaj izolat nije identifikovan do nivoa vrste i označen je kao Grupa 1.

4.2.7. *Trichoderma* sp. Grupa 2

Izolat T63 je karakterisala micelija oker boje sa puderastom površinom, radijalnim rastom i mirisom kokosa (Slika 3g). Nakon 48 h inkubacije na 20°C obrazovale su se žute konidije koje su sa sazrevanjem postajale blede zelene i davale žuto-smeđu boju koloniji. Fijalide su flašolike i uglavnom u grupi od 3 do 5. Elipsoidne konidije glatkih zidova su imale dimenzije 2,4 - 3,4 x 2,1 - 2,8 µm i odnos dužine i širine u opsegu od 1,0 do 1,3 sa srednjom vrednošću 1,2 (Tabela 8). Optimalna temperatura za rast je bila 30°C, a dijametar kolonije nakon 72 h inkubacije je bio 129,4 mm (Tabela 9). Kao i prethodni i ovaj izolat nije identifikovan do nivoa vrste i označen je kao Grupa 2.

4.2.8. *Trichoderma* sp. Grupa 3

Brojni izolati, T37, T69, T71, T86, T88, T90, koji su imali zajedničke karakteristike klasifikovani su u Grupu 3. Karakteriše ih bujna, vazdušasta, snežno bela micelija sa radijalnim rastom i sposobnošću da luči pigment koji boji PDA podlogu u žuto. Sporulacija je zabeležena nakon 48 h inkubacije na 20°C. Fijalide oblika ampule su obrazovale zelene konidije formirajući zelene koncentrične prstenove (Slika 3h). Elipsoidne glatke konidije su bile dimenzija 2,0 - 3,9 x 1,9 - 3,8 µm i odnosa dužine i širine između 1,0 i 1,5 sa srednjom vrednošću od 1,2 (Tabela 8). Svi izolati su imali uniformni rast na testiranim temperaturama. Optimalna temperatura je bila 30°C a prečnik kolonije nakon tri dana kultivacije se kretao od 124,00 do 133,0 mm (Tabela 9). Ova grupa izolata na bazi predstavljenih karakteristika nije mogla biti identifikovana do nivoa vrste.

Grupe koje nisu određene do nivoa vrste su bile veoma slične *T. harzianum* izolatima na osnovu morfologije konidija, fijalida i kolonija, dok su se razlikovale u brzini rasta kolonija na različitim temperaturama na PDA podlozi.

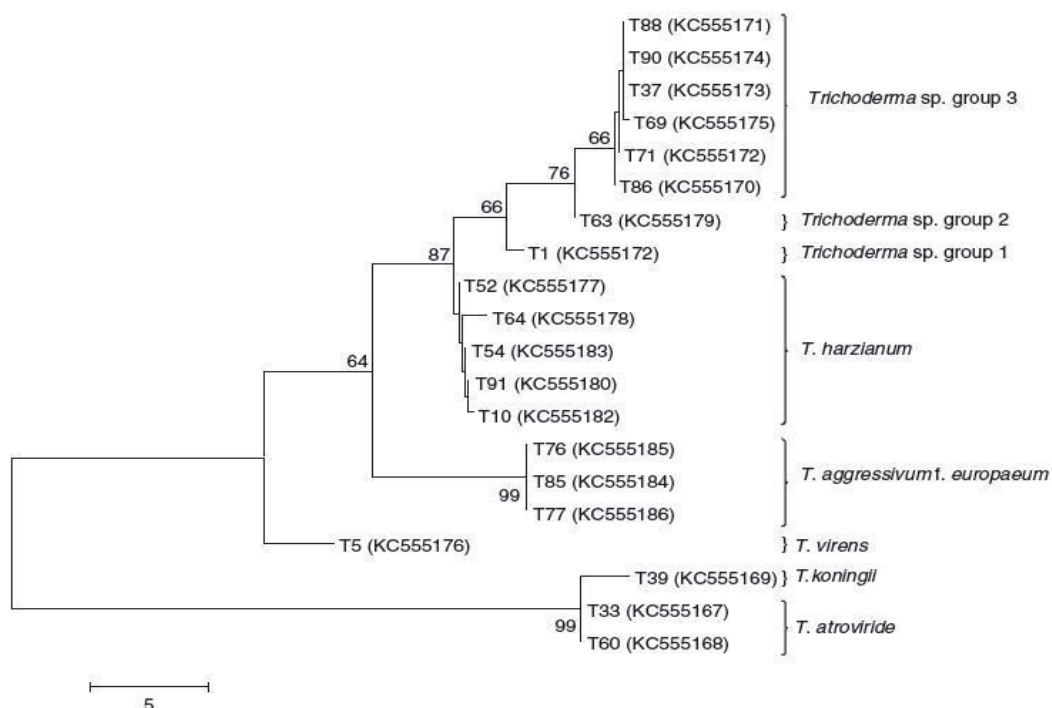
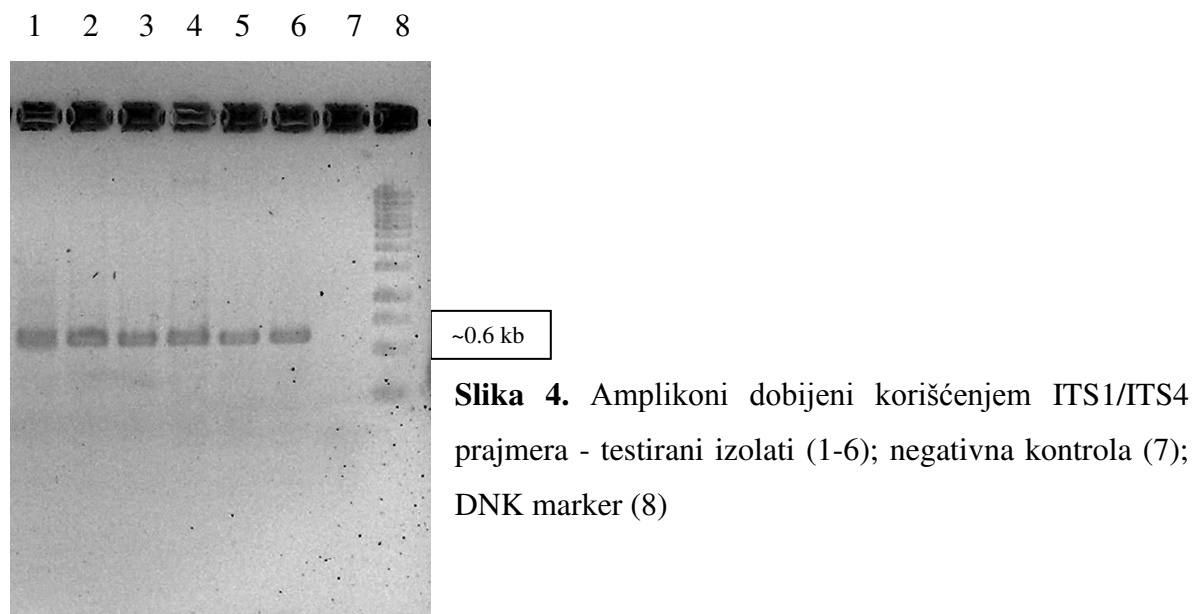
Svi testirani izolati su na osnovu morfoloških karakteristika svrstani u tri grane: (1) grana Rufa – *T. atroviride* (T33, T60) i *T. koningii* (T39); (2) grana Virens – *T. virens* (T5); i (3) grana Lixii/catoptron – *T. aggressivum* f. *europaeum* (T76, T77, T85), *T. harzianum* (T10, T52, T54, T64, T91), i *Trichoderma* spp. (Grupe 1 – T1; Grupe 2 – T63, i Grupe 3 – T37, T69, T71, T86, T88, T90). **Bisset** (1991) je na osnovu morfoloških karakteristika podelio rod *Trichoderma* u pet sekcija: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum* i *Hypocreanum*. **Druzhinina i Kubicek** (2005) su svrstali Granu Rufa u sekciju *Trichoderma*, a Virens i Lixii/catoptron u sekciju *Pachybasium*.

4.3. Filogenetski odnosi izolata

Analiza molekularnog polimorfizma testiranih *Trichoderma* spp. izolata je rađena da bi se potvrdila identifikacija urađena na bazi morfo-fizioloških karakteristika. **Kindermann i dr.** (1998) su prvi uradili filogenetsku analizu celog roda. Korišćenjem sekvencionalne analize ITS1 regiona rDNA, utvrdili su da vrste u sekciji *Pachybasium* imaju parafiletsko poreklo pa su ovu sekciju podelili u dve, A i B. **Kullnig-Gradinger i dr.** (2002) su kombinovanjem molekularnih markera (ITS1 i ITS2 sekvencionalna analiza, RAPD), fizioloških (analiza izoenzima) i fenotipskih karakteristika i analizom teleomorfa ispitivanih vrsta potvrdili ovaj nalaz, a takođe i saopštili da vrste iz sekcije *Longibrachiatum* imaju monofiletsko poreklo.

Korišćenjem univerzalnog para prajmera ITS1/ITS4 za direktan PCR, očekivana dužina amplikona od oko 0,6 kb je dobijena za sve izolate, kod negativne kontrole nije bilo amplifikacije (Slika 4). Nakon purifikacije umnoženih PCR produkata i direktnog sekvenciranja u oba smera, dobijena je kompletna 5,8S rRNA sekvenca. Filogenetskom analizom ITS1/ITS4 sekvenci izdvojeno je 8 linija čime je potvrđena identifikacija na osnovu morfo-fizioloških karakteristika (Slika 5). Dvanaest od testiranih 20 *Trichoderma* izolata su klasifikovani u pet različitih vrsta, dok 8 preostalih nije bilo moguće identifikovati do nivoa vrste ni nakon molekularne analize. Neidentifikovani izolati, T71, T69, T88, T86, T37 i T90, su formirali poseban klaster (Grupa 3), dok su T1 i T63 obrazovali odvojene linije (Grupa 1 i Grupa 2). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na bazi morfo-fizioloških karakteristika. Primenom obe metode pokazano je da

se Grupe 1, 2 i 3 međusobno razlikuju kao i od izolata koji pripadaju drugim vrstama roda *Trichoderma* (Slika 5).



Slika 5. Filogenetsko stablo konstruisano Maximum Parsimony metodom za 20 *Trichoderma* spp. izolata, na osnovu analize 5.8S rRNK genskog regiona, a korišćenjem ITS1/4 para prajmera. Sekvence su deponovane u NCBI bazu i dodeljen im je broj koji je prikazan u zagradi.

Ospina-Giraldo i dr. (1999) su analizom ITS sekvence došli do zaključka da *T. harzianum* predstavlja najbližeg pretka *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. aggressivum* f. *aggressivum*, agresivnih kolonizatora šampinjona. **Kredics i dr.** (2010) smatraju da su ove dve forme *T. aggressivum* nastale adaptacijom postojećih populacija *T. harzianum* na uslove sredine u gajilištima šampinjona iz bar dva nezavisna izvora, na Britanskim Ostrvima u Evropi i Pensilvaniji u Sjedinjenim Američkim Državama. Ova bliska filogenetska veza između *T. harzianum* i *T. aggressivum* je takođe pokazana u radu **Kullnig-Gradinger i dr.** (2002) na osnovu analize ITS1 i ITS2, D1 i D2 regiona 28S rDNK, male subjediniice mitohondrijalne rDNK i dobijenog filogenetskog stabla. Njihove studije su klasifikovale *T. virens* u odvojenu granu što se poklapalo sa rezultatima **Dodd i dr.** (2000). Ipak, ovi autori su analizom ITS sekvenci i D2 regiona 28S rRNK brojnih *Trichoderma* spp. izolata dobili granu koja se sastoji samo od *T. harzianum*, dok *T. atroviride* i *T. koningii* čine posebnu granu. Navedeni odnosi su potvrđeni i rezultatima **Kubicek i dr.** (2003) i **Kindermann i dr.** (1998) koji su uočili razlike od samo 1-3 nukleotida između *T. atroviride* i *T. koningii*. Ipak, **Lieckfeldt i Seifert** (2000) tvrde da su *T. virens* i *T. harzianum* u bliskom srodstvu i da pripadaju nemonofiletskoj sekciji *Pachybasium* B.

4.4. Uticaj uslova kultivacije na rast *Trichoderma* spp.

4.4.1. Sastav podloge

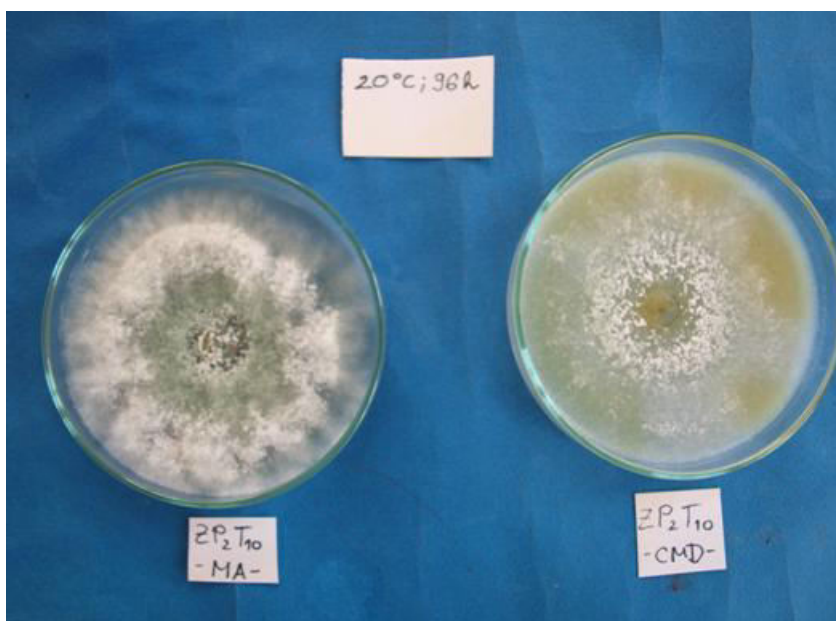
Uticaj sastava podloge na rast proučavanih *Trichoderma* spp. izolata posmatran je nakon dva dana gajenja na PDA, MA i CMD na temperaturi od 25°C. Dimenzije kolonija su se statistički značajno razlikovale na osnovu Duncan testa, na nivou verovatnoće od 0,05 (Tabela 10). Dijametar kolonija je bio u opsegu od 29,4 mm na CMD (T39) do 82,0 mm na PDA podlozi (T88) (Tabela 10). Micelija svih izolata je bila dobro razvijena na svim testiranim podlogama (Slika 6, 7).

Među ispitivanim podlogama, statistički značajno ($P > 0,05$) veći dijametar kolonija *Trichoderma* izolata je uočen na PDA i MA podlogama u odnosu na CMD podlogu. Takođe, uočena je i ranija sporulacija na bogatijoj podlozi kao što su PDA i MA u odnosu na siromašniji medijum kao što je CMD.

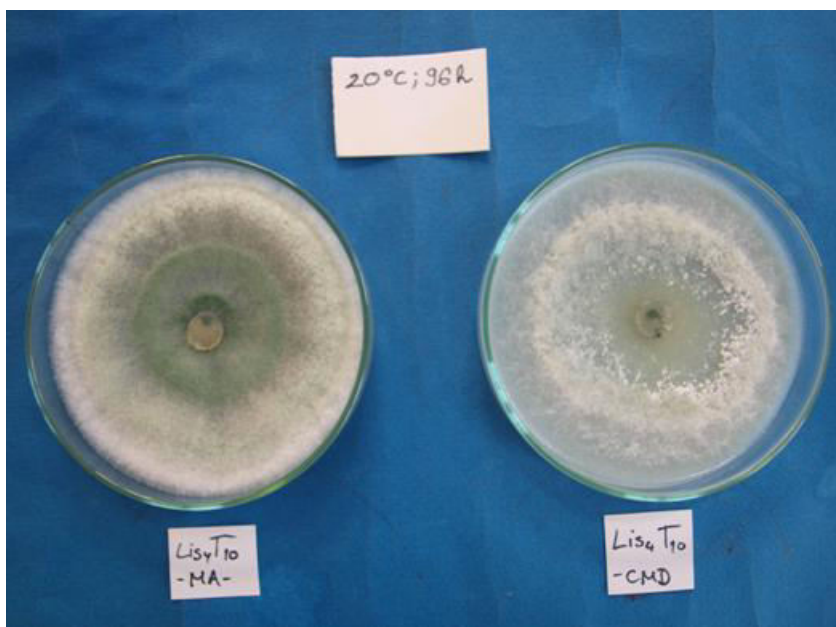
Tabela 10. Uticaj sastava hranljive podloge na rast micelije izolata *Trichoderma* spp. na 25°C, nakon 48h kultivacije.

Vrsta	Oznaka izolata	Rast kolonije nakon 2 dana kultivacije ± SE (mm)		
		PDA	MA	CMD
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	58,0±3,4 ^a	64,6±0,6 ^a	47,4±0,6 ^b
	T60	38,6±3,8 ^c	74,0±2,4 ^a	54,6±0,6 ^b
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	46,0±2,4 ^b	56,0±0,0 ^a	29,4±1,8 ^c
<i>Trichoderma virens</i>	T5	64,6±1,4 ^a	65,4±0,6 ^a	48,0±2,0 ^b
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	58,6±0,6 ^a	53,4±0,6 ^b	44,6±1,4 ^c
	T77	64,6±2,4 ^a	52,6±0,6 ^b	48,6±0,6 ^b
	T85	74,0±1,2 ^a	41,4±0,6 ^b	38,0±1,2 ^b
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	72,0±2,4 ^a	68,0±3,2 ^a	56,0±2,4 ^b
	T52	58,6±0,6 ^c	68,0±0,0 ^a	62,6±1,4 ^b
	T54	54,6±2,4 ^a	56,0±1,0 ^a	52,6±1,8 ^a
	T64	62,6±3,6 ^a	61,4±0,6 ^a	56,0±2,4 ^a
	T91	57,4±0,6 ^b	59,4±0,6 ^a	52,0±2,0 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	56,0±1,2 ^b	68,6±1,4 ^a	56,0±2,4 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	75,4±0,6 ^a	71,4±0,6 ^a	58,0±4,0 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	72,0±4,2 ^a	54,6±1,0 ^b	46,0±1,2 ^b
	T69	77,4±0,6 ^a	74,0±1,0 ^{ab}	70,0±2,0 ^b
	T71	69,4±0,6 ^a	48,6±3,4 ^b	38,6±1,4 ^c
	T86	69,4±0,6 ^a	59,4±6,0 ^a	61,4±0,6 ^a
	T88	82,0±0,0 ^a	73,4±0,6 ^b	55,4±0,6 ^c
	T90	68,6±0,6 ^a	50,0±1,6 ^b	46,6±0,6 ^b

¹Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike na $P = 0,05$ u okviru istog izolata.



Slika 6. Rast izolata *Trichoderma* sp. Grupa 3 T90 na MA i CMD podlogama nakon 96h inkubacije na 20°C.



Slika 7. Rast izolata *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* T77 na MA i CMD podlogama nakon 96h inkubacije na 20°C.

Među testiranim *Trichoderma* izolatima postoje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima dijametra kolonija na PDA, MA i CMD podlogama ($P > 0,05$) (Tabele 11-13). Na PDA podlozi nakon 48h rasta na 25°C najmanji porast kolonije imao je izolat *T. atroviride* T60 a najveći *Trichoderma* sp. Grupa 3 T88 (Tabela 11).

Tabela 11. Razlike u porastu kolonija na PDA podlozi *Trichoderma* izolata nakon 48h inkubacije na 25°C.

Izolati*	Srednja vrednost (mm)	SE	Značajnost
<i>Trichoderma atroviride</i> T60	38,6	3,8	a
<i>Trichoderma koningii</i> T39	46,0	2,4	b
<i>Trichoderma harzianum</i> T54	54,6	2,4	c
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1 T1	56,0	1,2	cd
<i>Trichoderma harzianum</i> T91	57,4	0,6	cd
<i>Trichoderma atroviride</i> T33	58,0	3,4	cde
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T76	58,6	0,6	cde
<i>Trichoderma harzianum</i> T52	58,6	0,6	cde
<i>Trichoderma harzianum</i> T64	62,6	3,6	def
<i>Trichoderma virens</i> T5	64,6	1,4	ef
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T77	64,6	2,4	ef
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T90	68,6	0,6	fg
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T71	69,4	0,6	fg
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T86	69,4	0,6	fg
<i>Trichoderma harzianum</i> T10	72,0	2,4	gh
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T37	72,0	4,2	gh
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T85	74,0	1,2	gh
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2 T63	75,4	0,6	gh
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T69	77,4	0,6	hi
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T88	82,0	0,0	i

a,b,c,d,e,f,g,h,i - izolati sa različitim slovom statistiki se značajno razlikuju ($P = 0,05$)

Najmanji porast kolonije na MA podlozi nakon 48h kultivacije na 25°C imao je izolat *T. aggressivum* f. *europaeum* T85 a najveći izolat *Trichoderma* sp. Grupa 3 T69 (Tabela 12).

Tabela 12. Razlike u porastu kolonija na MA podlozi *Trichoderma* izolata nakon 48h inkubacije na 25°C.

Izolati*	Srednja vrednost (mm)	SE	Značajnost
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T85	41,4	0,6	a
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T71	48,6	3,4	b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T90	50,0	1,6	bc
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T77	52,6	0,6	bcd
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T76	53,4	0,6	bcd
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T37	54,6	1,0	bcde
<i>Trichoderma koningii</i> T39	56,0	0,0	bcde
<i>Trichoderma harzianum</i> T54	56,0	1,0	bcde
<i>Trichoderma harzianum</i> T91	59,4	0,6	cdef
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T86	59,4	6,0	defg
<i>Trichoderma harzianum</i> T64	61,4	0,6	efgh
<i>Trichoderma atroviride</i> T33	64,6	0,6	fghi
<i>Trichoderma virens</i> T5	65,4	0,6	ghi
<i>Trichoderma harzianum</i> T10	68,0	3,2	hij
<i>Trichoderma harzianum</i> T52	68,0	0,0	hij
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1 T1	68,6	1,4	hij
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2 T63	71,4	0,6	ij
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T88	73,4	0,6	j
<i>Trichoderma atroviride</i> T60	74,0	2,4	j
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T69	74,0	1,0	j

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j - izolati sa različitim slovom statistiki se značajno razlikuju ($P = 0,05$)

Na CMD podlozi nakon 48h rasta na 25° najmanji porast kolonije ostvario je izolat *T. koningii* T39 a najveći, kao i pri gajenju na MA podlozi, izolat *Trichoderma* sp. Grupa 3 T69 (Tabela 13).

Tabela 13. Razlike u porastu kolonija na **CMD** podlozi *Trichoderma* spp. izolata nakon 48h inkubacije na 25°C.

Izolati*	Srednja vrednost (mm)	SE	Značajnost
<i>Trichoderma koningii</i> T39	29,4	1,8	a
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T85	38,0	1,2	b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T71	38,6	1,4	b
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T76	44,6	1,4	c
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T37	46,0	1,2	c
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T90	46,6	0,6	cd
<i>Trichoderma atroviride</i> T33	47,4	0,6	cde
<i>Trichoderma virens</i> T5	48,0	2,0	cde
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T77	48,6	0,6	cde
<i>Trichoderma harzianum</i> T91	52,0	2,0	def
<i>Trichoderma harzianum</i> T54	52,6	1,8	efg
<i>Trichoderma atroviride</i> T60	54,6	0,6	fg
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T88	55,4	0,6	fg
<i>Trichoderma harzianum</i> T10	56,0	2,4	fgh
<i>Trichoderma harzianum</i> T64	56,0	2,4	fgh
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1 T1	56,0	2,4	fgh
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2 T63	58,0	4,0	ghi
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T86	61,4	0,6	hi
<i>Trichoderma harzianum</i> T52	62,6	1,4	i
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T69	70,0	2,0	j

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j - izolati sa različitim slovom statistiki se značajno razlikuju ($P = 0,05$)

4.4.2. Temperatura

Trichoderma spp. izolati su gajeni na PDA podlozi 72 h na različitim temperaturama i mereni su prečnici kolonija. Dobijene vrednosti (Tabela 9) su statistički obrađene analizom varijanse dva faktora varijabiliteta, temperature (17°C, 20°C, 25°C, 30°C i 35°C) i izolata (20) u 6 ponavljanja (ukupno: 5 x 20 x 6 = 600 podataka). Uzorci su pokazali normalne raspodele (χ^2 test, $P > 0,05$) čime je ispunjen važan uslov za primenu analize varijanse. U statističkoj obradi podataka pošlo se od hipoteze da između srednjih vrednosti temperatura i srednjih vrednosti izolata nema statistički značajnih razlika za posmatrano svojstvo tj. rast micelije ($P > 0,05$).

Zabeležene su statistički značajne razlike u srednjim vrednostima prečnika kolonija na različitim temperaturama (Tabela 14). Najmanji rast izolata je bio na 35°C, a najveći na 25°C i 30°C (Tabela 15). Takođe među izolatima postoje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima rasta kolonija (Tabela 14, 16). Najmanja srednja vrednost prečnika kolonije dobijena je za izolat *T. atroviride* T60, a najveća za *Trichoderma* sp. Grupa 2 T63 (Tabela 16). Interakcije između temperatura i izolata su takođe statistički značajne (Tabela 14).

Tabela 14. Dvo-faktorstka analiza varijanse (ANOVA) porasta kolonija *Trichoderma* spp. izolata.

	<i>Suma kvadrata</i>	<i>df</i>	<i>Srednja vrednost kvadrata</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
A: temperatura	127036,00	4	31759,00	2215,54	0,000
B: izolati	18826,60	19	990,87	69,12	0,000
Interakcija AB	51296,00	76	674,95	47,08	0,000
Rezidualno	7167,33	500	14,33		
Suma	204326,00	599			

F vrednost se tumači iz tablice gde je data maksimalna značajna vrednost za odgovarajuće parametre: *P* – nivo značajnosti i *df* – stepeni slobode.

Tabela 15. Srednja vrednost prečnika kolonija za sve testirane isolate *Trichoderma* spp. na različitim temperaturama

Temperature	Srednja vrednost (mm)	SD	Značajnost
35°C	5,48	30,38	a
17°C	33,98	10,24	b
20°C	54,18	12,10	c
25°C	95,68	16,04	d
30°C	96,32	34,16	d

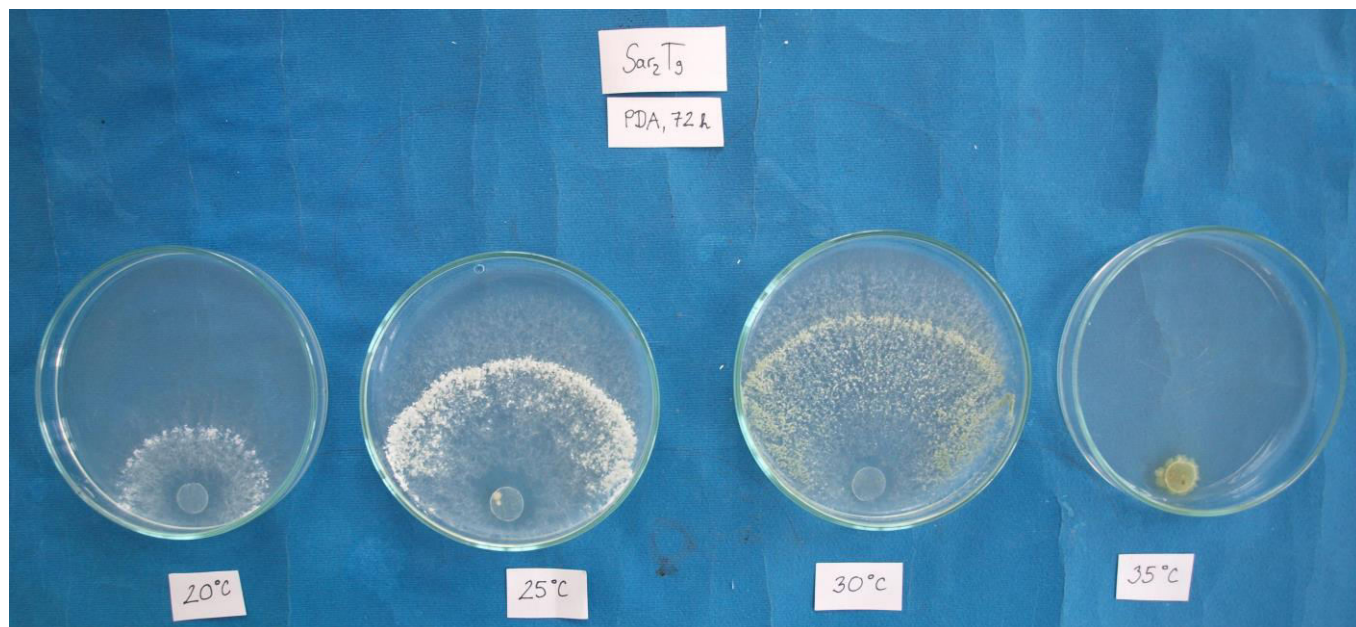
a,b,c,d - temperature sa različitim slovom statistiki se značajno razlikuju ($P = 0,05$)

Tabela 16. Srednja vrednost rasta kolonije na svim temperaturama za testirane *Trichoderma* spp. isolate.

Izolati*	Srednja vrednost (mm)	SD	Značajnost
<i>Trichoderma atroviride</i> T60	41,20	13,62	a
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T76	44,00	39,42	b
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T85	44,60	48,80	b
<i>Trichoderma koningii</i> T39	44,80	23,18	b
<i>Trichoderma virens</i> T5	45,20	25,56	b
<i>Trichoderma atroviride</i> T33	49,92	30,70	bc
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T77	50,80	31,06	bc
<i>Trichoderma harzianum</i> T54	51,88	29,14	bc
<i>Trichoderma harzianum</i> T64	55,94	36,18	c
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1 T1	57,32	29,04	c
<i>Trichoderma harzianum</i> T10	60,12	34,54	d
<i>Trichoderma harzianum</i> T52	60,20	48,14	d
<i>Trichoderma harzianum</i> T91	62,24	37,06	de
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T90	63,04	39,92	de
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T71	64,28	38,58	ef
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T37	66,20	40,26	fg
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T86	67,32	39,40	fg
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T69	68,76	38,44	g
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3 T88	71,20	42,54	gh
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2 T63	73,60	33,02	h

a,b,c,d,e,f,g,h - izolati sa različitim slovom statistiki se značajno razlikuju ($P = 0,05$)

Optimalna temperatura za rast micelije *Trichoderma* spp. izolata na svim testiranim podlogama (PDA, MA i CMD) je bila 25°C ili 30°C (Slika 8). Isti temperaturni optimum su saopštili **Overton i dr.** (2006) za *Trichoderma* izolate iz Evrope i Severne Amerike na PDA i CMD, kao i **Chaverri i dr.** (2003b) za izolate iz Indonezije, Rusije, Evrope, Severne i Juzne Amerike, na PDA.



Slika 8. Rast izolata *Trichoderma* sp. Grupa 3 T69 na 20°C, 25°C, 30°C i 35°C na PDA nakon 72h inkubacije.

4.4.3. pH podloge

Gajenjem testiranih *Trichoderma* spp. izolata na različitim pH vrednostima PDA podloge uočeno je da dvanaest izolata ima najveći rast pri pH 5,0, pet izolata pri pH 6,0 i tri pri pH 7,0. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazima **Woo i dr.** (2004) koji su potvrdili da *Trichoderma* spp. izolati imaju veću brzinu rasta u kiselo–neutralnim uslovima sredine, pH 5 - 7. Takođe, svi testirani izolati pokazuju statistički značajno niži rast na pH 9 ($P < 0,05$).

U rastu izolata *T. harzianum* T91 na pH 5,0, 6,0 i 7,0 nema statistički značajne razlike, dok pH 9,0 inhibira rast svih proučavanih izolata (Tabela 17). Sporoji rast sa

povećanjem pH vrednosti je uočen kod 12 izolata, dok je kod ostalih 8 maksimalni rast bio pri pH 6,0 ili 7,0 što je naročito izraženo kod izolata *Trichoderma* sp. grupe 3. Dijametar kolonije veći od 80,0 mm na pH 5,0 nakon 72h zapažen je kod izolata *T. artroviride* T33, *T. harzianum* T10 i *Trichoderma* sp. grupa 3 T88, dok je najveći rast kolonije postignut pri H 6,0 kod *T. koningii* T39 (88,6 mm). Izolat *Trichoderma* sp. grupa 1 T1 je specifičan jer su njegove kolonije imale najmanji prečnik na svim testiranim pH vrednostima, od 28,0 mm do 31,4 mm, što je ujedno i najsporiji uočeni rast među testiranim izolatima (Tabela 17).

Tabela 17. Uticaj pH podloge na rast micelije *Trichoderma* spp. izolata (mm $\pm$ SE) na PDA nakon 72h gajenja.

		pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	82,4 $\pm$ 2,0 ^a	81,6 $\pm$ 1,2 ^a	76,6 $\pm$ 4,0 ^{ab}	76,0 $\pm$ 1,8 ^{ab}	66,2 $\pm$ 2,2 ^b
	T60	70,0 $\pm$ 0,8 ^{ab}	74,0 $\pm$ 0,0 ^a	73,0 $\pm$ 1,4 ^a	66,6 $\pm$ 2,6 ^{bc}	64,4 $\pm$ 2,0 ^c
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	87,0 $\pm$ 1,0 ^{ab}	88,6 $\pm$ 0,6 ^a	86,4 $\pm$ 0,6 ^{ab}	84,6 $\pm$ 1,2 ^b	76,0 $\pm$ 2,2 ^c
<i>Trichoderma virens</i>	T5	61,4 $\pm$ 0,8 ^a	59,0 $\pm$ 1,2 ^{ab}	56,0 $\pm$ 2,0 ^{bc}	55,0 $\pm$ 0,4 ^c	53,4 $\pm$ 0,4 ^c
<i>Trichoderma aggressivum f. europaeum</i>	T76	73,4 $\pm$ 0,8 ^b	78,4 $\pm$ 1,0 ^a	75,0 $\pm$ 0,4 ^b	69,6 $\pm$ 1,0 ^c	68,6 $\pm$ 1,4 ^c
	T77	72,6 $\pm$ 0,6 ^a	65,6 $\pm$ 1,4 ^b	66,6 $\pm$ 0,6 ^b	62,0 $\pm$ 1,2 ^c	61,6 $\pm$ 1,6 ^c
	T85	77,0 $\pm$ 2,2 ^a	73,0 $\pm$ 1,4 ^{ab}	74,0 $\pm$ 0,8 ^a	69,4 $\pm$ 1,6 ^b	68,6 $\pm$ 1,2 ^c
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	84,0 $\pm$ 1,8 ^a	78,0 $\pm$ 0,8 ^b	78,6 $\pm$ 0,8 ^{ab}	72,0 $\pm$ 2,8 ^c	70,4 $\pm$ 2,2 ^c
	T52	73,6 $\pm$ 1,2 ^a	67,4 $\pm$ 0,4 ^b	67,0 $\pm$ 3,0 ^b	65,6 $\pm$ 2,8 ^b	65,0 $\pm$ 1,0 ^b
	T54	64,4 $\pm$ 1,2 ^a	58,4 $\pm$ 1,4 ^b	57,6 $\pm$ 1,4 ^{bc}	55,0 $\pm$ 0,4 ^c	49,6 $\pm$ 0,8 ^d
	T64	77,0 $\pm$ 1,6 ^a	73,0 $\pm$ 2,2 ^b	73,6 $\pm$ 0,8 ^{ab}	70,4 $\pm$ 0,8 ^{bc}	67,4 $\pm$ 1,0 ^c
	T91	64,6 $\pm$ 0,6 ^a	64,6 $\pm$ 2,0 ^a	64,4 $\pm$ 2,8 ^{ab}	59,6 $\pm$ 1,2 ^{bc}	55,4 $\pm$ 0,4 ^c
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	31,4 $\pm$ 0,8 ^a	29,0 $\pm$ 0,6 ^b	28,6 $\pm$ 0,4 ^b	29,4 $\pm$ 0,4 ^b	28,0 $\pm$ 0,0 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	59,0 $\pm$ 1,6 ^{bc}	65,4 $\pm$ 0,8 ^a	60,4 $\pm$ 1,6 ^b	60,0 $\pm$ 0,8 ^b	56,6 $\pm$ 0,4 ^c
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	75,4 $\pm$ 0,6 ^b	77,6 $\pm$ 0,8 ^a	73,0 $\pm$ 0,8 ^c	71,4 $\pm$ 1,0 ^c	69,0 $\pm$ 0,4 ^d
	T69	68,6 $\pm$ 3,2 ^{ab}	69,4 $\pm$ 0,4 ^{ab}	71,0 $\pm$ 0,6 ^a	65,4 $\pm$ 0,8 ^{bc}	61,4 $\pm$ 2,2 ^c
	T71	70,4 $\pm$ 1,4 ^c	75,0 $\pm$ 1,2 ^{ab}	77,0 $\pm$ 2,0 ^a	72,0 $\pm$ 1,8 ^{bc}	71,6 $\pm$ 0,6 ^{bc}
	T86	71,6 $\pm$ 2,0 ^a	72,6 $\pm$ 0,6 ^a	74,0 $\pm$ 1,4 ^a	69,6 $\pm$ 1,0 ^a	63,0 $\pm$ 2,6 ^b
	T88	84,6 $\pm$ 1,2 ^a	79,0 $\pm$ 0,8 ^b	76,6 $\pm$ 0,6 ^{bc}	75,0 $\pm$ 0,6 ^c	68,6 $\pm$ 1,2 ^d
	T90	72,4 $\pm$ 1,8 ^a	71,4 $\pm$ 0,6 ^a	70,0 $\pm$ 0,8 ^{ab}	66,4 $\pm$ 1,0 ^{bc}	63,0 $\pm$ 1,0 ^c

¹Ista slova označavaju da nema statistički značajne razlike u okviru istog izolata; $P = 0,05$ (Fisher LSD test).

4.4.4. Uticaj svetlosti na rast *Trichoderma* izolata

Neonsko svetlo ($\lambda = 533 - 725 \text{ nm}$) je imalo inhibitorni efekat na rast testiranih *Trichoderma* izolata (Tabela 18), što je u saglasnosti sa rezultatima **Chen i Moy** (2004). Izolat *T. harzianum* T10 je nakon 72h kultivacije postigao maksimalni rast kolonije i u prisustvu (104,0 mm) i u odsustvu neonskog osvetljenja (108,0 mm) nasuprot izolatu *Trichoderma* sp. grupa 1 T1 koji je imao dva puta manje vrednosti i u prisustvu (34,6 mm) i u odsustvu (36,0 mm) neonskog osvetljenja.

Tabela 18. Uticaj svestlosti na rast [mm] *Trichoderma* spp. izolata na PDA nakon 72h.

Vrsta/Grupa	Izolati	Svetlost	Mrak
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	59,0±0,4 ^a	80,6±2,8 ^b
	T60	89,6±2,0 ^a	94,0±2,6 ^a
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	77,4±0,8 ^a	78,0±0,8 ^a
<i>Trichoderma virens</i>	T5	66,0±1,6 ^a	68,0±0,0 ^a
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	85,4±1,4 ^a	86,6±1,2 ^a
	T77	72,6±0,6 ^a	75,6±0,4 ^b
	T85	86,4±1,4 ^a	92,4±2,0 ^b
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	104,0±1,8 ^a	108,0±0,0 ^b
	T52	86,6±0,4 ^a	88,0±0,0 ^b
	T54	80,6±0,4 ^a	84,0±0,0 ^b
	T64	76,0±0,0 ^a	81,0±0,4 ^b
	T91	72,4±0,4 ^a	74,0±0,4 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	34,6±1,4 ^a	36,0±0,0 ^a
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	82,0±2,6 ^a	85,6±2,0 ^a
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	78,0±0,0 ^a	81,0±0,4 ^b
	T69	97,4±0,8 ^a	101,0±0,6 ^b
	T71	68,0±0,0 ^a	83,0±1,4 ^b
	T86	88,0±3,6 ^a	99,4±0,4 ^b
	T88	84,6±1,0 ^a	85,6±0,4 ^a
	T90	70,0±0,0 ^a	87,0±0,4 ^b

Srednja vrednost kolonije ± SE u koloni praćena istim slovom ukazuje da nema statistički značajne razlike za $P = 0,05$ (Fisher LSD test).

4.5. Provera patogenosti i virulentnosti *Trichoderma* spp. izolata

Test za proveru virulentnosti je pokazao da svi testirani *Trichoderma* izolati pokazuju visok nivo virulentnosti za *A. bisporus*. Simptomi nisu uočeni kada su plodonosna tela tretirana sterilnom vodom koja je služila kao negativna kontrola, dok je svih 20 tretiranih izolata imalo izražene simptome bolesti na šeširima (Tabela 19).

Tabela 19. Patogene karakteristike *Trichoderma* spp. izolata.

Vrsta/Grupa	Izolat	Virulentnost ^a
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	4
	T60	3
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	4
<i>Trichoderma virens</i>	T5	4
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	4
	T77	3
	T85	3
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	4
	T52	3
	T54	5
	T64	3
	T91	5
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	2
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	4
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	5
	T69	3
	T71	5
	T86	4
	T88	3
	T90	5

^aSkala za ocenjivanje stepena virulentnosti je 0 – 5: 0 - bez simptoma i 5 - izraženi simptomi.

Inokulacijom unutrašnje strane šešira *A. bisporus* nakon uklanjanja drške pokazano je da ispitivani izolati imaju različit stepen virulentnosti. Nakon dva dana inkubacije svih izolata na sobnoj temperaturi uočena je pojava pramenova bele micelije na listićima himenofora. Četvrtog dana nakon inokulacije najintenzivniji simptomi, pojava zelene micelije sa obilnom sporulacijom na unutrašnjoj i spoljašnjoj strani šešira, su uočeni kod izolata *T. harzianum* T 64 i *Trichoderma* sp. Grupa 3 T69. Kod svih ostalih izolata lamele himenofora su bile prekrivene belom micelijom što ukazuje na odsustvo sporulacije (Slika 9). Osmog dana svi šeširi plodonosnih tela *A. bisporus* inokulisani testiranim izolatima bili su potpuno prekriveni bujnom zelenom micelijom sa obilnom sporulacijom, mekani sa znacima truljenja što odgovara simptomima zelene plesni.



Slika 9. Izgled plodonosnih tela *Agaricus bisporus* nakon 8 dana veštačke inokulacije unutrašnje strane šešira sa 1 mL suspenzije micelije i spora (10^6 mL^{-1}) *Trichoderma* sp. Grupa 3 T69. Šešir bez simptoma je inokulisan sterilnom vodom.

Razlike u stepenu intenziteta simptoma u zavisnosti od testiranog izolata nisu bile značajne u testu virulentnosti izvedenom na unutrašnjoj strani šešira. Inokulacija spoljašnje strane šešira je izazvala različite simptome nakon četiri dana a osmog dana su zapaženi sledeći simptomi (Slika 10):

- *T. atroviride*, svetlo smeđ prsten oko mesta inokulacije (prečnika 10 mm) okružen belom micelijom (prečnika 20 mm);
- *T. koningii*, tamno smeđ prsten oko mesta inokulacije (prečnika 14 mm) okružen belom micelijom (prečnika 15 mm);
- *T. virens*, tamno smeđ prsten (prečnika 15 mm);
- *T. aggressivum* f. sp. *europaeum*, tamno smeđ prsten (prečnika 10 mm);
- *T. harzianum*, tamno smeđe nekroze (prečnika 10 mm) praćene obilnom sporulacijom (prečnika 20 mm);
- *Trichoderma* sp. Grupa 1, tamno smeđ prsten (prečnika 20 mm);
- *Trichoderma* sp. Grupa 2, tamno smeđ prsten (prečnika 10 mm) okružen belom micelijom (prečnika 20 mm);
- *Trichoderma* sp. Grupa 3, isti simptomi kao i kod *T. harzianum*.



Slika 10. Izgled plodonosnih tela *Agaricus bisporus* nakon 8 dana veštačke inokulacije spoljašnje strane šešira sa 20 μL suspenzije spora ($3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) *T. koningii* T39. Šešir bez simptoma je inokulisan sterilnom vodom.

Test virulentnosti je pokazao da većina testiranih izolata ispoljava visok nivo virulentnosti za *A. bisporus*. Varijacije u nivou virulentnosti unutar vrste ili grupe su u

saglasnosti sa rezultatima **Collopy i dr.** (2001) za kolekciju populacija roda *Verticillium*. Dva izolata *T. harzianum* (T54, T91) i tri izolata *Trichoderma* sp. Grupa 3 (T37, T71, T90) ispoljili su najviši nivo virulentnosti. Najslabiji simptomi su zapaženi nakon inokulacije izolatom *Trichoderma* sp. grupe 1 (T1). Procenjeni stepeni virulentnosti za sve *Trichoderma* spp. isolate dati su u tabeli 19.

Na osnovu progresivnog razvoja simptoma bolesti, može se zaključiti da izolati koji pripadaju *T. aggressivum* f. *europaeum* izazivaju najblaže simptome na spoljašnjoj strani šesira *A. bisporus* u poređenju sa ostalim testiranim izolatima *Trichoderma* spp. koji izazivaju truljenja tkiva. Ovaj nalaz potvrđuje činjenicu da su *T. aggressivum* i *A. bisporus* kompetitori za supstrat.

Nakon inokulacije pokrivke suspenzijom spora *T. harzianum* T91 prvi simptomi su se razvili 16. dana na šesirima plodonosnih tela *A. bisporus* u gajilištu u vidu smeđih mrlja boje rde dužine 3 - 4 mm. Male, bele kolonije (prečnika 10 mm) su se pojavile na površini pokrivke 29. dana nakon inokulacije i u narednih nekoliko dana su kolonizovale pokrivku, postale blede zelene a potom i smaragdno zelene zbog intenzivne sporulacije. Zabeleženi simptomi su imali karakteristike zelene plesni *A. bisporus* i bili u saglasnosti sa opisom u literaturi (**Seaby**, 1996a). Patogen je reizolovan na PDA podlogu radi poređenja sa originalnim izolatom za inokulaciju čime su potvrđeni Kohovi postulati.

4.6. Antifungalna aktivnost testiranih fungicida na izolate *Trichoderma* spp. in vitro

U zaštiti šampinjona od bolesti kod nas i u svetu se koristi samo nekoliko komercijalnih fungicida. Tako su fungicidi karbendazim i prohloraz-Mn do pre desetak godina zvanično preporučivani za primenu u zemljama evropske unije (**Anonymous**, 2006). Međutim, trenutno u ovom regionu samo prohloraz-Mn ima dozvolu da se koristi za zaštitu *A. bisporus* (**Grogan**, 2008). Mada nijedan fungicid nije registrovan za primenu u zaštiti gajenih vrsta gljiva od bolesti u Srbiji, uzgajivači koriste neke fungicide registrovane za biljne kulture kao što su prohloraz-Mn, karbendazim i tiofanat-metil (**Potočnik i dr.**, 2010a). Karbendazim je u poslednjoj dekadi bio često korišćen fungicid zbog zadovoljavajuće efikasnosti i niske cene na tržištu, a u nešto manjoj meri i tiofanat-metil. Ovi fungicidi su široko primenjivani devedesetih godina prošlog veka, ali usled povlačenja fungicida iz grupe benzimidazola sa tržišta, zbog potencijalno štetnog uticaja na zdravlje ljudi i smanjene efikasnosti, prohloraz-Mn ostaje jedini raspoloživi fungicid. Hlorotalonil, tiofanat-metil i tiabendazol se zvanično preporučuju i primenjuju u Sjedinjenim Američkim Državama i Kanadi (**Bonnen i Hopikins**, 1997). Iprodion i trifloksistrobin su testirani za mikopatogene gljive i primenjivani u drugim zemljama (**Gea i dr.**, 1996; **Chrysai-Tokousbalides i dr.**, 2007). Izolati *Trichoderma* spp. su dobijeni iz gajilišta u kojima je pokrivka tretirana fungicidima prohloraz-Mn, karbendazimom ili tiofanat-metilom. Iprodion, hlorotalonil i trifloksistrobin su sporadično korišćeni u gajilištima šampinjona u Srbiji, a tiabendazol nije dostupan na našem tržištu i zbog toga nije uključen u procenu toksičnosti. Testirana je i toksičnost dva biofungicida na bazi ulja čajnog drveta i na bazi *B. subtilis*. Biofungicid na bazi *B. subtilis* se već primenjuje u gajilištima šampinjona u Srbiji i njegova toksičnost je testirana i na druge izazivače bolesti šampinjona (**Todorović i dr.**, 2012).

Na osnovu kriterijuma **Gea i dr.** (2003; 2005), analizirani izolati su bili osetljiviji na prohloraz-Mn, karbendazim, hlorotalonil i iprodion jer su njihove EC₅₀ vrednosti bile manje od 5,0 mg/L, nego na tiofanat-metil i trifloksistrobin. *T. harzianum* T91 je bila najosetljivija na prohloraz-Mn (EC₅₀ 0,01 mg/L), *T. harzianum* T54 na hlorotalonil (EC₅₀ 0,12 mg/L), *T. artroviride* T60 na karbendazim (EC₅₀ 0,25 mg/L) a *Trichoderma* sp. Grupa 3 T90 na iprodion (EC₅₀ 0,84 mg/L). Efikasnost tiofanat-metila i trifloksistrobina je

bila niža sa EC₅₀ od 3,75 mg/L za *T. artroviride* T33 (tiofanat-metil) i 10,25 mg/L za *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 (trifloksistrobin). Najrezistentniji izolati na trifloksistrobin su *Trichoderma* sp. Grupa 1 T1 (EC₅₀ 178,23 mg/L) i *T. harzianum* T52 (EC₅₀ 151,02 mg/L). Na osnovu kriterijuma **Gea i dr.** (2003; 2005) u grupu rezistentnih izolata na ovaj fungicid spadaju i *T. artroviride* T33 (EC₅₀ 97,41 mg/L), *T. aggressivum* f. *europaeum* T85 (EC₅₀ 84,55 mg/L), *Trichoderma* sp. Grupa 3 T71 (EC₅₀ 65,80 mg/L), *Trichoderma* sp. Grupa 2 T63 (EC₅₀ 52,87 mg/L) i *Trichoderma* sp. Grupa 3 T90 (EC₅₀ 51,67 mg/L) (Tabele 20-25).

4.6.1. Imidazoli: Prohloraz-Mn

Prohloraz-Mn, fungicid iz grupe imidazola, je uveden u zaštitu šampinjona početkom osamdesetih godina XX veka. Imidazoli pripadaju grupi DMI fungicida - inhibitora demetilacije ergosterola. Oni inhibiraju biosintezu ergosterola onemogućavanjem demetilacije njegovih prekursora narušavajući integritet i propustljivost ćelijskih membrana. Rezistentnost na ove fungicide je multigenske prirode (**Scheinflug**, 1994).

Izolati su bili najosetljiviji na prohloraz-Mn, EC₅₀ vrednosti su bile u opsegu od 0,01 (*T. harzianum* T91) do 0,72 mg/L (*T. harzianum* T10), dok je EC₅₀ bila ispod 0,10 mg/L za 57% izolata. Svi testirani izolati su bili jako inhibirani (inhibicija veća od 80% u poređenju sa kontrolom) pri koncentraciji od 1,00 mg/L ili većim. Samo je nekoliko izolata dobro raslo pri koncentraciji fungicida prohloraz-Mn od 0,0625 mg/L sa inhibicijom manjom od 30% u poređenju sa kontrolom. Nije zabeležena statistički značajna razlika između izolata jer su se intervali poverenja za EC₅₀ vrednosti potpuno preklapali (Tabela 20). Ovaj fungicid je ispoljio najveću toksičnost od svih ispitivanih fungicida za izolate *Trichoderma* spp. Prohloraz-Mn je visokotoksičan i za druge patogene šampinjona u Srbiji kao što su *Cladobotryum dendroides* uzročnika paučinaste plesni šampinjona (EC₅₀ < 0,1 mg/L), *Verticillium fungicola* izazivača suve truleži (EC₅₀ = 1,11 - 2,51 mg/L) i *Mycogone perniciosa* izazivača mokre truleži (EC₅₀ < 0,01 mg/L) (**Potočnik i dr.**, 2008, 2009a, 2010a).

Prohloraz-Mn je korišćen godinama jer je imao visoku efikasnost u suzbijanju mikopatogenih gljiva širom sveta, a nije pokazivao toksičnost za *A. bisporus* (**Van Zaayen**

i Van Adrichem, 1982; Fletcher i dr., 1983; Grogan i dr., 2000; Garrod, 2004). Woo i dr. (2004) i Sobieralski i dr. (2012) su pokazali da je efikasan za *T. pleurotum*, uzročnik smanjenog prinosa u farmama *Pleurotus ostreatus*, a nema negativni efekat na rast micelije bukovače. Međutim, nakon široke i dugotrajne primene ovog fungicida u regionima sa intenzivnim gajenjem šampinjona, utvrđena je smanjena osetljivost *V. fungicola*. Geels (1996) je saopštio da osamdesetih godina prošlog veka izolati iz Holandije nisu rasli pri koncentraciji fungicida prohloraz-Mn od 10 mg/L, dok su nakon deset godina inhibitorne koncentracije bile čak 40 - 80 mg/L. U Španiji je od 1992.-98. utvrđeno povećanje EC_{50} fungicida prohloraz-Mn za *V. fungicola*, od 0,8 do 8,8 mg/L, dok je 1999. godine 60% izolata raslo na 50 mg/L a 40% na 100 mg/L ovog fungicida (Gea i dr., 1996, 2003, 2005). U Velikoj Britaniji, takođe krajem devedesetih godina, samo je 30% izolata *V. fungicola* bilo visokoosetljivo (EC_{50} =1 - 4 mg/L) dok je 70% izolata pokazalo smanjenu osetljivost (EC_{50} = 5 - 8 mg/L) (Grogan i dr., 2000). Umerenu rezistentnost su pokazali i izolati ovog patogena poreklom iz Belgije (Desrumeaux i dr., 1998),

Izolati *C. dendroides* iz Srbije su bili visokoosetljivi na prohloraz-Mn, sa EC_{50} od 0,1 mg/L (Potočnik i dr., 2009a). U Španiji, Gea i dr. (1995) su utvrdili da su izolati *Cladoboryum* spp. rasli na podlozi sa fungicidom prohloraz-Mn u koncentraciji od 2,0 mg/L. Grogan i Gaze (2000) navode da je 25% Britanskih izolata *C. dendroides* bilo umereno rezistentno na ovaj fungicid (EC_{50} = 0,14 - 7,80 mg/L). Kasnije Grogan (2006) je utvrdila da prohloraz-Mn omogućava zaštitu *A. bisporus* od pojave paučinaste plesni 45 - 65% u oglednom gajilištu, dok nije sprečavao pojavu ranih simptoma paučinaste plesni. Autor ističe da se i pored smanjenja efikasnosti prohloraz-Mn i dalje preporučuje za primenu u suzbijanju *Cladobotryum* spp. s tim da je neophodno redovno praćenje osetljivosti u populaciji patogena na ovaj fungicid. Iz grupe fungicida kojoj pripada prohloraz-Mn, u gajilištima *A. bisporus* su primenjivani triadimefon u Indiji (Sharma i Kumar, 2005) i pirifenoks u Velikoj Britaniji (Grogan, 2006) koji su ispoljili zadovoljavajuću efikasnost u suzbijanju *Cladobotryum* vrsta.

Tabela 20. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na prochloraz-Mn.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	0,07 (0,02-0,16)	11,97 (5,74-35,28)	0,58 (0,50-0,66)	0,04	6,64
	T60	0,02 (0,003-0,05)	0,54 (0,32-1,80)	0,92 (0,70-1,14)	0,002	2,00
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	0,30 (0,21-0,42)	10,50 (5,58-27,04)	0,83 (0,74-0,92)	1,37	27,36
<i>Trichoderma virens</i>	T5	0,19 (0,09-0,33)	12,45 (6,60-30,18)	0,76 (0,63-0,78)	0,85	17,27
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	0,10 (0,08-0,12)	0,42 (0,33-0,60)	2,01 (1,78,24)	0,27	8,91
	T77	0,31 (0,24-0,41)	4,54 (2,44-12,99)	1,10 (0,95-1,26)	0,57	28,36
	T85	0,38 (0,25-0,70)	39,45 (10,09-535,97)	0,64 (0,53-0,74)	0,19	35,00
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	0,72 (0,48-1,34)	28,88 (9,62-189,34)	0,80 (0,69-0,91)	0,13	65,82
	T52	0,07 (0,03-0,11)	2,36 (1,42-5,12)	0,83 (0,72-0,94)	1,26	6,18
	T54	0,10 (0,05-0,16)	5,56 (2,52-20,19)	0,73 (0,62-0,83)	0,04	8,82
	T64	0,03 (0,004-0,06)	2,02 (0,95-12,29)	0,68 (0,52-0,83)	0,08	2,36
	T91	0,01 (0,003-0,02)	0,28 (0,18-0,57)	0,91 (0,75-1,08)	3,68	1,00
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	0,18 (0,11-0,26)	7,35 (3,83-20,44)	0,79 (0,63-0,89)	1,52	16,00
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	0,04 (0,01-0,07)	1,11 (0,67-2,86)	0,88 (0,72-1,04)	0,86	3,64
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	0,05 (0,01-0,08)	2,20 (1,10-9,50)	0,77 (0,61-0,92)	0,44	4,27
	T69	0,02 (0,001-0,05)	3,52 (1,58-14,66)	0,54 (0,43-0,65)	0,80	1,36
	T71	0,13 (0,07-0,20)	10,48 (4,90-36,59)	0,67 (0,58-0,76)	0,37	11,45
	T86	0,03 (0,009-0,05)	1,01 (0,60-2,72)	0,83 (0,68-0,98)	1,88	2,64
	T88	0,19 (0,10-0,30)	5,61 (3,06-14,03)	0,87 (0,76-0,98)	0,39	16,91
	T90	0,18 (0,12-0,25)	5,85 (3,30-13,79)	0,84 (0,75-0,94)	1,95	17,00

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

4.6.2. Hlornitrili: Hlorotalonil

Sedamdesetih godina prošlog veka u Evropi i Severnoj Americi uveden je hlorotalonil, fungicid iz grupe hlornitrila, koji je uspešno štitio šampinjona od pojave bolesti (**Van Zaayen i Rutjens**, 1978). Hlorotalonil je nesistemski, protektivni fungicid širokog spektra delovanja koji nespecifično deluje na enzimski sistem gljiva sprečavajući glikolizu i produkciju energije. Zbog višestrukog mehanizma delovanja, gljive ne razvijaju rezistentnost na ovaj fungicid (**Smith i dr.**, 2007).

Koncentracija hlorotalonila od 0,16 mg/L nije uspešno suzbijala rast (inhibirala je manje od 20% rast kolonije, EC₂₀) dok je koncentracija od 0,88 mg/L i veća jako inhibirala rast većine izolata (inhibicija rasta veća od 70%, EC₇₀). EC₅₀ vrednost hlorotalonila je bila od 0,12 (*T. harzianum* T54) do 0,97 mg/L (*T. koningii* T39 i *T. artroviride* f. *europaeum* T77). Nije zabeležena statistički značajna razlika između izolata jer su se intervali poverenja za EC₅₀ vrednosti potpuno preklapali (Tabela 21).

Hlorotalonil je retko primenjivan u gajilištima u Srbiji a uključen je u ispitivanja zbog testiranja ili korišćenja u drugim zemljama (**Chaloux i dr.**, 1993; **Bonnen i Hopkins**, 1997). Prema **Potočnik i dr.** (2009a, b) ovaj fungicid je u ogledima *in vitro* ispoljio zadovoljavajuću toksičnost za izolate *C. dendroides* iz Srbije (EC₅₀ = 0,09 - 1,68 mg/L). Međutim, **Sharma i Kumar** (2005) su istakli da zbog duge karence, visoke toksičnosti za *A. bisporus* i smanjenja prinosa nije preporučljiv za primenu.

Bonnen i Hopkins (1997) su utvrdili da su izolati *V. fungicola* iz Severne Amerike umereno do visoko rezistentni na hlorotalonil jer pri koncentraciji od 50 mg/L *in vitro* izazivaju inhibiciju rasta micelije ispitivanih izolata za 50% u odnosu na kontrolu. Relativno visok nivo rezistentnosti izolata *V. fungicola* je vrlo iznenađujući jer je hlorotalonil fungicid širokog spektra delovanja kod koga razvoj rezistentnosti nije uobičajen. Uprkos ovim podacima autori ističu da ipak postoji zadovoljavajući nivo efikasnosti ovog fungicida u gajilištima u SAD i Kanadi gde se on isključivo koristi sa pretpostavkom da odlaže razvoj infekcije i pojavu simptoma suve truleži.

Tabela 21. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na hlorotalonil.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	0,25 (0,19-0,30)	2,35 (1,58-4,23)	1,31 (1,16-1,46)	2,27	2,08
	T60	0,14 (0,05-0,23)	3,97 (0,320-1,803)	0,89 (0,69-1,09)	0,214	1,17
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	0,97 (0,81-1,22)	4,76 (3,26-8,19)	1,86 (1,68-2,04)	0,63	8,08
<i>Trichoderma virens</i>	T5	0,31 (0,26-0,36)	1,47 (1,14-2,05)	1,89 (1,73-2,05)	0,70	2,58
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	0,33 (0,27-0,41)	2,47 (1,50-5,78)	1,46 (1,26-1,66)	2,38	2,75
	T77	0,97 (0,80-1,26)	5,62 (3,50-12,13)	1,68 (1,47-1,89)	0,15	8,08
	T85	0,45 (0,31-0,90)	12,95 (3,68-316,20)	0,88 (0,68-1,08)	0,73	3,75
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	0,48 (0,38-0,61)	5,00 (2,84-14,08)	1,26 (1,06-1,46)	0,22	4,00
	T52	0,22 (0,13-0,33)	8,40 (3,64-45,37)	0,82 (0,67-0,97)	0,63	1,83
	T54	0,12 (0,08-0,15)	1,11 (0,73-2,33)	1,31 (1,10-1,52)	1,84	1,00
	T64	0,33 (0,29-0,38)	1,28 (1,04-1,69)	2,18 (2,01-2,35)	1,78	2,75
	T91	0,21 (0,17-0,25)	1,36 (0,93-2,50)	1,57 (1,37-1,77)	0,11	1,75
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	0,50 (0,40-0,70)	3,06 (1,79-7,37)	1,64 (1,22-1,88)	0,29	4,17
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	0,36 (0,26-0,75)	4,16 (1,46-91,38)	1,21 (0,90-1,52)	0,72	3,00
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	0,71 (0,56-0,92)	5,36 (3,20-13,09)	1,46 (1,25-1,67)	1,85	5,92
	T69	0,23 (0,19-0,28)	1,27 (0,90-2,15)	1,74 (1,53-1,95)	0,210	1,92
	T71	0,31 (0,25-0,38)	2,58 (1,76-4,52)	1,40 (1,25-1,55)	0,63	2,58
	T86	0,22 (0,17-0,27)	2,09 (1,43-3,70)	1,31 (1,16-1,47)	0,97	1,83
	T88	0,32 (0,24-0,43)	8,10 (3,83-8,19)	0,92 (0,78-1,06)	2,41	2,67
	T90	0,40 (0,34-0,47)	2,26 (1,66-3,46)	1,70 (1,54-1,86)	0,75	3,33

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

4.6.3. Benzimidazoli

Kasnih šezdesetih godina XX veka uvedeno je korišćenje fungicida iz grupe benzimidazola, benomil, karbendazim, tiofanat metil i tiabendazol, koji su u prvim godinama primene ispoljavali visoku efikasnost u zaštiti *A. bisporus* od bolesti (**Wuest i Cole**, 1970). Benzimidazoli su prvi sistemski fungicidi koji deluju protektivno i kurativno, tj. onemogućavaju ćelijske deobe inhibiranjem sinteze β -tubulina u mikrotubulama deobnog vretena (**Brent**, 1995). Međutim, nakon nekoliko godina intenzivne primene zabeležen je razvoj rezistentnosti u populacijama patogena (**Smith**, 1994).

4.6.3.1. Karbendazim

Testirani izolati su rasli dobro pri koncentraciji karbendazima od 0,17 mg/L (EC_{20}) dok je njihov rast bio veoma inhibiran pri koncentraciji od 0,81 mg/L (EC_{70}) i većoj, a EC_{50} vrednosti su se kretale u opsegu od 0,25 (*T. atroviride* T60) do 0,92 mg/L (*T. koningii* T39). Uočena je statistički značajna razlika na osnovu nepreklapanja intervala poverenja za tri grupe izolata. Prvoj je pripadala većina izolata sa intervalom poverenja 0,22 - 0,48 mg/L, drugoj tri izolata *T. aggressivum* f. *europaeum* T76 i T85 kao i *T. harzianum* T10 sa intervalom poverenja 0,51 - 0,78 mg/L, dok je trećoj pripadao samo izolat *T. koningii* T39 sa intervalom 0,79 - 1,06 mg/L (Tabela 22). Rezultati ukazuju da zbog povećanja opsega osetljivosti postoji rizik da izolati *Trichoderma* spp. uskoro postanu manje osetljivi na ovaj fungicid. Ovu zakonitost su **Gea i dr.** (2005) uočili i kod izolata *V. fungicola* kod kojih je takođe povećanje opsega osetljivosti na prothloraz-Mn prethodilo razvoju rezistentnosti na ovaj fungicid. **Potočnik i dr.** (2009a) su pokazali da je karbendazim toksičan i za *C. dendroides* iz Srbije (EC_{50} = 0,07 - 2,92 mg/L).

Tabela 22. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na karbendazim.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	0,35 (0,28-0,42)	2,08 (1,65-2,85)	1,66 (1,51-1,81)	1,56	1,40
	T60	0,25 (0,22-0,28)	0,56 (0,49-0,69)	3,61 (3,21-4,01)	0,13	1,00
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	0,92 (0,79-1,06)	3,49 (2,74-4,92)	2,22 (2,00-2,44)	1,06	3,68
<i>Trichoderma virens</i>	T5	0,34 (0,31-0,39)	0,75 (0,62-0,97)	3,82 (3,42-4,22)	2,47	1,36
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	0,61 (0,54-0,68)	1,55 (1,31-1,95)	3,13 (2,87-3,39)	1,43	2,44
	T77	0,31 (0,28-0,34)	0,58 (0,52-0,68)	4,73 (4,39-5,17)	0,47	1,24
	T85	0,60 (0,51-0,76)	2,20 (1,48-4,47)	2,27 (1,93-2,61)	0,78	2,40
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	0,70 (0,62-0,78)	2,06 (1,73-2,55)	2,73 (2,53-2,93)	1,39	2,80
	T52	0,35 (0,32-0,39)	0,78 (0,67-0,96)	3,73 (2,99-4,11)	0,06	1,40
	T54	0,30 (0,26-0,33)	0,70 (0,60-0,88)	3,45 (3,08-3,82)	1,33	1,20
	T64	0,33 (0,27-0,39)	1,35 (1,06-1,93)	2,10 (1,86-2,34)	1,50	1,32
	T91	0,37 (0,33-0,42)	1,02 (0,86-1,26)	2,92 (2,66-3,18)	2,24	1,48
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	0,28 (0,24-0,32)	0,86 (0,72-1,08)	2,61 (2,35-2,87)	0,12	1,12
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	0,41 (0,37-0,46)	1,02 (0,84-1,36)	3,26 (2,90-3,62)	3,46	1,64
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	0,30 (0,26-0,34)	0,72 (0,61-0,91)	3,36 (2,99-3,73)	0,34	1,20
	T69	0,32 (0,28-0,36)	0,80 (0,67-1,04)	3,19 (2,83-3,55)	1,02	1,28
	T71	0,27 (0,23-0,31)	0,75 (0,59-1,04)	2,85 (2,59-3,11)	1,41	1,08
	T86	0,31 (0,28-0,35)	0,74 (0,63-0,94)	3,39 (3,03-3,75)	0,04	1,24
	T88	0,44 (0,40-0,48)	0,83 (0,73-0,99)	4,68 (4,24-5,12)	0,34	1,76
	T90	0,40 (0,35-0,46)	1,25 (0,96-1,91)	2,58 (2,25-2,91)	2,56	1,60

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

U *in vitro* studijama je potvrđena toksičnost karbendazima za *T. harzianum* sa inhibicijom rasta od 90,8% (**Khan i Shahzad**, 2007; **Shah i dr.**, 2013). **Shah i dr.** (2013) su testirali efikasnost karbendazima u *Pleurotus sajor-caju* farmama gde je došlo do povećanja plodonošenja do 36,9% u poređenju sa kontrolom i smanjenja pojave bolesti izazvane *T. harzianum* za 9,3%. Ranije studije su pokazale da tretman supstrata za gajenje *A. bisporus*, nakon kompostiranja, karbendazimom ili njegovom kombinacijom sa fungicidom prothloraz-Mn smanjuje kolonizaciju komposta vrstama roda *Trichoderma* (**Abosriwil i Clancy**, 2002, 2003; **Grogan i dr.**, 1996; **Rinker i Alm**, 1998, 2008). Ipak, karbendazim ima ograničenja u aplikaciji zato što je podložan mikrobijalnoj degradaciji i samim tim smanjenju efikasnosti u suzbijanju patogena (**Fletcher i dr.**, 1980; **Yarden i dr.**, 1990).

4.6.3.2. Tiofanat-metil

Osetljivost *Trichoderma* spp. izolata na tiofanat-metil je bila slabija u poređenju sa drugim testiranim fungicidima. Proučavani izolati su dobro rasli pri njegovoj koncentraciji od 4,82 mg/L (EC₂₀), jako su inhibirani koncentracijom od 24,71 mg/L (EC₇₀), dok su se EC₅₀ vrednosti kretale u opsegu od 3,75 (*T. atroviride* T33) do 24,13 mg/L (*T. harzianum* T54). Svi izolati su bili umereno rezistentni na ovaj fungicid izuzev *T. artroviride* T33 kod koga je EC₅₀ vrednost bila niža od 5,0 mg/L. Analizom dobijenih rezultata nije zabeležena statistički značajna razlika između izolata jer su se intervali poverenja za EC₅₀ vrednosti potpuno preklapali (Tabela 23).

Tabela 23. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na tiofanat-metil.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	3,75 (2,49-4,88)	32,72 (22,22-64,10)	1,36 (1,15-1,57)	2,54	1,00
	T60	5,28 (3,40-7,02)	33,81 (26,50-48,46)	1,59 (1,38-1,80)	1,81	1,41
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	8,74 (7,13-10,48)	62,03 (44,77-98,60)	1,50 (1,35-1,65)	1,01	2,33
<i>Trichoderma virens</i>	T5	6,78 (6,02-7,69)	18,02 (14,50-24,93)	3,02 (2,68-3,36)	3,64	1,81
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	18,92 (16,71-21,11)	44,62 (38,01-56,04)	3,44 (3,07-3,81)	0,007	5,04
	T77	13,43 (12,05-15,11)	33,40 (27,74-42,89)	3,24 (2,96-3,52)	0,44	3,58
	T85	13,75 (11,31-16,36)	42,88 (35,17-54,89)	2,59 (2,36-2,82)	2,01	3,67
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	11,91 (9,84-16,00)	44,77 (28,47-102,65)	2,23 (1,88-2,58)	1,07	3,18
	T52	7,24 (6,23-8,45)	22,96 (18,00-32,30)	2,56 (2,30-2,82)	0,80	1,93
	T54	24,13 (15,67-69,94)	160,24 (59,42-2195,24)	1,56 (1,20-1,92)	0,08	6,43
	T64	6,86 (5,83-7,92)	27,91 (22,72-36,51)	2,10 (1,92-2,28)	1,30	1,83
	T91	9,29 (8,03-10,87)	27,66 (21,81-38,26)	2,70 (2,45-2,95)	3,46	2,48
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	5,67 (4,68-6,66)	25,46 (20,55-33,82)	1,96 (1,76-2,14)	1,69	1,51
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	19,02 (14,82-25,50)	127,76 (80,01-252,69)	1,55 (1,39-1,71)	0,04	5,07
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	20,00 (15,88-27,40)	120,27 (70,10-307,87)	1,64 (1,40-1,88)	0,0002	5,33
	T69	21,67 (17,77-25,07)	53,74 (45,19-69,81)	3,25 (2,81-3,69)	1,75	5,78
	T71	11,06 (9,85-12,39)	31,96 (27,03-39,44)	2,78 (2,58-2,98)	0,99	2,95
	T86	10,58 (9,43-11,84)	30,11 (25,54-37,02)	2,82 (2,61-3,03)	0,31	2,82
	T88	17,43 (15,63-19,43)	44,08 (37,44-54,54)	3,18 (2,92-3,44)	2,69	4,65
	T90	12,90 (10,46-16,68)	80,04 (49,89-171,25)	1,62 (1,42-1,82)	1,64	3,44

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

Romaine i dr., (2005) su utvrdili razvoj rezistentnosti *T. aggressivum* f. *aggressivum* na tiofanat-metil u Severnoj Americi. Rezistentnost na fungicide iz grupe benzimidazola bazirana je na supstituciji amino kiselina unutar molekula β -tubulina patogenih gljiva zahvaljujući specifičnoj tačkastoj mutaciji (**Koenraadt i dr.**, 1992). **Bonnen i Hopkins** (1997) su utvrdili pojavu ukrštene rezistentnosti na tiabendazol i benomil kod *V. fungicola*. S druge strane, postoje tvrdnje da se usled razlike u strukturi molekula tiabendazola i tiofanat-metila u odnosu na benomila i karbendazima oni razlikuju po sposobnosti vezivanja za tubulin (**Hassall**, 1990). Međutim, **Grogan i Gaze** (2000) smatraju da kada je patogen rezistentan na jednu vrstu fungicida iz grupe benzimidazola, usled ukrštene rezistentnosti, pitanje je vremena kada će se u populaciji patogena razviti rezistentnost i na druge vrste fungicida iz ove grupe. Testiranje osetljivosti izolata iz Srbije je pokazalo da iako su oni umereno rezistentni na tiofanat-metil, ukrštena rezistentnost na karbendazim nije utvrđena. Umerena rezistentni na ovaj fungicid sa EC₅₀ vrednostima između 6,53 i 12,09 mg/L zabeležena je i kod izolata *C. dendroides* iz Srbije (**Potočnik i dr.**, 2009a).

4.6.4. Dikarboksimidi: Iprodion

Dosadašnji rezultati pokazuju da dikarboksimidi imaju uglavnom fungistatično dejstvo (**Janjić**, 2005). Njihov primarni mehanizam delovanja nije poznat, inhibiraju klijanje konidija i porast micelije, a pri većim koncentracijama izazivaju dezintegraciju ćelija. Rezistentnost na ove fungicide zasnovana je na povećanoj produkciji antioksidanata ili protektivnih enzima (**Sisler**, 1994).

Većina *Trichoderma* izolata je bila sposobna da raste pri koncentraciji iprodiona od 0,48 mg/L (EC₂₀), dok je rast bio inhibiran pri 3,21 mg/L i većim (EC₇₀), a EC₅₀ vrednosti su bile od 0,84 (*Trichoderma* sp. Grupa 3 T90) do 6,72 mg/L (*Trichoderma* sp. Grupa 2 T63). Iako su testirani izolati bili osetljivi na iprodion izuzetak predstavljaju izolati *T. artroviride* T33 sa EC₅₀ od 6,08 mg/L i *Trichoderma* sp. Grupa 2 T63 sa EC₅₀ od 6,72 mg/L. Kao i kod tiofanat-metila nije zabeležena statistički značajna razlika između izolata jer su se intervali poverenja za EC₅₀ vrednosti potpuno preklapali (Tabela 24).

Tabela 24. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na iprodion.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	6,08 (3,21-22,63)	304,22 (57,71-12601,00)	0,75 (0,60-0,90)	0,53	7,24
	T60	1,29 (0,97-1,90)	31,55 (13,13-153,63)	0,92 (0,78-1,06)	0,002	1,54
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	2,98 (2,03-5,25)	32,01 (14,40-121,41)	1,24 (1,07-1,41)	0,02	3,55
<i>Trichoderma virens</i>	T5	2,03 (1,54-2,99)	25,62 (12,62-81,96)	1,16 (1,01-1,31)	1,99	2,42
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	1,76 (1,29-2,56)	22,74 (11,22-77,01)	1,15 (0,98-1,32)	1,60	2,10
	T77	0,96 (0,76-1,26)	14,52 (7,72-40,99)	1,09 (0,85-1,23)	1,03	1,14
	T85	3,04 (2,09-5,58)	59,44 (22,14-355,94)	0,99 (0,84-1,14)	0,82	3,62
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	1,57 (1,29-1,98)	9,72 (6,35-18,53)	1,62 (1,44-1,80)	0,63	1,87
	T52	2,10 (1,71-2,77)	12,38 (7,54-27,95)	1,66 (1,44-1,88)	1,08	2,50
	T54	1,36 (0,93-2,43)	100,56 (24,82-2308,00)	0,69 (0,45-0,83)	0,93	1,62
	T64	1,29 (1,01-1,78)	19,74 (9,90-62,20)	1,08 (0,94-1,22)	1,85	1,54
	T91	1,16 (0,58-4,75)	592,12 (42,87-1487000,00)	0,47 (0,34-0,61)	0,52	1,38
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	1,27 (1,02-1,65)	12,70 (7,44-28,95)	1,28 (1,13-1,43)	1,57	1,51
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	6,72 (3,62-20,92)	128,19 (34,97-1693,46)	1,00 (0,83-1,17)	0,33	8,00
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	3,08 (1,67-12,18)	534,45 (64,15-178680,00)	0,57 (0,43-0,71)	2,29	3,67
	T69	1,03 (0,81-1,34)	10,43 (6,24-22,80)	1,27 (1,23-1,41)	1,88	1,23
	T71	2,20 (1,96-2,54)	5,46 (4,32-7,81)	3,25 (2,87-3,63)	0,24	2,62
	T86	0,89 (0,71-1,12)	10,03 (5,96-22,51)	1,22 (1,08-1,36)	1,30	1,06
	T88	1,14 (0,83-1,70)	40,24 (14,69-281,66)	0,83 (0,69-0,97)	0,22	1,36
	T90	0,84 (0,75-1,08)	6,40 (4,37-11,09)	1,50 (1,35-1,65)	1,85	1,00

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

Iprodion je bio toksičan i za druge patogene gljive šampinjona iz Srbije kao što su *C. dendroides* ($EC_{50} = 0,18 - 1,82$ mg/L) i *M. pernicioso* ($EC_{50} < 4,08$ mg/L), dok je *V. fungicola* var. *fungicola* bio umereno rezistentan na ovaj fungicid ($EC_{50} = 11,93 - 22,80$ mg/L) (Potočnik i dr., 2008, 2009b, 2010a). Međutim, španski izolat *V. fungicola* var. *fungicola* je visokorezistentan na iprodion sa EC_{50} vrednostima većim od 50 mg/L (Gea i dr., 1996).

4.6.5. Strobilurini: Trifloksistrobin

Strobilurini su nova klasa fungicida razvijena u poslednjoj deceniji prošlog veka (Brent, 1995). U njihovoj osnovi je strobilurin A, prirodna antifungalna komponenta dobijen iz *Strobilurus tenacellus* koji raste na opalim šišarkama *Pinus sylvestris*. Ova grupa fungicida inhibira citohrom kompleks III u respiratornom lancu mitohondrija gljiva. Fungicidno dejstvo strobilurina je posledica smanjenja sinteze ATP-a, a njihova selektivnost i slaba toksičnost za sisare predstavlja prednost ove grupe fungicida u odnosu na fungicide drugih mehanizama delovanja (Gasztonyi i Lyr, 1995).

Osetljivost *Trichoderma* spp. izolata na trifloksistrobin je bila najslabija od svih testiranih fungicida, pa su stoga i dobijene vrednosti EC_{50} bile najveće. Testirani izolati su dobro rasli pri koncentraciji ovog fungicida od 14,14 mg/L (EC_{20}) a jaka inhibicija rasta je uočena tek pri koncentraciji od 188,01 mg/L (EC_{70}), dok su se vrednosti EC_{50} kretale u granicama od 10,25 do 178,23 mg/L. Čak 7 izolata je bilo rezistentno na trifloksistrobin, sa EC_{50} vrednostima iznad 50,0 mg/L. Preklapanje intervala poverenja za EC_{50} vrednosti pokazuje da nema statistički značajne razlike u osetljivosti na ovaj fungicid (Tabela 25).

Tabela 25. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na trifloksistrobin.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	97,41 (21,90-4348,42)	64999,40 (2049,62-787290000,00)	0,45 (0,34-0,56)	0,54	9,50
	T60	17,57 (7,65-55,96)	558720,00 (24469,79-408830000,00)	0,28 (0,23-0,33)	1,97	1,71
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	21,07 (11,91-43,37)	1816,73 (3492,07-282650,00)	0,44 (0,38-0,50)	0,64	2,06
<i>Trichoderma virens</i>	T5	34,18 (8,97-1144,64)	76885,97 (1830,77-4705700000,00)	0,38 (0,28-0,48)	0,008	3,33
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	10,62 (5,56-22,48)	33630,48 (4520,45-1177500,00)	0,37 (0,32-0,42)	1,03	1,04
	T77	10,25 (4,10-65,69)	31104,75 (1315,75-145620000,00)	0,37 (0,28-0,46)	0,31	1,00
	T85	84,55 (49,41-177,54)	10269,16 (2825,46-75095,10)	0,62 (0,55-0,69)	0,26	8,25
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	36,89 (16,86-113,50)	196050,00 (14931,40-31396000,00)	0,34 (0,28-0,40)	1,76	3,60
	T52	151,02 (25,07-34070,19)	305570,00 (4075,37-32365E+7)	0,39 (0,29-0,49)	1,03	14,73
	T54	39,78 (20,56-100,92)	55546,40 (7658,61-1668700,00)	0,41 (0,35-0,47)	2,04	3,88
	T64	21,62 (5,15-465,45)	45379000,00 (117600,00-34331E+12)	0,20 (0,14-0,26)	0,32	2,11
	T91	34,28 (10,56-660,28)	110220,00 (2876,72-3373900000,00)	0,36 (0,27-0,45)	0,25	3,34
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	178,23 (67,59-938,73)	643310,00 (39865,51-126800000,00)	0,36 (0,30-0,42)	0,28	17,39
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	52,87 (19,50-413,60)	11434,23 (1040,30-2296500,00)	0,55 (0,44-0,66)	0,54	5,74
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	33,67 (8,93-1061,95)	71571,27 (1774,66-3537500000,00)	0,38 (0,28-0,48)	1,38	3,28
	T69	21,47 (9,36-68,14)	214970,00 (14401,92-41149000,00)	0,32 (0,27-0,37)	2,03	2,09
	T71	65,80 (29,14-238,27)	282010,00 (21504,34-34729000,00)	0,35 (0,26-0,41)	0,17	6,42
	T86	25,74 (9,31-203,87)	8196,32 (664,33-2452200,00)	0,51 (0,41-0,61)	0,57	2,51
	T88	22,69 (5,91-1091,50)	144060,00 (2110,94-22324E+7)	0,34 (0,25-0,43)	3,67	2,21
	T90	51,67 (18,37-298,37)	351590,00 (16465,21-192400000,00)	0,33 (0,27-0,39)	0,72	5,04

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

Trifloksistrobin nije pokazao zadovoljavajuću toksičnost ni za *Cladobotryum* izolate iz Srbije, EC₅₀ vrednosti su bile u opsegu od 517,91 do 6897,87 mg/L (**Potočnik i dr.**, 2009b). Međutim, **Chrysai-Tokousbalides i dr.** (2006, 2007) navode da je ovaj fungicid imao zadovoljavajuću *in vitro* fungitoksičnost za izolate *V. fungicola* poreklom iz Grčke sa EC₅₀ od 0,12 mg/L, čak veću od prochloraz-Mn fungicida. Suprotno izolatima *Cladobotryum* spp. iz Srbije, fungicid je bio visokotoksičan za izolate *V. fungicola* var. *fungicola* i *M. perniciosa* iz gajilišta u Srbiji sa EC₅₀ vrednostima od 0,41 do 0,75 mg/L, odnosno 0,14 do 1,22 mg/L (**Potočnik**, 2009). Međutim, iako je ovaj fungicid uspešan u suzbijanju mokre i suve trluži ne može se preporučiti za primenu u gajilištima jer je ispoljio nezadovoljavajuću toksičnost za uzročnike paučinaste i zelene plesni.

4.7. Antifungalna aktivnost testiranih biofungicida na izolate *Trichoderma* spp. *in vitro*

4.7.1. Biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

Testirani *Trichoderma* spp. izolati u *in vitro* uslovima su pokazali različitu osetljivost na biofungicid na bazi ulja čajnog drveta čije su EC₅₀ vrednosti bile u opsegu između 11,90 mg/L (*T. harzianum* T91) i 370,76 mg/L (*T. atroviride* T60) (Tabeli 26). Svi testirani izolati su rasli dobro na koncentraciji od 0,10 mg/L, kada je utvrđena inhibicija rasta kolonija ispod 10%, dok je pri koncentraciji od 1000,00 mg/L inhibicija bila veća od 80% u poređenju sa kontrolom. Prema kriterijumu **Gea i dr.** (1996) i **Grogan i dr.** (2000) testirani *Trichoderma* spp. izolati su bili rezistentni na ovaj biofungicid jer su vrednosti EC₅₀ za 76,2% izolata bile veće od 50,00 mg/L. Preklapanje intervala poverenja za EC₅₀ vrednosti pokazuje da nema statistički značajne razlike u osetljivosti izolata *Trichoderma* spp. različitog porekla na ulje čajnog drveta (Tabela 26). Ulje čajnog drveta nije bilo toksično ni za ranije testirane izolate *C. dendroides* iz Srbije, pošto su se EC₅₀ vrednosti nalazile u opsegu od 112,92 do 335,75 mg/L (**Potočnik i dr.**, 2010b).

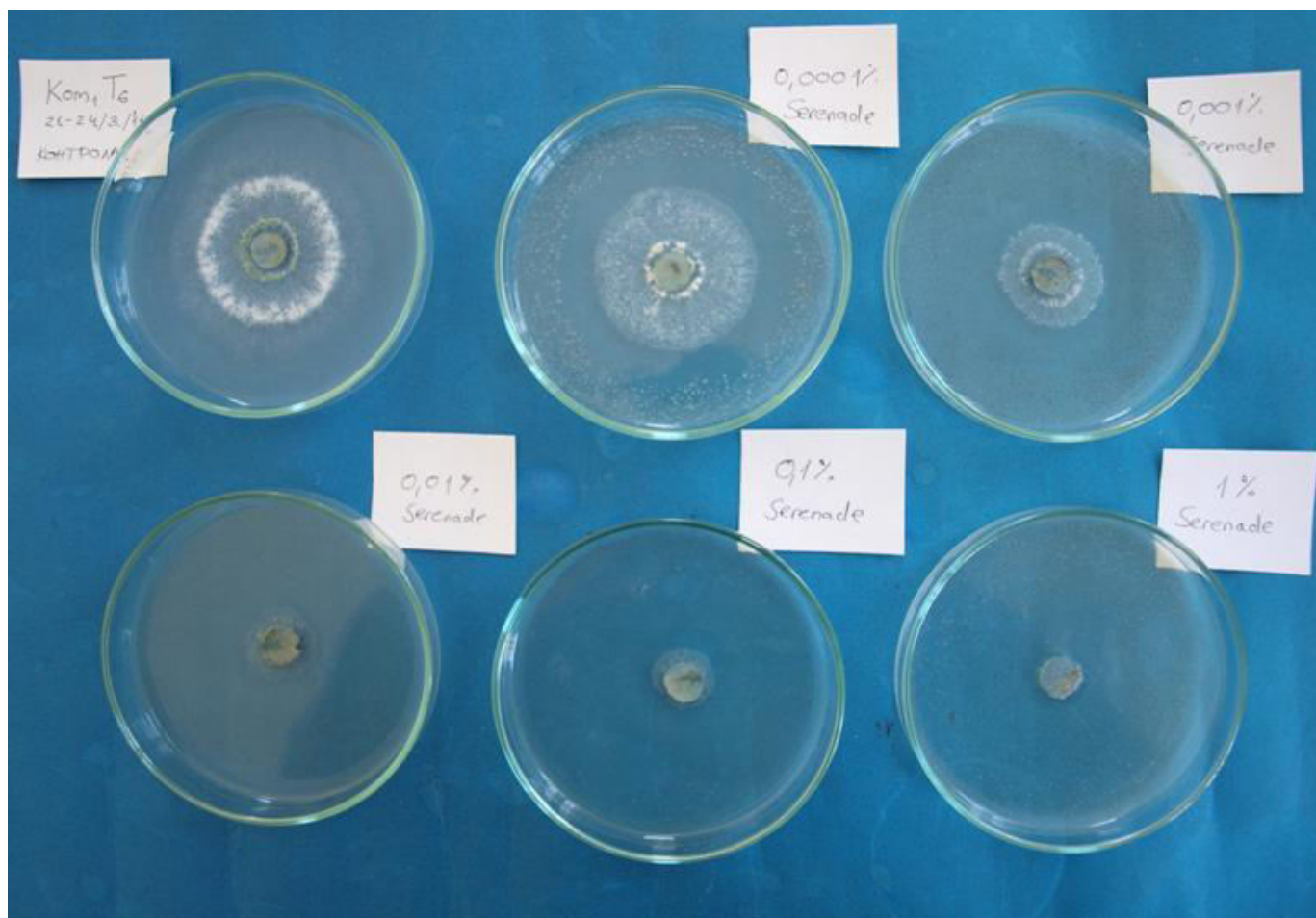
Tabela 26. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na biofungicid na bazi ulja čajnog drveta.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	117,18 (54,55-340,33)	10419,35 (2385,85-110210,00)	0,66 (0,58-0,74)	0,04	9,85
	T60	370,76 (253,23-585,26)	6611,29 (3156,30-20186,87)	1,02 (0,90-1,14)	0,84	31,16
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	37,98 (17,72-79,70)	13161,07 (4010,76-72903,54)	0,50 (0,45-0,55)	2,97	3,19
<i>Trichoderma virens</i>	T5	112,26 (67,71-201,74)	13208,16 (4836,40-52619,96)	0,62 (0,56-0,68)	2,53	9,43
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	46,39 (22,22-95,22)	12733,53 (4043,20-66257,04)	0,53 (0,47-0,59)	0,35	3,90
	T77	262,26 (130,01-682,57)	138480,00 (23781,49-2651000,00)	0,47 (0,41-0,53)	2,36	22,04
	T85	126,24 (76,92-222,36)	12061,88 (4295,22-54776,28)	0,65 (0,58-0,72)	1,14	10,61
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	104,44 (75,95-143,79)	1129,99 (701,29-2167,30)	1,24 (1,12-1,36)	1,73	8,78
	T52	151,42 (111,94-206,65)	1395,34 (880,54-2611,18)	1,33 (1,21-1,45)	0,18	12,72
	T54	43,36 (22,47-79,64)	12733,53 (4043,20-66257,04)	0,53 (0,47-0,59)	0,35	3,90
	T64	62,95 (44,45-90,18)	1191,22 (688,80-2445,20)	1,00 (0,92-1,08)	2,91	5,29
	T91	11,90 (6,01-22,08)	955,81 (445,60-2531,14)	0,67 (0,61-0,73)	2,45	1,00
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	262,26 (130,02-682,57)	68261,77 (7223,66-3602300)	0,61 (0,56-0,66)	0,11	22,04
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	83,99 (52,54-132,11)	3527,30 (1551,59-12828,24)	0,79 (0,69-0,89)	0,93	7,06
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	254,39 (138,75-520,71)	32247,13 (9266,72-232270,00)	0,61 (0,52-0,69)	0,02	21,38
	T69	120,94 (62,19-238,46)	18549,98 (6024,99-99913,05)	0,59 (0,52-0,66)	3,23	10,16
	T71	60,45 (26,58-141,17)	45508,71 (10327,93-434810,00)	0,45 (0,40-0,50)	1,36	5,08
	T86	180,61 (123,12-274,45)	3969,70 (1953,07-11392,74)	0,96 (0,85-1,11)	2,87	15,18
	T88	63,81 (31,84-170,60)	12593,91 (2602,58-161800,00)	0,56 (0,49-0,63)	2,70	5,36
	T90	38,64 (21,83-70,83)	6209,75 (2330,46-23180,88)	0,58 (0,53-0,63)	2,15	3,25

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

4.7.2. Biofungicid na bazi *Bacillus subtilis*

Biofungicid na bazi *B. subtilis* je pokazao visoku toksičnost za sve testirane *Trichoderma* spp. isolate jer su EC_{50} vrednosti bile u opsegu od 0,007 mg/L (*T. atroviride* T33) do 1,292 mg/L (*Trichoderma* sp. T88), a kod 67% izolata su bile manje od 0,10 mg/L (Tabela 27). Rast micelije testiranih izolata je inhibiran više od 80% pri koncentraciji biofungicida većoj od 10,00 mg/L što ukazuje na to da *B. subtilis* u *in vitro* uslovima ima zadovoljavajuću toksičnost za *Trichoderma* isolate (Slika 11). Sličan preparat na bazi *Bacillus pumilus* je ranije testiran i nije pokazao toksičnost za isolate *C. dendroides* iz Srbije jer su EC_{50} vrednosti bile između 183,68 mg/L i 8593,65 mg/L (Potočnik i dr., 2010b).



Slika 11. Uticaj različitih koncentracija biofungicida na bazi *Bacillus subtilis* na *Trichoderma* sp. Grupa 1 T1 u *in vitro* uslovima na PDA podlozi nakon 72h.

Tabela 27. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata na biofungicid na bazi *Bacillus subtilis*.

Vrsta/Grupa	Izolati	EC ₅₀ (mg/L) CI 95%	EC ₉₀ (mg/L) CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>Trichoderma atroviride</i>	T33	0,007 (0,0002-0,04)	17,72 (5,58-111,69)	0,38 (0,31-0,55)	0,04	1,00
	T60	0,03 (0,002-0,13)	289,22 (58,09-7978,53)	0,32 (0,26-0,38)	0,79	4,19
<i>Trichoderma koningii</i>	T39	0,10 (0,02-0,25)	122,72 (49,58-441,15)	0,41 (0,36-0,46)	0,06	13,24
<i>Trichoderma virens</i>	T5	0,04 (0,007-0,11)	43,16 (17,74-154,91)	0,42 (0,36-0,48)	0,80	5,14
<i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	0,09 (0,03-0,19)	9,76 (4,23-42,27)	0,64 (0,54-0,74)	0,84	12,70
	T77	0,53 (0,23-1,02)	251,10 (112,97-730,38)	0,48 (0,44-0,52)	1,48	71,62
	T85	0,10 (0,02-0,23)	53,90 (20,038-267,00)	0,47 (0,40-0,54)	1,19	12,70
<i>Trichoderma harzianum</i>	T10	0,17 (0,04-0,45)	471,06 (105,53-7446,27)	0,37 (0,31-0,43)	0,99	22,97
	T52	0,66 (0,20-1,62)	4822,98 (1035,66-57674,04)	0,33 (0,29-0,37)	1,01	89,19
	T54	0,10 (0,03-0,25)	65,39 (27,93-217,32)	0,46 (0,41-0,51)	2,03	13,51
	T64	0,19 (0,05-0,45)	204,83 (59,97-1662,54)	0,42 (0,36-0,48)	0,20	25,94
	T91	0,06 (0,007-0,22)	1048,70 (239,93-12732,35)	0,30 (0,26-0,34)	0,10	7,97
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 1	T1	0,03 (0,002-0,13)	512,08 (113,50-7518,08)	0,30 (0,25-0,35)	1,34	3,92
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 2	T63	0,02 (0,002-0,09)	257,27 (70,17-2274,61)	0,31 (0,26-0,36)	0,51	2,70
<i>Trichoderma</i> sp. Grupa 3	T37	0,02 (0,002-0,10)	109,05 (28,28-1480,09)	0,35 (0,29-0,41)	0,17	3,24
	T69	0,02 (0,003-0,08)	40,35 (15,94-156,28)	0,40 (0,34-0,46)	1,00	3,11
	T71	0,01 (0,0002-0,07)	310,36 (53,14-17512,22)	0,29 (0,23-0,35)	0,21	1,62
	T86	0,02 (0,001-0,06)	35,01 (13,11-153,97)	0,38 (0,32-0,44)	1,58	2,03
	T88	1,29 (0,62-2,40)	701,62 (266,59-2717,01)	0,47 (0,42-0,52)	0,25	174,59
	T90	0,06 (0,01-0,17)	80,67 (31,56-317,30)	0,41 (0,36-0,46)	0,17	8,11

CI = interval poverenja; b = koficijent regresije; H = heterogenost; RF = faktor rezistentnosti.

Koliko je značajan ovaj biofungicid govore činjenice da dugogodišnja primena sintetičkih fungicida izaziva razvoj rezistentnosti patogena i da ostaci fungicida u prirodi predstavljaju potencijalni rizik po ljudsko zdravlje i ne ciljane organizme. Zbog toga su opravdani pokušaji pronalaženja prirodnih preparata sa antifungalnim dejstvom. Kategoriji biofungicida pripadaju svi preparati na bazi biljnih ekstrakata, ulja i komponenti, kao i mikroorganizmi sa kompetitivnim ili antagonističkim uticajem na štetne organizme ili izazivači otpornosti gajenih biljaka i gljiva.

4.8. Selektivna fungitoksičnost testiranih fungicida i biofungicida za *Trichoderma* spp. i *Agaricus bisporus*

Selektivna fungitoksičnost fungicida se prikazuje kroz indeks selektivnosti fungicida koji se izračunava kao odnos vrednosti EC_{50} za patogenu gljivu i odgovarajuće vrednosti za domaćina. Ukoliko je manja vrednost indeksa selektivnosti za neki fungicid utoliko je veća njegova selektivnost odnosno sposobnost da inhibira rast patogene gljive, a u isto vreme ne ispoljava toksične efekte na rast i razvoj micelije *A. bisporus*. **Chrysai-Tokousbalides i dr.** (2007) navode da fungicidi sa indeksima selektivnosti manjim od 0,1 ispoljavaju zadovoljavajuću selektivnu toksičnost za patogenu gljivu i gljivu domaćina.

Toksičnost fungicida, izražena preko EC_{50} vrednosti, za *A. bisporus* F56 je saopštena u radovima **Potočnik i dr.** (2009a, b). Karbendazim i prohloraz-Mn su ispoljili najbolju selektivnost (0,02 – karbendazim i 0,05 – prohloraz-Mn), iprodion i hlorotalonil manju (0,16) a tiofanat-metil najslabiju (1,24) (Tabela 28). Toksičnost trifloksistrobina prema *A. bisporus* nije testirana zato što su *Trichoderma* spp. izolati bili uglavnom rezistentni na ovaj fungicid. Prema **Chrysai-Tokousbalides i dr.** (2007) može se zaključiti da su karbendazim i prohloraz-Mn pokazali zadovoljavajuću selektivnu toksičnost za *Trichoderma* spp. izolate i *A. bisporus* jer su vrednosti njihovih indeksa selektivnosti bile manje od 0,1. Karbendazim i prohloraz Mn su takođe imali zadovoljavajuću selektivnu toksičnost i za izolate *C. dendroides* iz Srbije sa vrednostima od 0,01 i 0,06 (**Potočnik i dr.**, 2009a). **Chrysai-Tokousbalides i dr.** (2007) su utvrdili da prohloraz-Mn ispoljava najveću selektivnu toksičnost i za *V. fungicola* sa indeksom

selektivnosti od 0,0004. Međutim, iprodion i hlorotalonil nisu imali zadovoljavajuću selektivnu toksičnost za *C. dendroides* i *A. bisporus* F56 (**Potočnik i dr.**, 2009b).

Najmanje vrednosti indeksa selektivnosti pa tako i najbolju selektivnost su pokazali prohloraz-Mn, karbendazim i hlorotalonil sa vrednostima od 0,16 za prohloraz-Mn, 0,41 za karbendazim i 0,39 za hlorotalonil. Selektivna toksičnost iprodiona i tiofanat-metila nije bila zadovoljavajuća jer su dobijene vrednosti bile 2,14 i 12,42 mg/L.

Tabela 28. Selektivna fungitoksičnost testiranih fungicida za *Trichoderma* spp. i *Agaricus bisporus*.

Fungicidi	EC ₅₀ (mg/l)		
	<i>Trichoderma</i> spp. ¹	<i>Agaricus bisporus</i> ⁵	Indeks selektivnosti ²
Iprodion	2,14	13,63	0,16 ^{b3}
Hlorotalonil	0,39	2,39	0,16 ^b
Trifloksistrobin	50,32	n.t. ⁴	-
Karbendazim	0,41	16,58	0,02 ^c
Tiofanat-metil	12,42	10,04	1,24 ^a
Prohloraz-Mn	0,16	2,97	0,05 ^c

¹ Srednja vrednost efektivne koncentracije za 20 izolata *Trichoderma* spp.

² Indeks selektivnosti za svaku aktivnu materiju je izračunat kao odnos srednje EC₅₀ za *Trichoderma* spp. i odgovarajuće procenjene vrednosti za *A. bisporus*;

³ Vrednosti indeksa selektivnosti odeležene istim slovom ne razlikuju se značajno; $P = 0,05$, na osnovu Duncan testa.

⁴ n.t.: nije-testiran.

⁵ Potočnik i dr. (2009b).

Osetljivost *A. bisporus* F56 na fungicide je još ranije razmatrana od strane **Challen i Elliot** (1985) i **Bonnen i Hopkins** (1997). Komercijalni sojevi šampinjona koji se koriste za kutivaciju širom Evrope od 1990-ih do danas pokazuju veći stepen tolerancije na fungicide *in vitro* u odnosu na ranije korišćene sojeve. Brojni rezultati su pokazali da hlorotalonil pri koncentracije od 0,5 do 2,0 mg/L izaziva inhibiciju micelijskog rasta *A. bisporus in vitro* (**Gandy**, 1981; **Gandy i Spencer**, 1981; **Fletcher i dr.**, 1983; **Challen i Elliot**, 1985), dok su **Chaloux i dr.** (1993) zabeležili da je ovaj fungicid pri koncentraciji manjoj od 2,0 mg/L imao toksični efekat na sojeve B62, B98 i U3.

Za sada je prohloraz-Mn još uvek najtoksičniji fungicid za sve značajne patogene *A. bisporus* (**Fletcher i dr.**, 1983; **Potočnik i dr.**, 2009a).

4.9. Efikasnost fungicida prochloraz-Mn, biofungicida na bazi ulja čajnog drveta i *Bacillus subtilis* u suzbijanju *Trichoderma harzianum* u uslovima *in vivo*

Ispitivanje efikasnosti preparata je proučeno na bazi procene intenziteta pojave simptoma bolesti, tj. smeđih mrlja na plodonosnim telima *A. bisporus*. Intenzitet pojave simptoma bolesti je određen izračunavanjem procenta zaraženih plodonosnih tela *A. bisporus* u odnosu na ukupan broj ubranih. Efikasnost fungicida je određena na osnovu intenziteta bolesti u inokulisanoj kontroli i tretmanima. Efekat preparata je analiziran i kroz uticaj na prinos *A. bisporus*, tj. biološku efikasnost (BE) koja se izražava u procentima. Ona predstavlja odnos sveže težine svih ubranih plodonosnih tela i suve težine kompostiranog supstrata u vreme zasejavanja micelijom (Chrysai-Tokousbalides i dr., 2007).

Uticaj biofungicida na prinos izražen sa BE i njihova efikasnost u suzbijanju simptoma bolesti su bili razmatrani u individualnoj primeni u standardnoj dozi ili u kombinaciji sa kontrolnim fungicidom u odnosu 20:80%. Biofungicidi su testirani i na nižim koncentracijama (20% od standardne doze) da bi se utvrdila priroda međusobnog dejstva fungicida i biofungicida u kombinovanom tretmanu.

U eksperimentalnom gajilištu su uočeni simptomi zelene plesni na plodonosnim telima *A. bisporus*, 16 dana nakon veštačke inokulacije sa *T. harzianum* T91 kao smeđe mrlje i nekrotične lezije (Slika 12). Bele kolonije, veličine 10 mm, pojavile su se 29. dana na površini pokrivke za gajenje šampinjona (Slika 13). Kolonije su za kratko vreme kolonizovale pokrivku i nakon nekoliko dana promenile boju od bledo zelene do intenzivno zelene zbog intenzivne sporulacije patogena. Test u oglednom gajilištu šampinjona je pokazao da simptomi, mrlje i nekroze na plodonosnim telima i bele ili zelene kolonije na pokrivci, odgovaraju simptomima koje izazivaju vrste roda *Trichoderma* po opisu Seaby (1996a).



Slika 12. Simptom zelene plesni, smeđe mrlje na plodonosnom telu *Agaricus bisporus* nakon veštačke inokulacije sa *Trichoderma harzianum* T91.

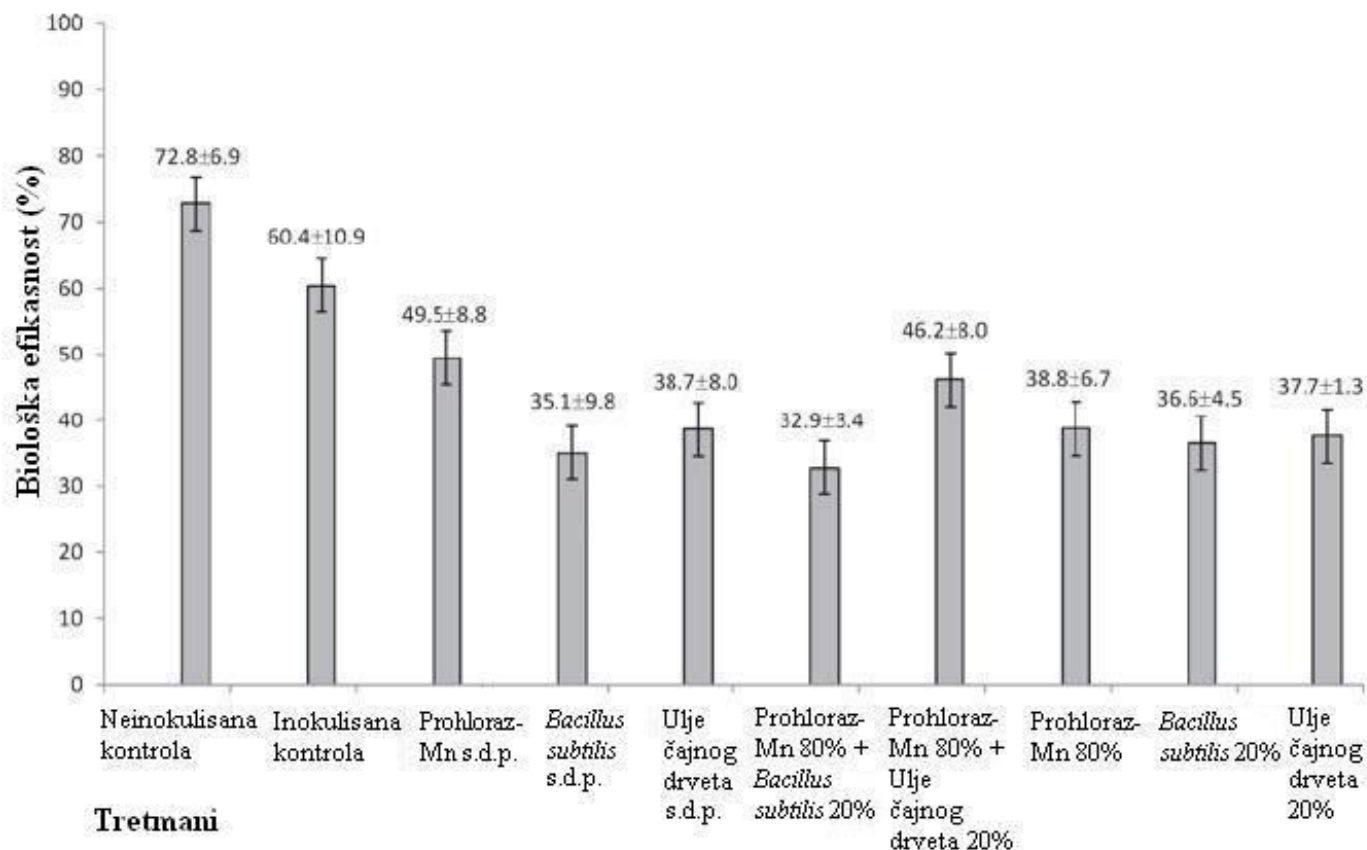


Slika 13. Pojava kolonija *Trichoderma harzianum* T91 na pokrivci nakon veštačke inokulacije.

Tokom trećeg talasa plodonošenja, masovna pojava zaraženih bazidiokarapa *A. bisporus* je uočena u kontrolnim tretmanima i ti rezultati nisu uzeti u razmatranje zbog intenzivne unakrsne infekcije između inokulisanih i neinokulisanih površina. Prema tome, prinos *A. bisporus* (procenjen kroz BE) i efikasnost preparata u suzbijanju simptoma bolesti su izračunati sumiranjem mase ubranih plodonosnih tela i broja obolelih samo tokom prvog i drugog talasa plodonošenja (Slika 14).

Tretmani su obuhvatali polovine površina briketa zasejanog supstrata, a na istom briketu su uvek bila dva različita tretmana. Briketi su poređani u potpuno slučajnom blok sistemu. Obe polovine svakog briketa su imale sličan prinos ali je uočena razlika u prinosu između samih briketa. Stoga, podela briketa na dva polja nije uticala na postavku oglada i rezultate.

Najbolji prinos je uočen u neinokulisanjoj (72,8%) i inokulisanjoj kontroli (60,4%) (Slika 14). Kod tretmana fungicidima, najveći prinos je uočen pri primeni prochloraz-Mn u standardnoj dozi (49,5%) i u njegovoj kombinaciji sa uljem čajnog drveta (46,2%). Kod preostalih tretmana, biofungicidi u standardnim dozama, svi preparati u nižim dozama i kombinacija prochloraz-Mn sa biofungicidom *B. subtilis*, nije bilo statistički značajne razlike između njihovih BE vrednosti koje su se kretale od 38,8 % za tretman prochloraz-Mn u dozi primene 80% od standardne, do 32,9% za tretman smešom prochloraz-Mn fungicida i preparata na bazi *B. subtilis* (Slika 14).



Slika 14. Biološka efikasnost testiranih fungicida nakon inokulacije *Agaricus bisporus* sa *Trichoderma harzianum* T91 (razlika standardne greške - SED = 22,8; stepen slobode - df = 20; F = 3,4; P = 0,1; s.d.p. - standardna doza primene fungicida).

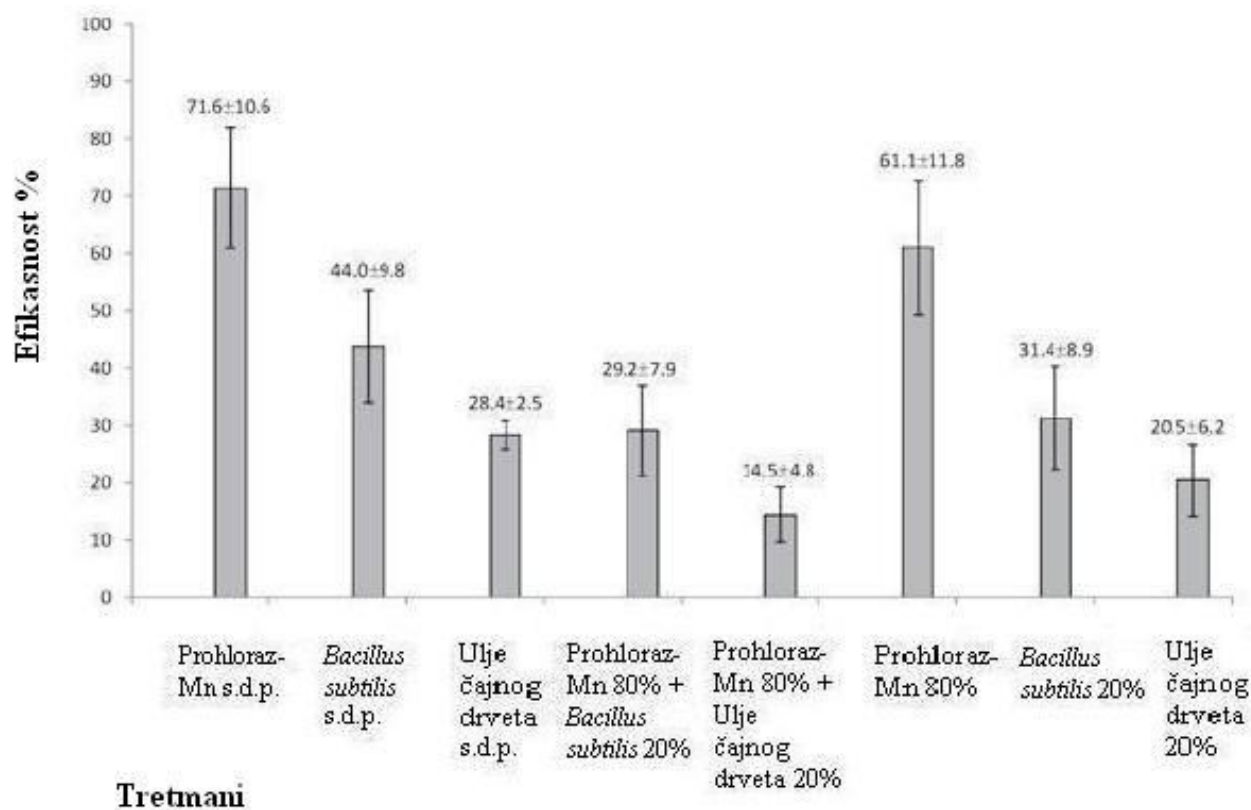
Efikasnost u suzbijanju pojave simptoma bolesti je izračunata na osnovu broja obolelih plodonosnih tela *A. bisporus* u prvom i drugom talasu plodonošenja.

$$\text{Efikasnost fungicida (\%)} = \frac{(I_c - I_t)}{I_c} \times 100$$

I_c - pojava simptoma bolesti kod inokulisane kontrole; I_t – pojava simptoma bolesti pri tretmanu.

Najveća efikasnost je postignuta primenom fungicida prohloraz-Mn u standardnoj (71,6 %) i u dozi 80% od standardne (61,1 %) (Slika 15). Manja efikasnost je zabeležena u svim tretmanima preparatom na bazi *B. subtilis* (29,2–44,0 %) i ulja čajnog drveta u standardnoj dozi (28,4 %) a najmanja tretmanima uljem čajnog drveta u dozi 20% od standardne (20,5 %) i smešom prohloraz-Mn i ulja čajnog drveta (14,5 %). Efikasnost oba

testirana biofungicida u oglednom gajilištu je bila značajno niža u poređenju sa komercijalnim fungicidom prohloraz-Mn.



Slika 15. Efikasnost fungicida u suzbijanju *Trichoderma harzianum* T91 nakon inokulacije *Agaricus bisporus* (razlika standardne greške - SED = 24,8; stepen slobode - $df = 16$; $F = 2,3$; $P = 0,1$; s.d.p. - standardna doza primene fungicida).

Analizirana je priroda interakcija biofungicida sa kontrolnim fungicidom prohloraz-Mn i prikazana kroz određivanje vrednosti sinergističkog faktora (SF). Ustanovljena je antagonistička reakcija ($SF < 1$) između oba testirana biofungicida i prohloraz-Mn, i u slučaju efikasnosti u suzbijanju pojave simptoma bolesti i u slučaju prinosa (Tabela 29). Veći antagonistički efekat na efikasnost je utvrđen zajedničkom primenom ulja čajnog drveta i prohloraz-Mn fungicida ($SF = 0,2$) u poređenju sa kombinacijom preparata na bazi *B. subtilis* i kontrolnog fungicida ($SF = 0,4$). Nasuprot tome, antagonistički efekat na prinos kombinacije prohloraz-Mn i biofungicida na bazi *B. subtilis* ($SF = 0,5$) je bio viši u odnosu

na primenu biofungicida na bazi uljem čajnog drveta (SF = 0,8). Kada se porede vrednosti SF za prinos i efikasnost, značajno veći antagonizam je uočen za efikasnost mešavine fungicida i ulja čajnog drveta a značajno manji antagonizam je zabeležen za BE iste mešavine u odnosu na kombinaciju fungicida sa biofungicidom na bazi *B. subtilis*. Razlika u vrednostima SF između prinosa (BE) i efikasnosti za kombinovanu primenu fungicida sa preparatom na bazi *B. subtilis* nije zabeležena.

Tabela 29. Interakcija izabranih biofungicida i fungicida, uticaj na prinos *Agaricus bisporus* i efikasnost u suzbijanju *Trichoderma harzianum* T91 u oglednom gajilištu šampinjona

Tretman	Biološka efikasnost (%)			Efikasnost u inhibiciji simptoma bolesti (%)		
	Uočena	^a Očekivana	Sinergistički faktor	Uočena	^a Očekivana	Sinergistički faktor
	BE	BE		efikasnost	efikasnost	
Prohloraz-Mn 80% + ulje čajnog drveta 20%	46,2 ± 8,0	61,8	0,8	14,5 ± 4,8	69,5	0,2
Prohloraz-Mn 80% + <i>Bacillus subtilis</i> 20%	32,9 ± 3,4	61,2	0,5	29,2 ± 7,9	73,7	0,4
ANOVA za BE i Efektivnost						
F			2,3			0,5
P			0,2			0,5
^c SED			8,7			9,3
df			4			4

^aOčekivane vrednosti: $Ee = (X+Y) - (XY)/100$, Ee – efekat aditivnog odgovora dva inhibitorna agenta, X i Y – procenat efekta izazvanog biofungicidima na bazi ulja čajnog drveta ili *Bacillus subtilis* i kontrolnog fungicida; Sinergistički faktor (SF) predstavlja odnos između uočene i očekivane inhibicije.

^bSrednja vrednost tri ponavljanja ± SE, standardna greška.

^cSED, standardna greška razlika; df, stepeni slobode.

ANOVA za BE i Efikasnost: F = 2,3; P = 0,2; SED=12,7; df=8.

Izuzev neinokulisane i inokulisane kontrole, najveći prinos *A. bisporus* je zapažen pri tretmanu sa prohloraz-Mn kada je primenjen sam i u kombinaciji sa uljem čajnog

drveta. Najniža produkcija šampinjona je uočena pri tretmanu preparatom na bazi *B. subtilis* u standardnoj dozi i njegovom kombinovanom primenom sa prohloraz-Mn.

Najveća efikasnost u suzbijanju *T. harzianum* je postignuta korišćenjem fungicida prohloraz-Mn u svim koncentracijama. Preparat na bazi *B. subtilis* primenjen u svim dozama je ispoljio veću efikasnost u zaštiti od pojave simptoma bolesti od njegove primene u kombinaciji sa fungicidom prohloraz-Mn i od ulja čajnog drveta primenjenog u svim dozama. Najniža efikasnost je zabeležena tokom primene ulja čajnog drveta u kombinaciji sa fungicidom prohloraz-Mn. Preparat na bazi *B. subtilis* pokazao se boljim u prevenciji simptoma od ulja čajnog drveta. Takođe, *B. subtilis* preparat u kombinaciji sa fungicidom ima veću efikasnost od mešavine ulja čajnog drveta sa fungicidom.

Antagonistička interakcija je zapažena i kod efekta biofungicida i fungicida na prinos šampinjona i u suzbijanju bolesti. Interakcija između ulja čajnog drveta i prohloraz-Mn je ispoljila jači antagonistički efekat na efikasnost u zaštiti od pojave simptoma bolesti nego između preparata na bazi *B. subtilis* i fungicida. Ipak, jači antagonizam je uočen između fungicida i *B. subtilis* preparata kada se posmatra prinos šampinjona nego kod interakcije fungicida i ulja čajnog drveta.

Angelini i dr. (2008) su uočili da ulje čajnog drveta kada se primenjuje na supstrat za uzgoj *Pleurotus* sp. rezultira u jakoj do potpunoj inhibiciji *T. harzianum*. Biofungicid Timorex EC 66 koji sadrži 66% ulja čajnog drveta kao aktivnu supstancu, kada se primeni u standardnoj dozi, izaziva značajnu redukciju simptoma paučinaste plesni kod *A. bisporus* u eksperimentalnom gajilištu (**Potočnik i dr.**, 2010b). **Védie i Rousseau** (2008) su ispitivali efikasnost Serenade® preparata protiv *T. aggressivum* u francuskim farmama šampinjona. Iako su pomenuti biofungicidi pokazali pozitivne rezultate u farmama šampinjona, detaljnije studije efikasnosti i BE, nakon njihove individualne primene kao i u kombinaciji sa komercijalnim fungicidom prohloraz-Mn su nedostajale. Stoga, ova studija je začetak ispitivanja primene biofungicida sa ciljem smanjenja upotrebe komercijalnih što doprinosi potencijalnom razvoju novih ekoloških metoda za suzbijanje uzročnika bolesti *A. bisporus*.

5. ZAKLJUČCI

- Dvadeset izolata je izolovano sa obolelih plodonosnih tela i supstrata za gajenje *A. bisporus* sakupljenih iz 13 gajilišta u Srbiji i jednog u Bosni i Hercegovini od 2006 - 2010. godine. Dvanaest izolata je identifikovano kao *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* i *Trichoderma harzianum*, a osam nije određeno do nivoa vrste i klasifikovano je kao *Trichoderma* sp. Grupa 1, *Trichoderma* sp. Grupa 2 i *Trichoderma* sp. Grupa 3. Standardnim mikološkim metodama i analizom ITS1/ITS4 sekvence pokazano je da su neidentifikovane vrste filogenetski bliske sa vrstom *T. harzianum*.
- Micelija svih izolata je bila dobro razvijena na PDA, MA i CMD podlogama, a dijametar kolonija je bio u opsegu od 29,4 mm na CMD do 82,0 mm na PDA podlozi.
- Optimalna temperatura za rast micelije *Trichoderma* spp. izolata na svim testiranim podlogama (PDA, MA i CMD) je bila 25°C ili 30°C.
- Većina izolata je najbolje rasla na podlozi sa pH = 5, zatim na pH = 6, nekoliko izolata na pH = 7, dok je najslabiji rast zabeležen na pH = 8 - 9.
- Generalno, svetlost je imala inhibitorni efekat na rast izolata.
- Najveću virulentnost na šesirima plodonosnih tela *A. bisporus* je pokazala vrsta *T. harzianum*, a najnižu *T. virens* i *T. aggressivum* f. *europaeum*.
- Nakon veštačke inokulacije pokrivke suspenzijom spora sa *T. harzianum* prvi simptomi na šesirima plodonosnih tela *A. bisporus*, u vidu smeđih mrlja dužine 3 - 4 mm, su se razvili 16. dana u oglednom gajilištu. Na površini pokrivke 29. dana nakon inokulacije pojavile su se male bele kolonije (prečnika 10 mm) koje su se narednih nekoliko dana širile, postajale blede zelene i na kraju smaragdno zelene zbog intenzivne sporulacije patogena.

➤ Testirani izolati su bili osetljivi na prohloraz-Mn, hlorotalonil i karbendazim ($EC_{50} < 1$ mg/L), kao i na iprodion ($EC_{50} = 0,84 - 6,72$ mg/L), umereno rezistentni na tiofanat-metil ($EC_{50} = 3,75 - 24,13$ mg/L) i potpuno rezistentni na trifloksistrobin ($EC_{50} = 10,25 - 178,23$ mg/L).

➤ Najbolju selektivnu toksičnost za patogena i domaćina su pokazali fungicidi prohloraz-Mn i karbendazim sa vrednostima nižim od 0,1. Prohloraz-Mn je fungicid koji se može preporučiti za primenu u gajilištima za suzbijanje zelene plesni pošto se karbendazim povlači sa tržišta.

➤ Biofungicid na bazi *Bacillus subtilis* je bio visoko toksičan za sve testirane izolate ($EC_{50} < 1,3$ mg/L) dok ulje čajnog drveta nije pokazalo značajnu antifungalnu aktivnost ($EC_{50} = 11,9 - 370,8$ mg/L).

Prohloraz-Mn se u oglednom gajilištu pokazao efikasnijim od oba biofungicida kao i od njegove kombinovane primene s biofungicidima. Biofungicid na bazi *B. subtilis* je bio efikasniji od ulja čajnog drveta u pogledu sprečavanja pojave simptoma bolesti. Zapažena je antagonistička interakcija kod oba biofungicida kada se primenjuju u kombinaciji sa prohloraz-Mn fungicidom.

➤ Potrebno je nastaviti istraživanja sa ciljem pronalaženja efikasnih biofungicida koji će smanjiti primenu hemijskih sredstava.

Literatura

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-268.

Abosriwil, S.O., Clancy, K.J. (2002). A protocol for evaluation of the role of disinfectants in limiting pathogens and weed moulds in commercial mushroom production. *Pest Management Science*, 58: 282-289.

Abosriwil, S.O., Clancy, K.J. (2003). A mini-bag technique for evaluation of fungicide effects on *Trichoderma* spp. in mushroom compost. *Pest Management Science*, 60: 350-358.

Adachi, T., Aoki, H., Osawa, H., Namiki, M., Yamane, T., Ashida, T. (1983). Structure of trichodermaol, antibacterial substance produced in combined culture of *Trichoderma* sp. with *Fusarium oxysporum*, or *Fusarium solani*. *Chemistry Letters*, 1: 923-926.

Adie, B.A.T., Grogan, H. (2000). The liberation of cobweb (*Cladobotryum mycophilum*) conidia within a mushroom crop. In: Van Griensven L.J.L.D. (Ed.), *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Balkema, Rotterdam, Netherland, pp. 595-600.

Allan, J., Shah, F.A., Khan, I. (2008). Establishing a Baseline for Fungicide Sensitivity of Three Major Mushroom Pathogens in Australia. In: M. Van Greuning (Ed.), *Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science* (pp. 565-569). Cape Town, South Africa: ISMS.

Almassi, F., Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Sivasithamparam, K. (1991). New antibiotics from strains of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 54: 396-402.

Angelini, P., Pagiotti, R., Granetti, B. (2008). Effect of antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* oil on antagonistic potential of *Pleurotus* species against *Trichoderma harzianum* in dual culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 197-202.

Anonymous (2006). Crop Specific Protocol – Mushrooms (Crop ID: 22), Assured Produce, Food Standards, Control Document No: 00035/06, 1-38.

Augustiniak, H., Forche, E., Reichenbach, H., Wray, V., Grafe, U., Hofle, G. (1991). Isolierung und Strukturaufklärung von Ergokonin A und B; zwei neue antifungische Sterol-Antibiotika aus *Trichoderma konigii*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 361-366.

Bamburg, J.R., Strong, F.M. (1969). Mycotoxins of the trichotecene family produced by *Fusarium tricinctum* and *Trichoderma lignorum*. *Phytochemistry*, 8: 2405-2410.

Beyer, D.M., Kremser, I.J. (2004). Evaluation of fungicide tolerance and control for three fungal diseases of mushrooms; In *Science and cultivation of edible and medicinal fungi, Mushroom Science XVI*, Romaine, C.P., Keil, C.B., Rinker, D.L., Royse, D.J., Eds., Penn State University: Philadelphia, PA, USA, pp. 521-529.

Bhatt, N., Singh, R.P. (2002). Casing soil bacteria as biocontrol agents against the mycoparasitic fungi of *Agaricus bisporus*, *Proceedings of the 4th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 1-9.

Bisby, G.R. (1939). *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Transactions of the British Mycological Society*, 23: 149-168.

Bissett, J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924-931.

Bissett, J. (1991a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 60: 2357-2372.

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

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

Bissett, J. (1992). *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 639-641.

Bissett, J., Szakacs, G., Nolan, C.A., Drizhinina, I.S., Kulling-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P. (2003). Seven new taxa of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*, 69: 570-586.

Bonnen, A.M., Hopkins, C. (1997): Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 101(1): 89-96.

Booth, C. (1971). Fungal Culture Media. In: Norris J.R. and Ribbons D.W. (Eds). *Methods in Microbiology*, Academic Press: London, UK, pp. 49-94.

Brefeld, O. (1891). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. *Ascomyceten II*, 10: 157-378 + Tabs. IV-XIII. Heinrich Schöningh: Münster, Germany.

Brent, K.J. (1995). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? In: Monograph No. 1. Fungicide Resistance Action Committee, Global Crop Protection Federation, Brussels, Belgium.

Brimner, T.A., Boland, G.J. (2003). A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 100: 3-16.

Buchet, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J., Viikari, J. (1994). *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 941-945.

Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Review*, 19: 50-62.

Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., Bissett, J. (1998). Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 133-137.

Chaloux, N., Savoie, J.M., Olivier, J.M. (1993). Growth inhibition of *Agaricus bisporus* and associated thermophilic species by fungicides used in wheat cultivation. *Agronomie*, 13: 407-412.

Challen, M.P., Elliott, T.J. (1985). The *in vitro* responses to a range of fungicides of two strains of the mushroom *Agaricus bisporus* and the pathogen *Verticillium fungicola*. *Mycopathologia*, 90: 161-164.

Chang, S.-T., Buswell, J.A., Miles, P.G. (1996). Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers, New York, NY, USA.

Chang, S.T. (1999). Global impact on edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st Century: Non-green revolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 1-7.

Chang, S.-T., Miles, P.G. (2004). Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, FO, USA, pp. 451.

Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J., Geiser, D. (2003a). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27: 302-313.

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

- Chaverri, P., Candoussau, F., Samuels, G.J.** (2004). *Hypocrea phyllostachydis* and its *Trichoderma* anamorph, a new bambusicolous species from France. *Mycological Progress*, 3: 29-36.
- Chen, A.W, Moy, M.** (2004). Mushroom cultivation: building mold contamination. *The International Society for Mushroom Science*, 16(1): 625-632.
- Chrysai-Tokousbalides, M., Kastanias, M.A., Philippoussis, A., Diamantopoulou, P.** (2007). Selective fungitoxicity of famaxadone, tebuconazole and trifloxystrobin between *Verticillium fungicola* i *Agaricus bisporus*. *Crop Protection*, 26: 469-475.
- Clift, A.D., Shamshad, A.** (2009). Modeling mites, molds and mushroom yields in the Australian Mushroom Industry. In *Proceedings of the 18th World IMACS/MODSIM09 Congress*, pp. 491-497. Eds R.S. Anderssen, R.D. Braddock and L.T.H. Newham. Cairns, Australia: IMACS/MODSIM.
- Collins, R.P., Halim, A.F.** (1972). Characterisation of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 437-438.
- Collopy, P.D., Largeteau-Mamoun, M.L., Romaine, C.P., Royse, D.J.** (2001). Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Phytopathology*, 91: 905-912.
- Conant, N.F., Smith, D.T., Baker, R.D., Callaway, J.L.** (1971). Manual of clinical mycology, 3rd ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.
- Day, J.P., Shattock, R.C.** (1997). Aggressiveness and other factors relating to displacements of population of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 379-391.
- Delp, C.J., Dekker, J.** (1985). Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPPO Bulletin. European and Mediterranean Plant Protection Organization, OEPP*, 15: 333-335.
- Dennis, C., Webster, J.** (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41-48.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B.** (1995). Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc., Boca Raton, FO, USA, pp. 359.

- Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B., Claydon, N.** (1989). Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1: 1885-1887.
- Dodd, S.L., Crowhurst, R.N., Rodrigo, A.G., Samuels, G.J., Hill, R.A., Steward, A.** (2000). Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 23-34.
- Dodd, S.L., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J.** (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, 95(1): 27-40.
- Doyle, O.** (1991). *Trichoderma* green mould update. *Irish Mushroom Review*, 3: 13-17.
- Dragt, J.W., Geels, F.P., Rutjens, A.J., Van Grienssen, L.J.L.D.** (1995). Resistance in wild types of *Agaricus bisporus* to the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mushroom Science*, 14: 679-683.
- Druzhinina, I., Kubicek, C.P.** (2005). Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(2): 100-112.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C.P.** (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 813-828.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, C.P.** (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47: 55-64.
- Duke, J.A.** (1992). Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities. CRC Press, Boca Raton.
- Finney, D.J.** (1971). Probit Analysis – A statistical treatment of the sigmoid response curve. University Press, 3rd edition, Cambridge, UK, pp. 1-383.
- Fletcher, J.T., Yarham, D.J.** (1976). The incidence of benomyl tolerance in *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosa* and *Hypomyces rosellus* in mushroom crops. *Annual Applied Biology*, 84: 343-353.
- Fletcher, J.T., Connolly, G., Mountfield, E.X., Jacobs, L.** (1980). The disappearance of benomyl from mushroom casing. *Annals of Applied Biology*, 95: 73-82.
- Fletcher, J.T., Hims, M.J., Hall, R.J.** (1983). The control of bubble disease and cobweb disease of mushroom with prochloraz. *Plant Pathology*, 32: 123-131.

Fujita, T., Takaishi, Y., Okamura, A., Fujita, E., Fuji, K., Hratsuoka, N., Komatsu, M., Arita, I. (1981). New peptide antibiotics, trichopolyns I and II, from *Trichoderma polysporum*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 585-587.

Gams, W., Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., and Harman, G.E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London, UK, pp. 3-34.

Gams, W., Meyer, W. (1998). What exactly is *Trichoderma harzianum* Rifai? *Mycologia*, 90: 904-915.

Gandy, D.G. (1981). Sensitivity of mushroom strains to fungicides. *Mushroom Science*, 11: 473-483.

Gandy, D.G., Spencer, D.M. (1981). Fungicide evaluation for control of dry bubble, caused by *Verticillium fungicola* on commercial mushroom strains. *Scientia Horticulturae*, 14: 107-115.

Garrod, E. (2004). Pesticides – The latest position. *Mushroom Journal*, 649: 20-23.

Gea, F.J., Tello J.C., Honrubia M. (1996). *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia*, 136: 133-137.

Gea, F.J., Tello, J.C., Navarro, M.J. (2003). Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *Journal of Phytopathology*, 151: 98-100.

Gea, F.J., Navarro, M.J., Tello, J.C. (2005). Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycological Research*, 109: 741-745.

Gea, F.J., Tello, J., Navarro, M. (2010). Efficacy and effect on yield of different fungicides for control of wet bubble disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone perniciosa*. *Crop Protection*, 29: 1021-1025.

Geels, F.P. (1996). Resistance to Sporgon tested among recently isolated strains of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *De Champignoncultuur*, 40(10): 401-406.

Geels, F.P. (1997). Rondetafel – bijeenkomst over *Trichoderma*. *Champignoncultuur*, 41: 13.

Ghisalberti, E.L., Rowland, C.Y. (1993). Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 56: 1799-1804.

- Gilman, J.C., Abbott, E.V.** (1927). A summary of soil fungi. *Iowa State Collage Journal of Science*, 1: 225-345.
- Godtfredsen, W.O., Vangedal, S.** (1965). Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. *Acta Chemica Scandinavica*, 19: 1088-1102.
- Gouot, J.M.** (1994). Characteristics and Population Dynamics of *Botrytis cinerea* and Other Pathogens Resistant to Dicarboximides. In: Delp, C.J. (Ed.), Fungicide Resistance in North America. The American Phytopathological Society, St. Paul, MO, USA, pp. 53-55.
- Grogan, H.M., Noble, R., Gaze, R.H.** (1996). Control of *Trichoderma harzianum* – a weed mould of mushroom cultivation. Brighton Crop Protection Conference – Pests & Diseases, pp. 337-343.
- Grogan, H.M., Gaze, R.H.** (2000). Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104(3): 357-364.
- Grogan, H.M., Keeling, C., Jukes, A.A.** (2000). *In vitro* response of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* (dry bubble) to prochloraz-manganese. Proceedings from the Crop Protection Conference, In: Pests and Diseases, Brighton, UK, pp. 273-278.
- Grogan, H.M.** (2006). Fungicide control of mushroom cobweb disease caused by *Cladobotryum* strains with different benzimidazole resistance profiles. *Pest Management Science*, 62(2): 153-161.
- Grogan, H.M.** (2008). Challenges facing mushroom disease control in the 21st century; In Proceeding of the Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products; Lelley, J.I., Buswell, J.A., Eds.; WSMBMP: Bonn, Germany, pp. 120-127.
- Grove, J.F., Moffatt, J.S., Vischer, E.B.** (1965). Viridin. Part I. Isolation and characterization. *Journal of the Chemical Society*, 3803-3811.
- Guthrie, J.L., Castle, A.J.** (2006). Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 961-967.
- Györfi, J., Geösel, A.** (2008). Biological control against *Trichoderma* species in *Agaricus* cultivation. *Proceedings of the 6th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. pp. 158-164.
- Harris, G.H., Jones, E.T.T., Meinz, M.S., Nallin-Omstead, M., Helms, G.L., Bills, G.F., Zink, D., Wilson, K.E.** (1993). Isolation and structure elucidation of viridifungin A, B, and C. *Tetrahedron Letters*, 34: 5235-5238.

Hassall, K.A. (1990). The Biochemistry and Uses of Pesticides. 2nd ed., Weinheim, W.C.H. (Ed.), New York, NY, USA.

Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Nagy, A., Nagy, E., Vagvolgyi, C., Kredics, L. (2007). Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*, 97: 532-537.

Hatvani, L., Sabolić, P., Koscubé, S., Kredics, L., Vágvölogyi, C., Kaliterna, J., Ivić, D., Đermić, E., Kosalec, I. (2012). The first report on mushroom green mold in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63: 481-487.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Monte, E. (1999). Isolation of *Trichoderma harzianum* Th2 from commercial mushroom compost in Spain. *Plant Disease*, 83: 591.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Mingues, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1890-1898.

Herrick, J.A. (1945). Effects of Gliotoxin on Trichophyton Gypseum. *Ohio Journal of Science*, 45(2): 45-46.

Howell, C.R., Stipanovic, R.D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 321-324.

Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 248–253.

Janjić, V. (2005). Fitofarmacija. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Institut za istraživanja u poljoprivredi »Srbija«, Poljoprivredni fakultet u Beogradu, Beograd, Republika Srbija, pp. 5-850.

Joly, P. (1979). La Culture des Champignons, Dargaud Editeur, Neuilly-sur-Seine, Paris, France, pp. 96.

Keszler, A., Forgacs, E., Kotai, L., Vizcaino, J.A., Monte, E., Garcia-Acha, I. (2000). Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 38: 421-424.

Khan, M.O., Shahzad, S. (2007). Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. *Pakistan Journal of Botany*, 39(3): 945-951.

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

Koenraadt, H., Sommerville, S.C., Jones, A.L. (1992). Characterization of mutations in the β -tubulin gene of benomyl resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 82: 1348-1354.

Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2005). *TrichoBLAST*: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea* powered by sequence diagnosis and similarity search tool. *Mycological Research*, 109: 658-660.

Kredics, L., García Jimenez, L., Naeimi, S., Czifra, D., Urbán, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Hatvani, L. (2010). A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 295-305. Ed A. Méndez-Vilas. Badajoz, Spain: Formatex.

Krupke, O., Castle, A., Rinker, D. (2003). The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 107: 1467-1475.

Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R.L., Kubicek-Pranz, E.M. (1993). The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 90-99.

Kubicek, C.P., Penttilä, M.E. (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P., eds. *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Md.: London: Taylor and Francis, 1998: 49-71.

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

Kubicek, C.P. (2013). Systems biological approach towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 163: 133-142.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Börner, T., Mayer, W., Kubicek, C.P. (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs

based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 89: 442–460.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Börner, T., Guého, E. (1999). Molecular re-identification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. *Medical Mycology*, 37: 25–33.

Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multiple approach. *Mycological Research*, 106(7): 757-767.

Leroux, P., Gredt, M. (1972). Etude de l'action in – vitro des fongicides, methode de l'incorporation ou milieu. Laboratoire de Phytopharmacie – INRA, French Institute for agronomy research, Versailles, France, pp. 1-10.

Lieckfeldt, E., Kuhls, K., Muthumeenakshi, S. (1998). Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In *Trichoderma and Gliocladium*. Edited by Kubicek, C.P. and Harman, G.E. London; Bristol, PA: Taylor & Francis, pp. 35-74.

Lieckfeldt, E., Seifert, K.A. (2000). An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. *Studies in Mycology*, 45: 35-44.

Lumbsden, R.D., Lewis, J.A., Fravel, D.R. (1993). Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In Hall, F.R. and Barry, J.W. (eds). *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. American Chemical Society, Washington, pp. 166-188.

Mamoun, M.L., Iapicco, R., Savoie, J.M., Olivier, J.M. (2000). Green mould disease in France: *Trichoderma harzianum* Th2 and other species causing damages on mushroom farms. *Mushroom Science*, 15: 625-632.

Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Soloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M., Brettin, T.S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn, *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26: 553-560.

Metcalf, D.D., Wilson, C.R. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*, 50: 249-257.

Miller, J.H., Giddens, J.E., Foster, A.A. (1975). A survey of the fungi of forest and cultivated soils of Georgia. *Mycologia*, 49: 779-808.

Molin, J. (1995). Specialty Mushrooms: yesterday, today, and tomorrow. *Mushroom News*, 43(2): 10-13.

Monte E. (2001). Editorial Paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. *International Microbiology*, 4: 1-4.

Montenecourt, B.S. (1983). *Trichoderma reesei* cellulases. Trends in Biotechnology, Vol. 1, No. 5, Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 56-160.

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mukherjee, M., Schmoll, M. (2013). *Trichoderma: Biology and Application*. CAB International, UK, pp. 1-315.

Mumpuni, A., Sharma, H.S.S., Brown, A.E. (1998). Effect of metabolites produced by *Trichoderma harzianum* biotypes and *Agaricus bisporus* on their respective growth radii in culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 5053-5056.

Muntañola-Cvetković, M. (1987). *Opšta mikologija*. Književne novine, Beogradu.

Muthumeenakshi, S., Mills, P.R., Brown, A.E., Seaby, D.A. (1994). Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonising mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, 140: 769-777.

Muthumeenakshi, S., Brown, A.E., Mills, P.R. (1998). Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and British Isles. *Mycological Research*, 102(4): 385-390.

Nagy, A., Manczinger, L., Tombácz, D., Hatvani, L., Györfi, J., Antal, Z., Sajben, E., Vágvolgyi, C., Kredics, L. (2012). Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, IOBC-WPRS Bulletin*, 78: 289-293.

Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J., Chen, X., Romaine, C.P. (1999). Molecular phylogenetic analyses of biological controls strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushrooms green mold. *Phytopatology*, 89: 308-313.

Overton, B.E., Stewart, E.L., Geiser, D.M., Jaklitsch, W.M. (2006). Systematics of *Hypocrea citrina* and related taxa. *Studies in Mycology*, 56: 1-38.

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

Persoon, C.H. (1794). *Disposita methodica fungorum*. *Römer's Neues Magazine of Botany*, 1: 81-128.

Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Tanović, B., Todorović, B. (2008). Fungicide sensitivity of selected *Verticillium fungicola* isolates from *Agaricus bisporus* farms. *Archives of Biological Science*, 60(1): 151-157.

Potočnik, I. (2009). Doktorska disertacija: *Cladobotryum dendroides* (Bull.) W. Gams & Hooz., uzročnik paučinaste plesni šampinjona [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] i njegova osetljivost na fungicide i biofungicide. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Milijašević, S., Todorović, B., Stepanović, M. (2009a). *In vitro* toxicity of selected fungicides from the group of benzimidazoles and demethylation inhibitors to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44: 365-370.

Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Milijašević, S., Stepanović, M., Todorović, B. (2009b). Toxicity of fungicides with different modes of action to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44: 823-827.

Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Tanović, B., Rekanović, E. (2010a). Sensitivity of *Mycogone perniciosus*, Pathogen of Culinary-Medicinal Button Mushroom *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach (Agaricomycetidae), to Selected Fungicides and Essential Oils. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(1): 91-98.

Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Stepanović, M., Milijašević, S., Todorović, B. (2010b). Toxicity of biofungicide Timorex 66 EC to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection*, 29: 290-294.

Reuveni, M., Pipko, G., Neifeld, D., Finkelstein, E. Malka, B., Hornik, Y. (2006). New organic formulations of essential tea tree oil for the control of plant diseases. *Vegetable Crops News*, 42: 77-85.

Richer, D.L. (1987). Synergism – a patent view. *Pesticide Science*, 19: 309-315.

Rifai, M.A., Webster, J. (1966a). Culture studies of *Hypocrea* and *Trichoderma* II. *H. aureo-viridis* and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. *Transactions of the British Mycological Society*, 49: 296.

Rifai, M.A., Webster, J. (1966b). Culture studies of *Hypocrea* and *Trichoderma* III. *H. lactea* (= *H. citrina*) and *H. pulvinata*. *Transactions of the British Mycological Society*, 49: 297-310.

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

Rinker, D.L. (1993). Disease management strategies for *Trichoderma* mould. *Mushroom World*, 4: 3-5.

Rinker, D.L., Alm, G. (1998). Efficacy and limitations of mushroom grain spawn treated with benomyl against green mould disease of the cultivated mushroom. *Mushroom News: Science and Technology*, 11: 6-11.

Rinker, D.L., Alm, G. (2000). Management of green mould disease in Canada. *Mushroom Science*, 15(2): 617-623.

Rinker, D.L., Alm, G. (2008). Management of casing *Trichoderma* using fungicides. In: M. Van Greuning (Ed.), Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science (pp. 496-509). Cape Town, South Africa: ISMS.

Robertson, J.L., Smith, K.L., Savin, N.E., Lavigne, R.J. (1984). Effects of Dose Selection and Sample Size on the Precision of Lethal Dose Estimates in Dose-Mortality Regression. *Journal of Economic Entomology*, 77: 833-837.

Romaine, C.P., Royse, D.J., Wuest, P.J., Beyer, D.M. (1996). Mushroom green mold: Cause, edaphic factors and control. *Mushroom News*, 44: 20-23.

Romaine, C.P., Royse, D.J., Schlagnhauser, C. (2005). Superpathogenic *Trichoderma* resistant to Topsin M found in Pennsylvania and Delaware. *Mushroom News*, 53: 6-9.

Romaine, C.P., Royse, D.J., Schlagnhauser, C. (2008). Emergence of benzimidazole-resistant green mould *Trichoderma aggressivum*, on cultivated *Agaricus bisporus* in North America. In: M. Van Greuning (Ed.), Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science (pp. 510-523). Cape Town, South Africa: ISMS.

Romero-Arenas, O., Lara, M.H., Huato, M.A.D., Hernandez, F.D., Victoria, D.A.A. (2009). The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11: 143-151.

Royse, D.J., Boomer, K., Du, Y., Handcock, M. (1999). Spatial distribution of green mold foci in 30 commercial mushroom crops. *Plant Disease*, 52: 246-250.

Samuels, G.J. (1996). Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8): 923-935.

Samuels, G.J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeld, E., Kubicek, C.P. (1998). The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies in Mycology*, 41: 1-54.

Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A., Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170.

Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.S., Petrini, O., Schroers, H.J., Druzhina, I.S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56: 67-133.

Savoie, J.M., Iapicco, R., Largeteau-Mamoun, M. (2001). Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycological Research*, 105: 1348–1356.

Sawa, R., Mori, Y., Inuma, H., Naganawa, H., Hamada, M., Yoshida, S., Furutani, H., Kajimura, Y., Fuwa, T., Takeuchi, T. (1994). Harzianic acid, a new antimicrobial antibiotic from a fungus. *Journal of Antibiotics*, 47: 731-732.

Scheinpflug, H. (1994). History of DMI fungicides and monitoring for resistance. In: Delp, C.J. (Ed.), *Fungicide Resistance in North America*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MO, USA, pp. 45-51.

Seaby, D.A. (1987). Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species. *Mushroom Journal*, 179: 147-151.

Seaby, D.A. (1989). Further observations on *Trichoderma*. *Mushroom Journal*, 197: 147-151.

Seaby, D.A. (1996a). Investigation of the epidemiology of green mold of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harzianum*. *Plant Pathology*, 45: 913-923.

Seaby, D.A. (1996b). Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*, 45: 905-912.

Shah, S., Nasreen, S., Kousar, S. (2013). Efficacy of Fungicides against *Trichoderma* spp. Causing green Mold Disease of Oyster Mushroom (*Pleurotus sajor-caju*). *Research Journal of Microbiology*, 8: 13-24.

Sharma, S.R., Kumar, S. (2005). Diseases of Mushrooms and Their Management. Pp. In: Sharma, R.C. and Sharma, J.N. (Eds.), Challenging Problems in Horticultural and Forest Pathology. Indus Publishing Co., New Delhi, India, pp. 246.

Sinden, J.W. (1971). Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 411-432.

Sinden, J., Hauser, E. (1953). Nature and control of three mildew diseases of mushrooms in America. *Mushroom Science*, 2: 177-180.

Sisler, H.D. (1994). Dicarboximide Fungicides: Mechanisms of Action and Resistance. In: Delp, C.J (Ed.), Fungicide Resistance in North America. The American Phytopathological Society, St. Paul, MO, USA, pp. 52.

Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. (1998). Secondary Metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Geneitics. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 139-191.

Smith, C.M. (1994). History of benzimidazole use and resistance. In: Delp, C.J. (Ed.), Fungicide Resistance in North America. The American Phytopathological Society, St. Paul, MO, USA, pp. 23-24.

Smith, M.B., March, J. (2007). *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure* (6th ed.). New York: Wiley-Interscience. ISBN 0-471-72091-7.

Sobieralski, K., Siwulski, M., Komon-Żelazowska, M., Błaszczuk, L., Górski, R., Spizewski, T., Sas-Golak, I. (2012). Evaluation of the growth of *Trichoderma pleurotum* and *Trichoderma pleuroticola* isolates and their biotic interaction with *Pleurotus* sp. *Journal of Plant Protection Research*, 52: 235-239.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995). Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. 3 edn. New York, NY, USA: W.H. Freeman and Company.

Soković, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 211-224.

Soković, M., Vukojević, J., Marin, P., Brkić, D., Vajs, V., Griensven, L.J.L.D. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14: 238-249.

Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K. (2000). The Staden package 1998. *Methods in Molecular Biology*, 132: 115-130.

Stanković, J., Ralević, N. (2002). Statistika sa primenom u poljoprivredi, Mladost biro, Beograd.

Staunton, L., Dunne, R., Cormican, T., Donovan, M. (1999). Chemical and Biological Control of Mushroom, Pests and Diseases. Horticulture and Farm Forestry, Series No, 14, Kinsealy Research Centre, Dublin, Ireland.

Staunton, L., Dunne, R. (2001). Integrated Disease and Pest Control in Irish Mushroom Tunnels. Horticulture and Farm Forestry, Series No. 24, TEAGASC, Kinsealy Research Centre, Dublin, Republic of Ireland.

Szczech, M., Staniaszek, M., Habdas, H., Ulinski, Z., Szymanski, J. (2008). *Trichoderma* spp. – the cause of green mould on Polish mushroom farms. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69: 105-114.

Tamura, A., Kotani, H., Naruto, S. (1975). Trichoviridin and dermadin from *Trichoderma* sp. TK-1. *Journal of Antibiotics*, 28: 161-162.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

Tanović, B., Potočnik, I., Stanisavljević, B., Đorđević, M., Rekanović, E. (2006). Response of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa* and *Cladobotryum* sp. mushroom pathogens to some essential oils. *Pesticides and Phytomedicine*, 21: 231-237.

Tanović, B., Potočnik, I., Delibašić, G., Ristić, M., Kostić, M., Marković, M. (2009). *In vitro* effect of essential oils from aromatic and medicinal plants on mushroom pathogens: *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa*, and *Cladobotryum* sp. *Archives of biological sciences*, 61(2): 231-238.

Todorović, B., Miličević-Marčić, S., Potočnik, I., Stepanović, M., Rekanović, E., Nikolić-Bujanović, Lj., Čekerevac, M. (2012). *In vitro* activity of antimicrobial agents against *Pseudomonas tolaasii*, pathogen of cultivated button mushroom. *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants, & Agricultural Wastes*, 47 (3): 175-179.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

Tulasne, L.R., Tulasne, C. (1865). *Selecta fungorum carpologia*. Jussu, Vol. 3, Paris.

Van Zaayen, A., Rutjens, A.A. (1978). The application of Daconil for the control of bubble. *Champignoncultuur*, 22: 121-123.

Van Zaayen, A., Van Adrichem, J.C.J. (1982). Prochloraz for control of fungal pathogens of cultivated mushrooms. *Netherland Journal of Plant Pathology*, 88(5): 203-213.

Védie, R., Rousseau, T. (2008). Serenade biofungicide: une innovation majeure dans les champignonnières françaises pour lutter contre *Trichoderma aggressivum*, agent de la moisissure verte du compost. *La Lettre du CTC*, 21: 1-2.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322. Eds M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. San Diego, CA, USA: Academic Press.

Williams, J., Clarkson, J.M., Mills, P.R., Cooper, R.M. (2003). Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4192-4199.

Woo, S.L., Di Benedetto, P., Senatore, M., Abadi, K., Gigante, S., Soriente, I., Ferraioli, S., Scala, F., Lorito, M. (2004). Identification and characterization of *Trichoderma* species aggressive to *Pleurotus* in Italy. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 30: 469-470.

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

Wuest, P., Cole, H. (1970). Effect of three fungicides on vegetative growth of *Verticillium dahliae* and *Agaricus bisporus* isolates. *Phytopathology*, 60: 1320.

Wuest, P.J., Beyer, D.M. (1996). Manufactured and recycled materials used as casing in *Agaricus bisporus* mushroom production. In: Royse, D.J. (Ed.), *Proc. Mushroom Biology and Mushroom Products*. The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA, pp. 241-250.

Xu, Q., Singh, A., Himmel, M.E. (2009). Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 364-371.

Yarden, O., Salomon, R., Katan, J., Aharonson, N. (1990). Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 36: 15-23.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Биографија

Дејана Косановић рођена је 4. јануара 1983. године у Загребу. Биолошки факултет, Универзитета у Београду, уписала је 2002. године. Током школске 2007/08. године студирала је биологију у Сједињеним Америчким Државама, на Georgia State Универзитету у Атланти као стипендиста америчке владе, Forecast EXCHANGE Program, World Learning organization, Washington D.C. Током 2009. године као студент биологије боравила је у Шпанији на Complutense Универзитету у Мадриду као део Темпус пројеката, H.E.R.B.S. Основне студије завршила је 2010. године и исте године уписала је последипломске студије на Биолошком факултету, Универзитета у Београду, на групи Биологија и модулу Експериментална микологија, код проф. др Јелене Вукојевић и др Иване Поточник. До 2012. године волонтирала је на Институту за пестициде и заштиту животне средине, Земун, у Лабораторији за примењену фитопатологију. Од 2012. до 2013. године радила је у Биомедицинском центру Института Торлак, а од 2014. године ради на Институту за вирусологију, вакцине и серуме “Торлак“. До сада је укупно објавила 8 научних радова и 7 саопштења.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Дејана Д. Косановић

Број индекса или пријаве докторске дисертације: Б3061/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Врсте рода *Trichoderma*, узрочници зелене плесни шампињона [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] и њихова осетљивост на фунгициде и биофунгициде“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска 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 кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, 07.09.2015.

Потпис докторанта



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора: **Дејана Д. Косановић**

Број индекса или пријаве докторске дисертације: **Б3061/2010**

Студијски програм: **Биологија**, модул: **Експериментална микологија**

Наслов докторске дисертације: **„Врсте рода *Trichoderma*, узрочници зелене плесни шампињона [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] и њихова осетљивост на фунгициде и биофунгициде“**

Ментор: **проф. др Јелена Вукојевић и др Ивана Поточник**

Потписана: **Дејана Д. Косановић**

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предала 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.

У Београду, 07.09.2015.

Потпис докторанта



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Врсте рода *Trichoderma*, узрочници зелене плесни шампињона [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] и њихова осетљивост на фунгициде и биофунгициде“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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

Потпис докторанта

У Београду, 07.09.2015.

