

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Milica V. Mihajlović, dipl. inž.

**PATOGENI PAPRIKE IZ ZEMLJIŠTA I  
MOGUĆNOST NJIHOVOG SUZBIJANJA  
FUNGICIDIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Milica V. Mihajlović, BSc.

**SOIL-BORNE PATHOGENS OF  
PEPPER AND POSSIBILITIES OF  
FUNGICIDE CONTROL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Poljoprivredni fakultet – Beograd

Mentor: dr Petar Vukša, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Drugi mentor: dr Emil Rekanović, naučni saradnik  
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Članovi komisije:

dr Mirko Ivanović, redovni profesor u penziji  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Milan Stević, docent  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Brankica Tanović, naučni saradnik  
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine u Zemunu.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Emilu Rekanoviću kao mentoru doktorske disertacije i dr Brankici Tanović koji su mi pružili svoju neizmernu stručnu pomoć, znanje i iskustvo.*

*Najlepše hvala mentoru prof. dr Petru Vukši na dragocenoj pomoći i savetima prilikom izrade disertacije, kao i članovima komisije, prof. dr Mirku Ivanoviću i dr Milanu Steviću na korisnim sugestijama prilikom pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem svim kolegama iz Instituta, naročito kolegama iz Laboratorije za primenjenu fitopatologiju. Posebnu zahvalnost želim da izrazim Jovani Hrustić i Mili Grahovac na ogromnoj pomoći i podršci. Veliku zahvalnost dugujem i Vladimiru Halapiru na pomoći oko pripreme rukopisa za štampanje i oko oglada u stakleniku.*

*Veoma sam zahvalna i mr Dragani Budakov (Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu) i Mladenu Đordjeviću (Institut za povrtarstvo - Smederevska Palanka) na ustupljenim izolatima.*

*Hvala mojoj porodici na moralnoj i materijalnoj podršci.*

# PATOGENI PAPRIKE IZ ZEMLJIŠTA I MOGUĆNOST NJIHOVOG SUZBIJANJA FUNGICIDIMA

Milica Mihajlović, dipl. inž.

## REZIME

Uzorci obolelih delova biljaka paprike sa simptomima uvenuća i truleži korena i prizemnog dela stabla prikupljeni su sa različitih lokaliteta teritorije Republike Srbije u cilju identifikacije prouzrokovala oboljenja, kao i ispitivanja njihove osetljivosti na klasične i biofungicide u uslovima *in vitro* i *in vivo*. Na osnovu proučenih patogenih i morfoloških svojstava utvrđeno je da dobijeni izolati pripadaju vrstama: *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* i *Pythium aphanidermatum*. Identitet izolata potvrđen je analizom sekvenci DNK fragmenata dobijenih korišćenjem univerzalnog para prajmera ITS1/ITS4.

Osetljivost izolata na fungicide u uslovima *in vitro* proučena je metodom inhibicije porasta micelije, pri čemu je određivana koncentracija fungicida koja izaziva inhibiciju porasta 50 % u odnosu na kontrolu ( $EC_{50}$ ), dok je *in vivo* efekat fungicida na patogene iz zemljišta proučavan u uslovima staklenika na veštački inokulisanim biljkama paprike. U uslovima *in vitro*, izolat *V. dahliae*, prouzrokovalac „zelenog uvenuća“ paprike, bio je veoma osetljiv na difenokozol ( $EC_{50} = 0,02$  mg/l) i prochloraz ( $EC_{50} = 0,03$  mg/l) i umereno osetljiv na tiofanat-metil ( $EC_{50} = 3,48$  mg/l). Međutim, u uslovima staklenika, najveću efikasnost u suzbijanju *V. dahliae* na inokulisanim biljkama paprike ispoljio je preparat na bazi tiofanat-metila (83,1 % u odnosu na kontrolu), mada razlika u intenzitetu oboljenja između varijanti primene tiofanat-metila (83,1 %), prochloraza (73,8 %) i difenokonazola (70,8 %) nije bila statistički značajna. Od proučavanih fungicida najslabija efikasnost utvrđena je kod preparata na bazi azoksistrobina (23,1 %), koja se nije razlikovala od kontrole ( $P > 0,05$ ). Takođe, utvrđena je visoka pozitivna korelacija između efikasnosti fungicida i visine biljaka ( $r = 0,81$ ), kao i između efikasnosti i sveže mase biljaka paprike ( $r = 0,84$ ). Dužina nekrotiranog prizemnog dela stabla bila je u negativnoj korelaciji sa efikasnošću fungicida ( $r = - 0,84$ ).

Izolat *F. oxysporum* bio je najosetljiviji na prohloraz ( $EC_{50} = 0,07$  mg/l), a najmanje osjetljiv na fluopiram ( $EC_{50} = 1075,01$  mg/l) u eksperimentalnim uslovima *in vitro*. U ogledu *in vivo* najefikasniji su bili preparati na bazi kaptana (95,6 %) i prohloraza (92,2 %), a najmanje efikasan preparat na bazi tiofanat-metila (54,4 %). Korelacija između efikasnosti fungicida i visine biljaka bila je umerena ( $r = 0,56$ ), a između efikasnosti i sveže mase biljaka slaba ( $r = 0,43$ ).

U uslovima *in vitro*, za izolat *S. sclerotiorum* utvrđena je najveća osjetljivost na fluopiram ( $EC_{50} = 0,003$  mg/l), dok je najmanje toksičan za ovaj izolat bio kaptan ( $EC_{50} = 8,94$  mg/l). U uslovima staklenika, najveću efikasnost u suzbijanju *S. sclerotiorum* na inokuliranim biljkama paprike ispoljio je preparat na bazi kaptana (98 %), dok je najmanja efikasnost postignuta primenom preparata na bazi prohloraza (45 %). Između efikasnosti fungicida i visine biljaka ( $r = 0,88$ ), kao i između efikasnosti i sveže mase biljaka ( $r = 0,92$ ) utvrđena je statistički značajna korelacija.

Za izolat *R. solani* utvrđena je najniža vrednost  $EC_{50}$  u uslovima *in vitro* za iprodion ( $EC_{50} = 0,43$  mg/l), a najviša za azoksistrobin ( $EC_{50} = 596,60$  mg/l). U uslovima *in vivo* najviša efikasnost u suzbijanju *R. solani* postignuta je primenom preparata na bazi iprodiona (95,8 %), a najmanja u varijanti u kojoj je primenjivan preparat na bazi fluopirama (47,4 %). Korelacija između efikasnosti fungicida i visine biljaka bila je umerena ( $r = 0,6$ ), a između efikasnosti i sveže mase biljaka slaba ( $r = 0,34$ ).

Izolat *P. aphanidermatum*, u testovima toksičnosti ispoljio je najveću osjetljivost na azoksistrobin, sa vrednošću srednje efektivne koncentracije od 0,05 mg/l, a najnižu na fosetil-aluminijum ( $EC_{50} = 302,65$  mg/l). U uslovima staklenika, najbolji efekat u suzbijanju *P. aphanidermatum* ispoljio je preparat na bazi fosetil-aluminijuma (97,5 %), dok je najniža efikasnost utvrđena u varijantama primene preparata na bazi azoksistrobina (57,5 %).

Od svih izolata, najveću osjetljivost na ulje čajnog drveta u uslovima *in vitro* ispoljio je izolat *S. sclerotiorum*, sa  $EC_{50}$  od 70,28 mg/l. Najniža toksičnost ovog etarskog ulja utvrđena je za izolate *V. dahliae* ( $EC_{50} = 1507,65$  mg/l) i *F. oxysporum* ( $EC_{50} = 1205,78$  mg/l) za koje su dobijene veoma visoke vrednosti srednjih efektivnih koncentracija. U ogledima *in vivo*, preparat na bazi ulja čajnog drveta ispoljio je najveću

efikasnost u suzbijanju *R. solani* (90,5 %), dok je najslabiji efekat utvrđen na *F. oxysporum*, sa efikasnošću od samo 5,6 %.

Ocenjivanje antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *B. subtilis* prema proučavanim patogenima vršeno je nakon inkubacije od 48 h pri temperaturi od 25 °C merenjem prečnika zone inhibicije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen standardni fungicid. Najveća antagonistička aktivnost utvrđena je za izolat *V. dahliae*. Međutim, porast micelije u zoni dejstva *B. subtilis* nije bio potpuno zaustavljen već je uočena zona delimične inhibicije porasta micelije prečnika 16 mm. Nizak stepen antagonističke aktivnosti soja Č13 *B. subtilis* utvrđen je i za izolat *F. oxysporum*, dok za izolate *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum* utvrđeno potpuno odsustvo antagonističke aktivnosti. U ogledima izvedenim u uslovima staklenika, soj Č13 *B. subtilis* ispoljio je najbolji efekat u suzbijanju *F. oxysporum* sa efikasnošću od 77,8 %, dok je najniža efikasnost utvrđena u suzbijanju *P. aphanidermatum* (22,5 %) i *S. sclerotiorum* (5 %).

Od fungicida hemijskog porekla, najširi spektar delovanja utvrđen je za tiofanat-metil. Međutim, nijedan od ispitivanih fungicida ne pokriva svojim spektrom delovanja sve patogene iz zemljišta, tako da je pre njihove primene neophodna prethodna identifikacija prouzrokovala oboljenja.

Spektar i intenzitet delovanja biofungicida nije bio zadovoljavajući, tako da dobijeni rezultati ukazuju na rizik primene ovih preparata u sadašnjem konvencionalnom modelu proizvodnje paprike. Međutim, utvrđena visoka efikasnost soja Č13 *B. subtilis* u suzbijanju *F. oxysporum* (77,8 %), kao i ulja čajnog drveta u suzbijanju *R. solani* (90,5 %) mogla bi da predstavlja osnovu za primenu ovih supstanci nakon detekcije i identifikacije patogena iz zemljišta u proizvodnji paprike.

**Ključne reči:** patogene gljive iz zemljišta, paprika, osetljivost, efikasnost, fungicidi, biofungicidi.

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitofarmacija

**UDK:** 635.649:632.4 (043.3)

# SOIL-BORNE PATHOGENS OF PEPPER AND POSSIBILITIES OF FUNGICIDE CONTROL

Milica Mihajlović, BSc.

## ABSTRACT

Samples of diseased pepper plant parts, expressing wilt as well as root and crown rot symptoms, were collected at different localities on territory of the Republic of Serbia with an aim of identification of disease causal agents and testing their sensitivity to conventional and biological fungicides in *in vitro* and *in vivo* assays. Based on the studied pathogenic and morphological characteristics, it was found that the obtained isolates belong to the following species: *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pythium aphanidermatum*. Isolates identity was confirmed by the sequence analysis of DNA fragments obtained by application of pair of universal primers ITS1/ITS4.

Sensitivity of isolates to fungicides in *in vitro* assays was tested by mycelial growth inhibition method and fungicide concentration that causes 50 % growth inhibition compared to control ( $EC_{50}$ ) was determined. Fungicide effects on soil-borne pathogens *in vivo* were tested under greenhouse conditions on artificially inoculated pepper plants. In *in vitro* assays, the isolate *V. dahliae*, causal agent of "green wilt" of pepper, proved to be very sensitive to difenoconazole ( $EC_{50} = 0.02$  mg/l) and prochloraz ( $EC_{50} = 0.03$  mg/l) and moderately sensitive to thiophanate-methyl ( $EC_{50} = 3.48$  mg/l). However, under greenhouse conditions, the highest efficacy in *V. dahliae* control on inoculated pepper plants was recorded for the product based on thiophanate-methyl (83.1 % compared to control). Though, the difference in disease severity between treatments with thiophanate-methyl (83.1 %), prochloraz (73.8 %) and difenoconazole (70.8 %) was not statistically significant. Among the tested fungicides, the lowest efficacy was recorded for the product based on azoxystrobin (23.1 %), with no significant difference compared to control ( $P > 0.05$ ). Moreover, high positive correlation between fungicide efficacy and height of the plants ( $r = 0.81$ ), as well as between efficacy and fresh mass of pepper plants ( $r = 0.84$ ) was also registered. Length



of necrotic ground part of the stem was in negative correlation with fungicide efficacy ( $r = - 0.84$ ).

In *in vitro* assays, *F. oxysporum* isolate was the most sensitive to prochloraz ( $EC_{50} = 0.07$  mg/l) and the least sensitive to fluopyram ( $EC_{50} = 1075.01$  mg/l). In *in vivo* assay the highest efficacy was recorded for the products based on captan (95.6 %) and prochloraz (92.2 %), and the lowest for the product based on thiophanate-methyl (54.4 %). Correlation between fungicide efficacy and plant height was moderate ( $r = 0.56$ ), and between efficacy and fresh mass of plants weak ( $r = 0.43$ ).

Under *in vitro* conditions, for *S. sclerotiorum* isolate the lowest value of median effective concentration was recorded for fluopyram ( $EC_{50} = 0.003$  mg/l) while captan was the least toxic to this isolate ( $EC_{50} = 8.94$  mg/l). Under greenhouse conditions, the highest efficacy against *S. sclerotiorum* on inoculated pepper plants was obtained by the product on the basis of captan (98 %), while the lowest efficacy was achieved by the product on the basis of prochloraz (45 %). Statistically significant correlation was recorded between fungicide efficacy and plant height ( $r = 0.88$ ), as well as between fungicide efficacy and fresh mass of plants ( $r = 0.92$ ).

For *R. solani* isolate the lowest  $EC_{50}$  value in *in vitro* assay was determined for iprodione ( $EC_{50} = 0.43$  mg/l), and the highest for azoxystrobin ( $EC_{50} = 596.60$  mg/l). In *in vivo* assays the highest efficacy in *R. solani* control was achieved by the product on the basis of iprodione (95.8 %), and the lowest in the treatment with the product on the basis of fluopyram (47.4 %). Correlation between fungicide efficacy and plant height was moderate ( $r = 0.6$ ), and between fungicide efficacy and fresh mass of plants weak ( $r = 0.34$ ).

In toxicity tests, isolate *P. aphanidermatum* expressed the highest sensitivity to azoxystrobin, with the value of median effective concentration of 0.05 mg/l, and the lowest sensitivity to fosetyl-aluminium ( $EC_{50} = 302.65$  mg/l). Under greenhouse conditions, the best effect against *P. aphanidermatum* was achieved by the product on the basis of fosetyl-aluminium (97.5 %), while the lowest efficacy value was recorded in treatments with the product on the basis of azoxystrobin (57.5 %).

Among all isolates, *S. sclerotiorum* expressed the highest sensitivity to tea tree oil *in vitro* with  $EC_{50}$  of 70.28 mg/l. The lowest toxicity of this essential oil was recorded for *V. dahliae* ( $EC_{50} = 1507.65$  mg/l) and *F. oxysporum* ( $EC_{50} = 1205.78$  mg/l).

isolates for which the obtained values of median effective concentration were very high. In *in vivo* assays the product on the basis of tea tree oil showed the highest efficacy in *R. solani* control (90.5 %), while the weakest effect was recorded against *F. oxysporum*, with efficacy of only 5.6 %.

Assesment of antagonistic activity of the bacterium *B. subtilis* strain Č13 was conducted after 48 h incubation at 25 °C by measuring inhibition zone diameter (mm) and by comparing with inhibition zone diameters obtained in control and in the treatment with conventional fungicide. The highest antagonistic activity was recorded against *V. dahliae* isolate. However, mycelial growth in the activity zone *B. subtilis* was not completely inhibited, yet zone of partial inhibition of mycelial growth with a diameter of 16 mm was observed. Low level of antagonistic activity of *B. subtilis* strain Č13 was recorded for the isolate of *F. oxysporum*, while complete absence of antagonistic activity was observed for *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *P. aphanidermatum* isolates. Under greenhouse conditions, on inoculated pepper plants, *B. subtilis* strain Č13 expressed the highest efficacy in control of *F. oxysporum* amounting 77.8 %. The lowest efficacy of *B. subtilis* strain Č13 *in vivo* was recorded in control of *P. aphanidermatum* (22.5 %) and *S. sclerotiorum* (5 %).

Among tested chemical fungicides, the widest activity spectrum was observed for thiophanate-methyl. However, activity spectrum of any of the tested fungicides does not cover all soil-borne pathogens. Thus, causal agent of the disease has to be identified prior to fungicide application.

Activity spectrum of the tested biofungicides was not satisfying either. Therefore, the obtained results point to the risk of these products application in contemporary conventional model of pepper production. However, registered high efficacy of *B. subtilis* strain Č13 against *F. oxysporum* (77.8 %), as well as efficacy of tea tree oil against *R. solani* (90.5 %) could be the basis for application of these substances after detection and identification of the pathogens present in soil intended for pepper production.

**Key words:** soil-borne pathogenic fungi, pepper, sensitivity, efficacy, fungicides, biofungicides.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Patogene gljive i pseudogljive iz zemljišta</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Verticillium dahliae</i> .....	<b>3</b>
2.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	<b>4</b>
2.1.3. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	<b>6</b>
2.1.4. <i>Rhizoctonia solani</i> .....	<b>7</b>
2.1.5. <i>Pythium aphanidermatum</i> .....	<b>9</b>
<b>2.2. Mogućnosti suzbijanja patogena iz zemljišta</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Preventivne mere zaštite .....	<b>10</b>
2.2.2. Biološke mere suzbijanja .....	<b>14</b>
2.2.3. Hemijsko suzbijanje .....	<b>23</b>
<b>2.3. Fungicidi</b> .....	<b>24</b>
2.3.1. Benzimidazoli .....	<b>24</b>
2.3.2. Triazoli i imidazoli .....	<b>26</b>
2.3.3. Strobilurini .....	<b>26</b>
2.3.4. Piridinil-etil-benzamidi .....	<b>28</b>
2.3.5. Ftalimidi .....	<b>29</b>
2.3.6. Karboksamidi .....	<b>30</b>
2.3.7. Karbamati .....	<b>30</b>
2.3.8. Dikarboksimidi .....	<b>31</b>
2.3.9. Fenilamidi .....	<b>32</b>
2.3.10. Fosfonati .....	<b>33</b>
2.3.11. Ditiokarbamati .....	<b>33</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1. Uzorkovanje i izolacije gljiva i pseudogljiva</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2. Provera patogenosti izolata</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3. Morfološke karakteristike izolata</b> .....	<b>37</b>

3.4. Molekularna identifikacija	37
3.4.1. Priprema izolata	38
3.4.2. Ekstrakcija DNK	38
3.4.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	38
3.4.4. Analiza produkata amplifikacije	39
3.4.5. Prečišćavanje i sekvencioniranje	39
3.5. Utvrđivanje osetljivosti izolata na fungicide i biofungicide <i>in vitro</i>	40
3.5.1. Ispitivanje osetljivosti izolata na strobilurine u prisustvu salicilhidroksaminske kiseline (SHAM)	42
3.5.2. Ocena parametara osetljivosti – obrada rezultata	42
3.5.3. Ispitivanje antagonističkog efekta bakterije <i>B. subtilis</i> soja Č13 na patogene gljive iz zemljišta <i>in vitro</i>	43
3.5.4. Ocena antagonističkog efekta soja bakterije <i>B. subtilis</i> – obrada rezultata	44
3.6. Ispitivanje efikasnosti fungicida i biofungicida	44
3.6.1. Priprema inokuluma	45
3.6.2. Ispitivanje efikasnosti fungicida i biofungicida u uslovima staklenika	47
<b>4. REZULTATI</b>	<b>48</b>
4.1. Patogene gljive i pseudogljive	48
4.1.1. Simptomi	48
4.1.2. Provera patogenosti izolata	49
4.1.3. Identifikacija izolata klasičnim metodama	51
4.1.4. Molekularna identifikacija	56
4.2. Efekti fungicida i biofungicida na patogene gljive iz zemljišta	59
4.2.1. <i>V. dahliae</i>	59
4.2.2. <i>F. oxysporum</i>	71
4.2.3. <i>S. sclerotiorum</i>	83
4.2.4. <i>R. solani</i>	94
4.2.5. <i>P. aphanidermatum</i>	106

<b>5. DISKUSIJA</b> _____	<b>117</b>
<b>5.1. Efekti fungicida na patogene iz zemljišta</b> _____	<b>118</b>
<b>5.2. Efekti biofungicida na patogene iz zemljišta</b> _____	<b>126</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b> _____	<b>130</b>
<b>7. LITERATURA</b> _____	<b>133</b>

## 1. UVOD

Patogeni iz rodova *Verticillium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* i *Pythium* koji su prisutni u zemljištu, predstavljaju značajan problem u gajenju paprike kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju. U zavisnosti od plodoreda, osetljivosti sorte ili hibrida, virulentnosti patogena, tipa zemljišta i uslova spoljne sredine, štete koje nastaju mogu biti od 6,3 do 100 % (Katan, 2000; Bhat i sar., 2003). Njihova izrazita polifagnost, primena pogrešne agrotehnike i neadekvatno suzbijanje omogućili su njihovu rasprostranjenost u različitom intenzitetu u svim važnijim povrtarskim proizvodnim područjima Srbije.

Za suzbijanje navedenih patogena primenjuje se više mera koje zajedno čine kompleks integralnog programa zaštite: agrotehničke, biološke i hemijske mere (Katan, 2000). Uklanjanje žetvenih ostataka i samoniklih biljaka, redovan pregled useva, dezinfekcija zemljišta, primena plodoreda i primena odgovarajućih fungicida predstavljaju sastavni deo integralne zaštite. U našoj zemlji primena fungicida i dezinfekcija supstrata čine osnovu suzbijanja patogena iz zemljišta. Međutim, preparati na bazi metil bromida i drugih aktivnih supstanci koji su dugo korišćeni u suzbijanju ovih patogena izbačeni su iz upotrebe zbog opasnosti koje mogu da nanesu čovekovom zdravlju i životnoj sredini (Gullino i sar., 2003). Takođe, mali broj registrovanih fungicida za suzbijanje *Verticillium* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Rhizoctonia* spp. i *Pythium* spp., ograničava i ovaj način suzbijanja. Do skora se za suzbijanje patogena iz zemljišta koji pripadaju pravim gljivama najviše koristio sistemski fungicid benomil (benzimidazoli). Međutim, benomil je zbog nepovoljnih toksikoloških svojstava stavljen na listu fungicida koji se više ne mogu koristiti u zaštiti biljaka koje se koriste za ishranu ljudi (Janjić i Elezović, 2010). Zato se sve intenzivnije proučavaju mogućnosti primene drugih fungicida kao alternative benomilu (Song i sar., 2004; Martinez i sar., 2005; Bubici i sar., 2006; Smith i sar., 2008; Tsrer, 2010).

U našoj zemlji nije u zadovoljavajućoj meri istraživano suzbijanje patogenih gljiva i pseudogljiva paprike iz zemljišta. Budući da je u praksi mali broj fungicida koji se koriste protiv ovih patogena, kao i da su literaturni podaci o osetljivosti ovih patogena na fungicide prilično oskudni, ispitivanje mogućnosti primene postojećih i novih aktivnih supstanci hemijskog i prirodnog porekla dobija sve veći značaj.

Istraživanja usmerena u pravcu biološkog suzbijanja patogena iz zemljišta uglavnom se baziraju na primeni antagonističkih sojeva bakterija iz rodova *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* i gljiva *Pythium oligandrum*, *Trichoderma viridae* i *Talaromyces flavus* (Garmendia i sar., 2004; Mercado-Blanco i sar.,

2004; Rekanović i sar., 2007). Međutim, efikasnost primene ovih organizama u velikoj meri zavisi od uslova spoljne sredine i od prirode odabranog/selekcionisanog soja, odnosno od njegovog antagonističkog potencijala.

Primena etarskih ulja kao potencijalnih ekološko prihvatljivih dezinficijenasa zemljišta takođe su predmet brojnih istraživanja (Cakir i sar., 2005; Rodriguez i sar., 2007; Hashem i sar., 2010; Yohalem i Passey, 2011).

Poznavanje osetljivosti patogena iz zemljišta i efikasnost sintetskih fungicida i biofungicida za njihovo suzbijanje osnovna je pretpostavka za njihovu uspešnu primenu za zaštitu paprike i drugih povrtarskih biljaka u zaštićenom prostoru. Ove mere čine sastavni deo integralnog pristupa zaštite koji predstavlja preovlađujući koncept savremene zaštite bilja.

U skladu sa dostupnim literaturnim podacima, osnovni cilj planiranih istraživanja jeste utvrđivanje i identifikacija patogena iz zemljišta paprike i ispitivanje mogućnosti njihovog suzbijanja primenom sintetskih i biofungicida. Pojedinačni ciljevi vezani su za izolaciju patogena iz uzoraka obolelih biljaka paprike i dokazivanje identiteta patogena klasičnim i molekularnim metodama; utvrđivanje njihove osetljivosti na fungicide sa različitim mehanizmom delovanja *in vitro* i *in vivo*, kao i razmatranje opravdanosti primene biofungicida kao novog metoda zaštite paprike.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Patogene gljive iz zemljišta

#### 2.1.1. *Verticillium dahliae*

Vrste roda *Verticillium* pripadaju redu *Hyphomycetales*, porodici *Moniliaceae* i poznate su kao patogeni iz zemljišta. Reprodukuj se isključivo bespolnim putem, nemaju spolno razmnožavanje, pa ih još nazivaju i nesavršenim gljivama ili *Fungi imperfecti*. Vrsta *Verticillium dahliae* posebno je značajna kao prouzročivač „verticilioznog uvenuća” i prisutna je u svim područjima sa umerenom i suptropskom klimom (Pegg i Brady, 2002). Ima vrlo širok krug domaćina, a u našoj zemlji poznat je kao značajan patogen paprike, kajsije i šljive. Neke monokotiledone vrste biljaka, kao što su pšenica i ječam, ali i mnoge korovske biljke su latentni domaćini ove gljive (Ivanović, 2004).

*Verticillium* spp. izazivaju uvenuće, koje se javlja tokom vegetacije, pri čemu biljke zadržavaju zelenu boju. Zato se ovaj tip simptoma naziva i „zeleno uvenuće”. Početni simptomi uočavaju se na donjem lišću zaraženih biljaka u vidu blagog uvenuća. Tkivo lišća zahvaćeno uvenućem omekša i obezboji se počev od ivice liske prema njenom središnjem delu, sve više gubi turgor, suši se i na kraju opada. Pored lišća, mogu biti zahvaćene pojedine grane, ali i cele biljke, a na uzdužnom preseku korena i prizemnog dela stabla može se uočiti nekroza ksilema. Obolelo tkivo je mrke boje i jasno se razlikuje od okolnog zdravog tkiva. U početnim fazama oboljenja, pre nego što patogen u potpunosti zahvati sprovodne sudove, zaražene biljke mogu se privremeno oporaviti tokom noći (Mijatović i sar., 2007).

*V. dahliae* ima belu miceliju koja kasnije postaje tamna i formira mikrosklerocije. Ova gljiva dobila je ime po osobini da formira po jednu konidiju na pršljenasto i kružno (verticilius) raspoređenim fialidama na konidiofori. Konidije su eliptične ili ovalne, prozirne, većinom jednoćelijske, veličine 3-5  $\mu\text{m}$  (Ivanović, 2004). U prirodi se održava u obliku trajne micelije ili mikrosklerocija. Ima slabu konkurentsku sposobnost prema drugim saprotrofima, pa teško opstaje u zemljištu bez biljke domaćina. Micelija i konidije se u zemljištu održavaju kratko, oko šest meseci, pa je samim tim njihova uloga u održavanju patogena ograničena (Pegg i Brady, 2002). Bhat i sar. (2003) navode da se mikrosklerocije u odsustvu domaćina mogu održati u zemljištu u poljskim uslovima i više od 14 godina, ali najveća količina mikrosklerocija uspeva da preživi u zemljištu najviše dve do četiri godine. Međutim, čak i veoma mala količina mikrosklerocija dovoljna je da inficira veliki broj osetljivih biljaka. Mikrosklerocije imaju i delimičnu sposobnost da se formiraju u ostacima biljnog materijala i



da na taj način povećaju svoju brojnost u zemljištu. Zbog velike prilagodljivosti uslovima spoljne sredine i perzistentnosti mikrosklerocija, patogen se u zemljištu može održati gotovo neograničeno dugo. Uslovi spoljne sredine, a naročito temperatura zemljišta utiču na zastupljenost patogena. Najprisutniji je u toplijim klimatima, gde je optimalna temperatura zemljišta 23-25 °C (Soesanto i Termorshuizen, 2001). Mikrosklerocije se održavaju u biljnim ostacima prethodnog useva ili na korovskim biljkama i oslobađaju se prilikom obrade zemljišta, a semenom se mogu prenositi na udaljena područja. Sklerocije se formiraju i održavaju na korenovom sistemu pšenice i ječma, koji su latentni domaćini, te ne ispoljavaju simptome (Pegg i Brady, 2002). Za klijanje mikrosklerocija potrebno je da u zemljištu ima dovoljno vlage, da je temperatura u intervalu od 20-25 °C, ali i da su prisutne stimulativne materije koje luči koren prilikom rasta. Gljiva prodire kroz rane ili direktno kroz epidermis korena do ksilemskog tkiva, u kome se dalje sistemično razvija. Rast parazita u sprovodnom tkivu otežava transport vode i mineralnih materija ka nadzemnom delu biljke (Pomar i sar., 2004). Svojom aktivnošću, patogen stimuliše stvaranje tila koje nastaju od susednih parenhimskih ćelija koje prorastaju kroz pore u lumen sprovodnih elemenata ksilema – traheje i traheide (Robb i sar., 1991). Pored formiranja tila, dolazi i do pojačane lignifikacije ćelijskih zidova što ujedno predstavlja i fizičku barijeru kojom biljka sprečava dalje prodiranje patogena. Neke biljke reaguju formiranjem i deponovanjem želatinoznih materija, kao i kompleksa fenolnih jedinjenja zbog kojih nastaje tamno obojavanje sprovodnog tkiva (Pegg i Brady, 2002). *V. dahliae* se razvija u ksilemu sve do smrti biljke domaćina, nakon čega prodire i u druga tkiva (Goicoechea i sar., 2000). U zaraženom biljnom tkivu *V. dahliae* formira mikrosklerocije, koje služe za njegovo održavanje (Pegg i Brady, 2002).

U uslovima visoke relativne vlažnosti vazduha i temperature, iz sudovnog dela micelija se probija na površinu lista, obrazujući duž lisnih nerava konidiofore sa konidijama. Kišne kapi spiraju konidije sa zaraženih biljaka u zemljište gde dolaze u dodir sa korenom, kličaju i prodiru u biljku i na taj način vrše sekundarne zaraze (Ivanović, 2004). Konidije se formiraju u manjim grupama u sprovodnom tkivu, a vodom i mineralnim materijama prenose se naviše, gde nastaju nove kolonije parazita.

### **2.1.2. *Fusarium oxysporum***

*Fusarium oxysporum* Schlech. je jedna od najznačajnijih vrsta roda *Fusarium*, a po taksonomskoj klasifikaciji pripada redu *Hypocreales*, familiji *Nectriaceae*.

*F. oxysporum* je prouzročivač „fuzarioznog uvenuća” biljaka. Rasprostranjen je u svim krajevima sveta, sreće se u svim klimatima, a posebno u toplijim područjima. Parazitira

veliki broj biljaka iz različitih familija, izuzev biljaka iz porodice trava. Značajne štete pričinjava u proizvodnji: paradajza, paprike, krompira, lubenica, dinja, cveća, graška, luka, asparagusa i mnogih drugih povrtarskih biljaka, a kao patogen iz zemljišta uspešno se razvija i na mrtvim biljnim ostacima i ima veoma snažnu saprofitsku aktivnost (Mijatović i sar., 2007). Genetički je vrlo varijabilna gljiva. Neki izolati su patogeni samo za određene biljne vrste (forma *specialis*), a neki samo za određene sorte (rase). Poznato je 80 specifičnih formi ove gljive od kojih su neke podeljene u rase (Ivanović, 2004).

Simptomi „fuzarioznog uvenuća“ razlikuju se u zavisnosti od biljke domaćina, patotipa parazita, spoljnih uslova i drugih faktora. *F. oxysporum* generalno izaziva simptome kao što su: uvenuće, hloroza, nekroza, prevremeno opadanje listova, mrka obojenost sprovodnih sudova, zakržljalogost i uginuće biljaka (Mijatović i sar., 2007). Kotiledoni na klijancima i prvi pravi listovi postaju hlorotični, venu i suše se. Gljiva se veoma brzo razvija u sprovodnom sistemu. Biljke u polju iznenadno venu, vidno zaostaju u porastu, a nadzemni zeljasti delovi poprimaju žutu boju („žuto uvenuće“). Na uzdužnom preseku prizemnog dela stabla uočava se mrka obojenost sprovodnog tkiva, što predstavlja karakterističan dijagnostički simptom. Propadanje čitavih biljaka nastaje u kasnijim fazama razvoja, posle cvetanja i formiranja plodova. Simptomi koje prouzrokuje ovaj patogen slični su simptomima koje prouzrokuju gljive roda *Verticillium*. Ponekad, u prvim fazama razvoja oboljenja, biljke povrate svežinu tokom noći ili posle navodnjavanja, ali parazit se brzo razvija u sprovodnom tkivu biljke ometajući njegovu funkciju, što dovodi do potpunog uvenuća nekoliko dana kasnije (Mijatović i sar., 2007). Na starijem lišću nervi postaju prosvetljeni, javlja se hloroza liske ili uvenuće. Ovi simptomi se šire i na mlado lišće, a obično se javljaju na nekom bočnom listu, povezanom sa zaraženim sudovnim tkivom. Zaraženi delovi biljke nekrotiraju, a na stablu se javljaju izdužene nekrotične pege koje se šire do njegovog vrha. Nekroza sprovodnog sistema se može uočiti pri uzdužnom preseku korena, stabla i lisnih drški. Od sprovodnog sistema, oboljenje se dalje širi ka pokoričnom tkivu. „Fuzariozno uvenuće“ se posebno brzo razvija u fenofazi cvetanja i plodonošenja. U usevu se javljaju pojedinačna žarišta, koja se postepeno šire i prouzrokuju prevremeno izumiranje biljaka. Postoji sličnost između simptoma koje izaziva *F. oxysporum* i neke druge gljive, pa je za pravilnu dijagnozu neophodna mikroskopska determinacija (Ivanović, 2004).

Polni stadijum ove gljive nije poznat. Na KDA podlozi parazit u zavisnosti od izolata formira različite kolonije. Većina izolata *F. oxysporum*, u početku formira vazdušnu miceliju bele boje, koja posle izvesnog vremena postaje ružičasta do tamnocrvena. Mikrokonidije su uvek prisutne. One su ovalne, eliptične ili bubrežaste, jednoćelijske ili dvoćelijske i formiraju

se na kratkim nerazgranatim fikalidijama, grupisane u lažnim glavicama. Makrokonidije obično imaju 3-5 septi (vrlo retko 6-7), neznatno su savijene i sužene prema krajevima i uglavnom imaju „stopalo” na bazalnoj ćeliji. One se prvo formiraju na individualnim fikalidama, a zatim u sporodohijama. Hlamidospore su najčešće pojedinačne ili u vidu kraćih nizova (Lević, 2008).

*F. oxysporum* se u zemljištu održava uglavnom u zaraženim biljnim ostacima. Zahvaljujući hlamidosporama *F. oxysporum* može očuvati vitalnost i preko 10 godina. Hlamidospore počinju da kličaju kada se nađu u neposrednoj blizini hranljivih materija koje luči koren mladih biljaka. Klijanjem hlamidospore daju hife, konidije ili nove hlamidospore koje služe kao inokulum. U pokorično tkivo korena mogu prodreti različiti izolati *F. oxysporum*. Međutim, do infekcije dolazi samo ukoliko je izolat specifičan za određenog domaćina. Prodiranje parazita u koren vrši se u zoni izduživanja korena i može biti povezano i sa oštećenjima od nematoda iz grupe *Meloidogine*. Dospevanjem micelije i mikrokonidija patogena u sudovno tkivo nastavlja se širenje gljive u nadzemne delove biljke. U završnoj fazi parazit se širi u bočne delove biljke, gde nastaju vidljivi simptomi (Ivanović, 2004).

Ovaj patogen u zemljištu ima dobro razvijenu konkurentsku sposobnost prema drugim mikroorganizmima i drugim vrstama roda *Fusarium*. Širi se na dva načina: na kraće udaljenosti vodom i opremom, a na veće razdaljine zaraženim biljnim materijalom i semenom (Mijatović i sar., 2007).

### **2.1.3. *Sclerotinia sclerotiorum***

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary je polifagna fitopatogena gljiva. Pripada razdelu *Ascomycota*, klasi *Discomyceta*, redu *Helotiales*, porodici *Sclerotiniaceae*, rodu *Sclerotinia*. Prouzrokovala je bele truleži biljaka, koja se najčešće javlja u područjima sa umerenom klimom (Saharan i Mehta, 2008). U našim uslovima ova gljiva predstavlja problem pri gajenju povrća u uslovima produženog hladnog vremena i stalne vlažnosti zemljišta (Ivanović, 2004). Ima širok krug domaćina, parazitira sve značajne gajene biljke, posebno cveće i povrće, ali i brojne korovske biljke (Purdy, 1979).

„Bela trulež“ je oboljenje koje se javlja u svim fazama razvoja biljke domaćina. Gljiva se u prirodi održava u zaraženom biljnom tkivu i u zemljištu (Ivanović, 2004). Pri infekciji mladih, tek izniklih biljaka gljiva prouzrokuje poleganje ili topljenje rasada. Tada se na prizemnom delu stabla sejanaca uočavaju vodenaste nekrotične pege, koje zahvataju nežno tkivo stabala sa svih strana (Mijatović i sar., 2007). Kod starijih biljaka, početni simptomi se javljaju u vidu vodenih lezija na stablu, plodovima i lišću. U početnim fazama oboljenja

lezije se razvijaju na stablu, dok se na lišću mogu javiti slabo uočljivi simptomi koje je lako prevideti, sve dok ne dođe do truleži stabla. Lišće iznad lezija pre ili kasnije vene, lezije se šire, a na zareženim biljnim delovima razvija se bela, vunasta micelija, koja za vreme sušnih perioda brzo nestaje (Ivanović, 2004). Micelija patogena produkuje brojne sklerocije, koje predstavljaju i dijagnostički znak, a najčešće se javljaju tek nakon uginuća biljke domaćina. U početku sklerocije su bele, a kasnije pocrne i očvrstnu. Formiraju se i u unutrašnjosti i sa spoljašnje strane stabla. Micelija i sklerocije se obično javljaju na donjem lišću.

Sklerocije igraju važnu ulogu u razvoju oboljenja, jer predstavljaju tvorevine za održavanje ove gljive u prirodi i osnovni su izvor zaraze. U zemljištu se održavaju i više od osam godina, a u manjoj meri i na semenu (Adams i Ayers, 1979). Sklerocije nastaju od hifa koje se međusobno spajaju bočnim zidovima i anastomozama, a obavijene su ćelijama koje u sebi sadrže debeo sloj melanina. U *in vitro* uslovima se razvijaju pri temperaturama 0-30 °C, a pri temperaturama ispod 5 °C usporavaju svoj porast. Zanimljivo je da je optimalna temperatura za formiranje sklerocija mnogo niža od optimalne temperature za razvoj micelije koja je u intervalu 20-25 °C (Bedi, 1962). Takođe, utvrđeno je da je veća produkcija sklerocija u prisustvu svetlosti, nego u mraku. Nakon izlaganja sklerocija niskim temperaturama dolazi do formiranja apotecija. Da bi sklerocije klijale u apotecije one moraju prethodno biti izložene niskim temperaturama, a zatim mora doći do povećanja temperature i relativne vlažnosti vazduha. Apotecije u našim uslovima dozrevaju tokom proleća i početkom leta. Na apotecijske drške svetlost deluje pozitivno, one se izdužuju i askospore se raznose vetrom (Ivanović, 2004). Za klijanje askospora neophodna je vlaženje u trajanju od 16-24 h i temperatura od 0-25 °C (optimalna temperatura 15-20 °C). Utvrđeno je da su za infekciju pored navedenih faktora neophodne i egzogene hranljive materije koje luči biljka domaćin. Askospore klijaju u infekcionu hifu koja prodire direktno kroz kutikulu u biljno tkivo i to uz pomoć pektolitičkih i celulitičkih enzima. Takođe, gljiva može da kolonizira oštećena, izumrla ili fiziološki stara tkiva koja predstavljaju izvor hrane i odakle se može vršiti infekcija zdravog tkiva (Willets i Wong, 1980).

Nakon razgradnje biljnih delova sklerocije se oslobađaju i dospevaju u zemljište. Smenjivanje dužih kišnih perioda povremeno sušnim omogućava intenzivno formiranje apotecija, oslobađanje askospora i zaražavanje biljaka (Saharan i Mehta, 2008).

#### **2.1.4. *Rhizoctonia solani***

*Rhizoctonia solani* Kuhn (teleomorf *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) je najčešće proučavana i najznačajnija vrsta u okviru roda *Rhizoctonia*. *R. solani* je polifagna

gljiva koja je široko rasprostranjena u zemljištima širom sveta (Harveson, 2003). Njena veoma heterogena populacija prouzrokuje oboljenja na velikom broju ratarskih useva, povrću, drvenastim i ukrasnim biljkama, začinskom bilju, travama i korovskim vrstama (Sneh i sar., 1991). *R. solani* je i sa ekonomskog aspekta veoma značajan patogen. U povoljnim uslovima za razvoj gljive štete mogu biti veoma velike i ogledaju se u smanjenju prinosa i pogoršanju kvaliteta plodova obolelih biljaka.

*R. solani* je zbirna vrsta s velikim varijacijama u morfologiji, patologiji i zahtevima u ishrani (Andersen, 1982). Otkriveni su i proučavani brojni izolati prilagođeni različitim zemljištima, klimi i regionima. Postoje stalne varijacije u osobinama pojedinih grupa, ali nema dovoljno pouzdanih razlika da bi se zbirna vrsta mogla razdvajati na posebne vrste ili specijalizovane forme (Ivanović, 2004).

*R. solani* prouzrokuje propadanje semena povrtarskih biljaka, a na sejancima izaziva nekrozu i omekšavanje hipokotila, pa mlade biljke brzo polegnu. Polegle biljke postaju mrke i brzo istrule (Mijatović i sar., 2007). Nakon ostvarenih početnih infekcija oboljenje se u usevu dalje širi kružno oko mesta infekcije. Na starijim biljkama karakterističan simptom je mrko obojen zaraženi deo prizemnog dela stabla. On je jasno ograničen od susednog zdravog tkiva. Gljiva zaražava lišće koje je u dodiru sa zemljištem. Širi se kroz peteljku i prouzrokuje rak rane na stablu, a na zaraženim plodovima mrke pege. Infekcija se ostvaruje na različite načine – direktnim prodiranjem infekcione hife kroz epidermis/kutikulu, preko prirodnih otvora ili kroz rane. Hife gljive dolaze u kontakt sa domaćinom, a putem apsorpcije prodiru u ćelije i crpe hranljive materije. Tom prilikom gljiva oslobađa enzime koji razaraju biljnu ćeliju i nastavlja da raste unutar izumrlog tkiva (Ivanović, 2004). Spoljni uslovi u velikoj meri utiču na razvoj bolesti. Ekonomske štete su najveće u toplijim regionima, na nestrukturnim i zabarenim zemljištima. Razvoj oboljenja je pospešen visokom vlažnošću vazduha, ekstremnim temperaturama i zaslanjenošću zemljišta. Širenje zaraze u polju moguće je i kišnim kapima.

Micelija gljive je u početku bela a zatim postaje mrka do tamnomrka. Sklerocije često nastaju u vidu krugova oko mesta infekcije kao i na hranljivoj podlozi i predstavljaju osnovne strukture za održavanje ovog patogena. Formiranje sklerocija umnogome zavisi od spoljašnjih uslova. Na višim temperaturama formiranje sklerocija je usporeno, dok visoka vlažnosti zemljišta, a naročito slaba dreniranaža, pospešuje njihovo formiranje. Na KDA podlozi gljiva se razvija pri temperaturi 8-36 °C, sa optimumom pri 25-30 °C. Sklerocije klijaju pri temperaturi 8-30 °C, a optimum je pri 23 °C (Ivanović, 2004). Pored sklerocija, patogen se u prirodi održava i u vidu micelije u biljnim ostacima ili u semenu.

### 2.1.5. *Pythium aphanidermatum*

*Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitz je jedan od poznatijih predstavnika roda *Pythium* koji ima preko 100 vrsta. Vrste ovog roda su rasprostranjene širom sveta, pričinjavaju značajne štete i parazitiraju veliki broj biljaka. Javljaju se na mladim biljkama gotovo svih povrtnarskih i ratarskih biljaka, cveću, travama, ali i klijancima nekih vrsta voćaka. Posebnu osetljivost ispoljavaju povrtnarske biljke kao što su paradajz, paprika, krastavac, kupus, salata, tikve, mrkva, grašak i mnoge druge (Ivanović, 2004).

Pseudogljive iz roda *Pythium* su fakultativni paraziti i obično žive u zemljištu bogatom organskim materijama. Najosetljivije su mlade biljke u fazi klijanja i nicanja, dok su za starije biljke ove pseudogljive praktično bezopasne. Štete su utoliko veće ukoliko spoljni činiooci i loš kvalitet semena produžavaju vreme od setve do nicanja biljaka (Mijatović i sar., 2007). Češćoj pojavi oboljenja doprinose teška i slabo drenirana zemljišta, visoka vlažnost vazduha, kao i slabo provetravanje i niske temperature nakon setve (Mijatović i sar., 2007). Obično poljsko zemljište uvek sadrži nisku populaciju vrsta roda *Pythium*. Do povećanja inokulacionog potencijala do nivoa štetnosti dolazi samo u kombinaciji povoljnih uslova, kao što su: intenzivna agrotehnika, monokultura, preobilno unošenje organskih materija (npr. leguminoza). *P. aphanidermatum* se nastanjuje na svežoj organskoj materiji i obilno formira inokulum u prvih 24-48 časova. U konkurenciji sa gljivama i bakterijama biva redovno potisnut iz supstrata, u kome ostaje samo izvestan broj njegovih oospora. Nivo inokuluma naglo opada ako se gaje biljke koje nisu osetljive na ovog parazita, kao što su žita (Ivanović, 2004).

Ispoljavanje simptoma zavisi od starosti zaražene biljke. Inficirano seme ne klija, truli i raspada se, ali se u našim uslovima to retko događa. Tkivo klijanaca je jako osetljivo i na njemu se u početku javljaju vodenaste pege, koje se brzo povećavaju i cela biljka propada (Mijatović sar., 2007). Na izniklim biljkama oboleva koren ili stablo u prizemnom delu, koji dobijaju mrku boju i nekrotiraju. Zaraženo tkivo postaje vodenasto i obezbojeno, a ćelije brzo izumiru. Obolele biljke poležu jer je zahvaćeni deo stabla tanji od zdravog dela. Javlja se i beličasta micelija, koja se širi i po površini zemljišta u vidu paučinaste prevlake. Ova površinska micelija predstavlja samo nastavak unutrašnje micelije, koja se nalazi u zaraženom tkivu. Polegle biljke brzo uginjavaju, a u uslovima visoke vlažnosti i temperature gotovo se istope, odakle i naziv topljenje rasada (Ivanović, 2004).

Propadanje rasada u toplim lejama ili u usevu je karakteristično i javlja se u obliku koncentričnih krugova, pri čemu nastaju gola ili ćelava mesta. Starije biljke po pravilu ređe oboljevaju. Na njima se mogu uočiti pege na stablu, zaostajanje u porastu i uvelost. Slične

simptome mogu uzrokovati i *Phytophthora* spp., kao i neke druge vrste gljiva – *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. (Ivanović, 2004).

*P. aphanidermatum* ima belu, tanku, dobro razgranatu miceliju koja izuzetno brzo raste. Micelija formira sporangije koje kličaju na dva načina: direktno dajući jedan ili više začetak hifa ili dajući kratku hifu na čijem se vrhu formira vezikula. U prirodi se održava u vidu oospora koje svoju vitalnost u zemljištu zadržavaju godinama. Kličanje oospora je stimulirano materijama iz korena, semena ili organskim materijama iz zemljišta. U povoljnim uslovima vlažnosti i temperature, oospore kličaju dajući sporangije u kojima se obrazuju zoospore ili kličaju direktno u začetak hife. Oslobođene zoospore iz sporangija kreću se pomoću flagela u vodi i ostvaruju zarazu kličanaca (Mijatović i sar., 2007). Interćelijska micelija svojim fermentnim sistemom destruktivno deluje na biljne ćelije, pa dolazi do brzog uginjavanja celih biljaka. Micelija nakon ishrane obrazuje konidije koje mogu u retkim slučajevima izazvati sekundarne infekcije. Posle fiziološkog dozrevanja dolazi do polnog procesa i obrazovanja oospora, kojim se obnavlja ciklus razvika (Ivanović, 2004).

## 2.2. Mogućnosti suzbijanja patogena iz zemljišta

### 2.2.1. Preventivne mere zaštite

Preventivne mere zaštite paprike od patogena iz zemljišta obuhvataju primenu plodoreda, đubrenje zelenišnim i organskim đubrivima, uništavanje zaraženih biljnih ostataka i biljaka koje su potencijalni domaćini patogena, sterilizaciju zemljišta vodenom parom, solarizaciju zemljišta, korišćenje kalemljenih biljaka, zdravog semena i suzbijanje korenovih nematoda (Ben-Yephet i sar., 1988; Davis i sar., 2000; Lazarovits i sar., 2000; Fravel i Larkin, 2000; Koike i sar., 2000; Lopez-Escudero i Blanco-Lopez, 2000).

Plodored predstavlja jednu od najvažnijih agrotehničkih mera čiji je cilj smanjenje količine inokuluma u zemljištu. Međutim, primena plodoreda ima ograničen uticaj na brojnost patogena iz zemljišta zbog perzistentnosti njihovih tvorevina za preživljavanje, ali i zbog sposobnosti da se razvijaju na različitim gajenim i korovskim vrstama (Pernezny, 2003). Za usev paprike preporučuje se plodored od najmanje tri do četiri godine za *Verticillium* spp. Za vrste roda *Fusarium* preporučuje se rotacija useva u trajanju od 5-7 godina koja značajno utiče na smanjenje količine inokuluma iako ne eliminiše patogena u potpunosti. Rotacija useva je važna agrotehnička mera koja se najviše primenjuje i pri suzbijanju *Sclerotinia* spp. Prema istraživanjima Dueck (1977) i Williams i Stelfox (1980) utvrđeno je da su sklerocije u zemljištu vitalne najmanje tri godine u odsustvu domaćina. Pomenuti istraživači ukazuju da

je rotacija useva efikasna samo u prevenciji širenja već postojećih sklerocija u zemljištu, a da nema efekta na njihovo smanjenje. Dokazano je i da nivo inokuluma *Pythium* spp. naglo opada ako se gaje biljke koje nisu osjetljive na ovog parazita, kao što su žita (Ivanović, 2004).

Poznato je da upotreba biljnih ostataka kao zelenišnog đubriva usporava širenje patogena u zemljištu. Sekundarni metaboliti viših biljaka, takođe imaju veliki potencijal za suzbijanje ovih patogena (Chew, 1988). Stvaranje ovih jedinjenja odvija se unutar biljnih tkiva, a potom se oslobađaju u zemljište gde podležu mikrobiološkoj transformaciji. Glukozinolati su organska jedinjenja koja su prisutna u različitim koncentracijama u mnogim dikotiledonim biljkama. Njihovom enzimatskom hidrolizom oslobađaju se sumporna jedinjenja koja poseduju antimikrobnu aktivnost. Ova jedinjenja su u značajnoj meri prisutna kod biljaka iz familije *Brassicaceae* (Sang i sar., 1984; Mayton i sar., 1996). Shetty i sar. (1999) utvrdili su da ostaci brokolija deluju inhibitorno na razvoj fitopatogenih gljiva iz zemljišta. Utvrdili su da se rotacijom brokolija i briselskog kupusa u zasadu jagode značajno smanjuje količina inokuluma *V. dahliae*. Davis i sar. (1996) ističu da sudanska trava (*Sorghum vulgare* Pers var. *sudanense* (Piper) Hitchc. cv HS33), primenjena sama ili u kombinaciji sa ječmom kao zelenišno đubrivo, smanjuje količinu inokuluma *V. dahliae* u zemljištu i za 52 %. Međutim, upotreba organskih đubriva često nije dovoljno efikasna ukoliko se ne kombinuje sa drugim merama, kao što su zagrevanje i solarizacija zemljišta (Gamliel i Katan, 2012; Klein i sar., 2011). Oslobađanje isparljivih antimikrobnih jedinjenja značajno se povećava zagrevanjem zemljišta u koje je prethodno inkorporirano organsko đubrivo. Neke od komponenti nisu čak ni detektovane u zemljištu koje nije zagevano (Mayton i sar., 1996; Hansen i Keinath, 2013). Hansen i Keinath (2013) potvrdili su da inkorporacijom zelenišnog đubriva kupusnjača ne dolazi do supresije *R. solani* i *P. aphanidermatum* u usevu paprike ukoliko se ne koriste malč folije. Klein i sar. (2011) ispitali su uticaj biljnih ostataka za suzbijanje *F. oxysporum* u kombinaciji sa zagrevanjem zemljišta. Inkorporacijom biljnih delova estragona, dvoredca, žalfije i ruzmarina u zemljište prekriveno malč folijama u poljskim uslovima postignuta je efikasnost od 95-100 %.

Pored zelenišnog đubriva, primena stajnjaka, komposta, ribljeg i koštanog brašna i sojine sačme u značajnoj meri smanjuje prisustvo patogena u zemljištu (Lazarovits i sar., 2000). Njihovom degradacijom u zemljištu oslobađa se amonijak koji je toksičan za mnoge patogene organizme i njihove posebne tvorevine za preživljavanje (Gamliel i sar., 2000). Istraživanja Lazarovits i sar. (1999) pokazala su da se korišćenjem sojinog i mesno-koštanog brašna smanjuje razvoj „verticilioznog uvenuća” u usevu krompira. Takođe, primena organskih đubriva sa visokim sadržajem azota je vrlo značajna u sprečavanju razvoja



patogena u zemljištu. Efikasnost ovih đubriva zavisi od odnosa ugljenika i azota u zemljištu i uslova spoljne sredine. Mnogi autori utvrdili su da je oslobađanje amonijaka nakon primene azotnih đubriva delovalo letalno na mikrosklerocije patogena (Tenuta, 2001; Tenuta i Lazarovits, 2002). Debode i sar. (2005) su primenom biljnih ostataka sa visokim sadržajem lignina pokazali da se efikasno mogu suzbiti gljive iz roda *Verticillium*. Takođe, Soltani i sar. (2002) utvrdili su da je primena amonijum lignosulfata efikasna u suzbijanju prouzrokovala „verticilioznog uvenuća” krompira.

Korišćenje đubriva životinjskog porekla navodi se kao veoma efikasna mera koja doprinosi suzbijanju patogena u zemljištu i nematoda (Hoitink i Fahy, 1986; Rodriguez-Kabana, 1986; Conn i Lazarovits, 1999; Conn i Lazarovits, 2000; Melero-Vara i sar., 2011). Utvrđeno je da se primenom tečnog svinjskog đubriva utiče na smanjenje zastupljenosti mikrosklerocija *V. dahliae* u zemljištu (Conn i Lazarovits, 1999; Conn i Lazarovits, 2000). Razlaganjem ovog đubriva oslobađa se amonijak koji negativno utiče na razvoj fitopatogenih gljiva i pseudogljiva (Rodriguez-Kabana, 1986). Živinsko đubrivo se odlikuje visokim sadržajem azota, ali i drugih elemenata (kalijum i fosfor). Melero-Vara i sar. (2011) ispitivali su uticaj ovog đubriva na razvoj „fuzarioznog uvenuća” karanfila uz primenu VIF folija (Very Impermeable Film). Ispitivanja su potvrdila da ovakvim načinom primene dolazi do smanjenja intenziteta oboljenja 92,4 %, a takođe utvrđen je i pozitivan efekat na prinos i kvalitet biljaka.

Sterilizacija zemljišta vodenom parom i solarizacija su preventivne mere koje se izvode u cilju smanjenja infektivnog potencijala patogena. Međutim, nedostatak ovog postupka je to što se koristi na malom prostoru, visoka cena investicija u objekte i energente kao i brza rekolonizacija dezinfikovanog zemljišta patogenim organizmima usled nedostatka konkurencije. Dobro urađena sterilizacija zemljišta je od izuzetne važnosti, jer čak i mala količina zaostalog inokuluma izaziva značajnu zarazu (Ivanović i Ivanović, 2007).

Solarizaciju su uveli Katan i sar. 1987. godine kao novu tehniku za uništavanje mikrosklerocija korišćenjem sunčeve toplotne energije. Ova metoda deluje negativno na razvoj velikog broja patogena, nematoda i semena korovskih biljaka. Brojnim istraživanjima potvrđeno je da se solarizacijom uspešno smanjuje količina inokuluma u zemljištu na kome su prethodno gajene biljke familije *Solanaceae*: paradajz, paprika i krompir (Katan, 1980; Stapleton i DeVay, 1986; Tjamos i sar., 1991). Način primene je jednostavan i sastoji se u postavljanju plastičnih, providnih polietilenskih folija, debljine 50 µm, na površinu zemljišta u trajanju od minimum osam nedelja. Solarizacija se najčešće primenjuje i izvodi u zemljama toplijeg klimata tokom jula i avgusta kada je najveća količina insolacije i kada je zbog niže

cene povrća na tržištu ekonomski isplativo praviti dvomesečnu pauzu u proizvodnji. Lopez-Escudero i Blanco-Lopez (2001) su u dvogodišnjim ispitivanjima u mladim zasadima masline, utvrdili da je količina mikrosklerocija po gramu zemljišta bila značajno manja u tretmanu gde je primenjena solarizacija (0,2-0,8 mikrosklerocija/g zemljišta) u odnosu na kontrolu (4,2-13,3 mikrosklerocija/g zemljišta). Isti istraživači, međutim, ističu da je efikasnost solarizacije uslovljena faktorima spoljašnje sredine i osobinama zemljišta, kao što su njegove fizičke osobine i vlažnost. Ukoliko je zemljište lakšeg mehaničkog sastava utoliko je efikasnost veća i obrnuto. U našoj zemlji se ne vrši solarizacija, te nema eksperimentalnih podataka, a nije ni izvesno koliko bi ovaj proces bio efikasan na našim prostorima (Ivanović i Ivanović, 2007). Solarizacija predstavlja jedan od načina suzbijanja „fuzarioznog uvenuća”, a Tamietti i Valentino (2006) utvrdili su da na dubini od 25 cm dolazi do smanjenja inokuluma od 57,8-96 %, a na dubini od 5 cm 97-99,7 %. Ovom metodom značajno se redukuje broj sklerocija *S. sclerotiorum*, kao i mogućnost preživelih sklerocija da formiraju apotecije. Najviša efikasnost se postiže na dubini zemljišta do 5 cm, ali značajni efekti su uočeni i na dubinama od 10-15 cm. Tokom solarizacije dolazi do degradacije sklerocija kao posledica subletalnih temperatura koje tom prilikom nastaju. Do uništenja sklerocija dolazi pri temperaturi od 45 °C nakon 3-4 h ili pri 35-40 °C posle 10-14 h (Phillips, 1990).

Tolerantne sorte paprike na patogene iz zemljišta do sada nisu selekcionisane. Međutim, još pedesetih godina prošlog veka u proizvodnji paprike se počelo sa kalemljenjem osetljivih sorti paprike na otporne podloge. U našoj zemlji kalemljenje paprike se još uvek ne koristi u komercijalne svrhe. Kalemljene biljke paprike imaju brži porast korenovog sistema, bolje usvajaju hranljive supstance, poseduju veću otpornost i visoku tolerantnost na patogene iz zemljišta. Predviđa se da će kalemljenje ubrzo postati sastavni deo tehnologije proizvodnje u savremenim sistemima gajenja paprike (Mišković, 2006).

Upotreba zdravog, sertifikovanog semena je obavezna mera koja smanjuje mogućnost pojave patogena na obradivim površinama na kojima prethodno nije bio prisutan (Mijatović i sar., 2007). Uništavanje zaraženih biljnih delova, takođe predstavlja veoma važnu meru za suzbijanje patogena iz zemljišta, jer je to jedan od načina njihovog prenošenja (Ivanović, 2004). Takođe, sve mere koje za posledicu imaju smanjenje inokuluma efektivno doprinose suzbijanju oboljenja. Prisustvo korova utiče na gustinu inokuluma, a i mnoge korovske biljke su domaćini gljivama i pseudogljivama iz zemljišta, pa je neophodno njihovo suzbijanje. Da bi se sprečila pojava i širenje oboljenja, naročito u zaštićenom prostoru neophodna je upotreba čiste opreme i alata (Katan, 2000).

Korenove nematode *Pratylenchus penetrans* i *Meloidogyne* spp. svojom aktivnošću u velikoj meri doprinose širenju patogena i povećavanju intenziteta oboljenja. Sterilizacija zemljišta i primena organskih đubriva sa visokim sadržajem azota i amonijaka, kao i solarizacija zemljišta značajno utiču na smanjenje brojnosti nematoda (Katan, 1987; Lazarovits i sar., 2000).

### 2.2.2. Biološke mere suzbijanja

Sve su intenzivnija proučavanja mogućnosti primene alternativnih metoda u suzbijanju prouzrokovala biljnih bolesti. Značajna istraživanja usmerena u pravcu biološkog suzbijanja uglavnom se zasnivaju na primeni antagonističkih sojeva bakterija i gljiva.

Za zaštitu useva od vrsta roda *Verticillium* kao agensi biološkog suzbijanja koriste se bakterije iz rodova *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* i gljive – *Glomus* spp., *Trichoderma viridae* i *Talaromyces flavus* (Nejad i Johnson, 2000; Tjamos, 2000; Alström, 2001; Garmendia i sar., 2004; Mercado-Blanco i sar., 2004).

Biološko suzbijanje *F. oxysporum* uglavnom se zasniva na primeni antagonističkih sojeva bakterija i gljiva iz rodova *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Glomus*, *Trichoderma* (Cotxarrera i sar., 2002; Srivastava i sar., 2010; Hariprasad i sar., 2011).

Za suzbijanje *S. sclerotiorum* koriste se: *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma viride*, *T. koningii*, *T. sclerotivorum*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. amylolique faciens*, *Pseudomonas chlororaphies*, *Staphylococcus* spp., *Penicillium citrinum*. I *F. oxysporum* poznat je kao agens za biološko suzbijanje *S. sclerotiorum* u usevu soje (Rodriguez i sar., 2006). Mnogi autori navode da je upotreba *C. minitans* veoma efikasna u sprečavanju klijanja sklerocija *S. sclerotiorum*, a na tržištu Zapadne Evrope prisutna su i dva komercijalna preparata na bazi ove gljive (Whipps i Gerlagh, 1992; Huang i sar., 2008).

Za zaštitu useva od *Pythium* spp. koriste se: *Trichoderma* spp., *Penicillium oxalicum*, *Gliocladium virens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. chlororaphis* (Sivan i sar., 1984; Loper, 1987).

Zona izduživanja i vrh korena predstavljaju primarna mesta prodiranja patogena iz zemljišta. Za sprečavanje prodiranja parazita i ostvarivanje infekcije neophodno je da antagonistički mikroorganizmi onemoguće razvoj tvorevina za preživljavanje patogena iz zemljišta i da veoma brzo koloniziraju rizosferu i vrhove korena. Na ovaj način, antagonisti stvaraju zaštitnu zonu oko korena koja sprečava patogena da ostvari zarazu. Nakon uginuća zaraženih biljaka patogeni nastavljaju svoj razvoj i dolazi do značajnog povećanja i kasnijeg

lakog širenja inokuluma u zemljištu. Da bi biološki agens mogao da inhibira formiranje tvorevina za preživljavanje potrebno je da ima sposobnost da se razvija i razmnožava na i u inficiranim biljnim ostacima. Takođe, neophodno je da nakon primene može da opstane duži vremenski period na tretiranim zaraženim biljnim ostacima (Katan, 2000).

Mercado-Blanco i sar. (2004) utvrdili su da *P. fluorescens* značajno smanjuje intenzitet „verticilioznog uvenuća” u rasadnicima masline (31-82 %). Zaključili su da korišćenje odabranih, selekcionisanih sojeva *P. fluorescens* može imati značajnu ulogu u biološkim merama zaštite masline od *V. dahliae*. Prema najnovijim istraživanjima potvrđeno je da su vrste ovog roda efikasne i u suzbijanju oboljenja na pšenici izazvanim vrstama iz rodova *Rhizoctonia* i *Pythium*. Neki od testiranih sojeva značajno su uticali na smanjenje stepena oboljenja, a tretirane biljke imale su snažnije razvijen koren, kao i veće mase u odnosu na biljke iz netretirane kontrolne varijante (Mavrodi i sar., 2012).

Preliminarna istraživanja Mol-a i van Riesen-a (1995) dokazala su da u prisustvu antagonističke gljive *Talaromyces* dolazi do značajnog smanjenja broja vitalnih mikrosklerocija (15-40 %) u zoni rasta korena plavog patlidžana.

*T. virens* je još jedna od vrsta roda *Trichoderma* za koju je dokazano da ispoljava snažan inhibitorni efekat na vrste roda *Rhizoctonia*, *Pythium* i *Fusarium* (Copping i Menn, 2000). Baličević i sar. (2008) potvrdili su efikasnost dva standardna fungicida (propamokarb-hidrohlorida i mankozeba) i biološkog preparata na bazi *T. harzianum* u suzbijanju *Pythium debaryanum* i *R. solani* u usevu zelene salate (rasad) u uslovima plastenika. Korišćenjem biološkog preparata utvrđen je statistički značajno veći broj zdravih biljaka u odnosu na standardne preparate.

Osim navedenih antagonističkih mikroorganizama, poslednjih godina intenzivnije se proučava i upotreba mikopatogene gljive *Pythium oligandrum* u suzbijanju prouzrokovača „zelenog uvenuća“ paprike (Al-Rawahi i Hancock, 1998; Rekanović i sar., 2007). Osim fungicidnog i fungistatičnog efekta na fitopatogene gljive, *P. oligandrum* značajno utiče na rast biljaka i na aktiviranje njihovih odbrambenih mehanizama (Laing i Deacon, 1991).

Brojna istraživanja utvrdila su da je *Gliocladium catenulatum* vrlo efikasan bioagens koji deluje na razvoj velikog broja biljnih patogena (McQuilken i sar., 2003). Huang (1978) je pokazao da ova gljiva uništava ćelije hifa *S. sclerotiorum* i *Fusarium* spp., dok je druga grupa istraživača utvrdila da negativno utiče na razmnožavanje vrsta roda *Pythium* i *Fusarium* (Powell i mFaull, 1989).

Pojedini autori navode da su bakterije u odnosu na gljive mnogo pogodnije za biološko suzbijanje vrsta roda *Pythium* (Lumseden, 1981; Hadar i sar., 1992). Tako su Chatterton i sar. (2004) utvrdili mogućnost upotrebe bakterije *Pseudomonas chlororaphis* za suzbijanje *P. aphanidermatum* i *Pythium dissotocum* u usevu paprike. Dokazano je da *Ps. chlororaphis* uspešno suzbija prouzrokovaoče poleganja rasada. Međutim, u radu se ističe da je veoma bitno vreme primene bakterijske suspenzije. Najveću efikasnost *Ps. chlororaphis* je ispoljio u tretmanu u kome je primenjen tri dana pre inokulacije.

Novija istraživanja usmerena su ka ispitivanju kombinovane upotrebe više različitih bioloških agenasa istovremeno (Cotxarrera i sar., 2002; Brewer i Larkin, 2005; Srivastava i sar., 2010). Tako je dokazano da se kombinovanom primenom vrsta *Pseudomonas* sp., *T. harzianum* i *G. intraradices* postiže značajno smanjenje (74 %) „fuzarioznog uvenuća” na paradajzu u stakleniku i u polju (67 %), a prinos se povećava za 20 % (Cotxarrera i sar., 2002).

S obzirom da se brzo razmnožavaju i relativno lako formulišu, bakterije se smatraju najpodesnijim mikroorganizmima za biološku borbu. Prednost se daje sporogenim vrstama zbog njihove mogućnosti dugog održavanja u prirodi (Dababat, 2005).

Vrste roda *Bacillus* formiraju spore koje ostaju metabolički aktivne i u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine (Rodgers, 1989). Najproučavanija vrsta bakterije koja se koristi za biološku borbu je *B. subtilis* (Asaka i Shoda, 1996; Brannen i Kenney, 1997; Krebs i sar., 1998; Lin i sar., 2001; Pinchuk i sar., 2002). Budući da formira spore, smatra se da su preparati na bazi ove bakterije stabilni. Prvi komercijalni preparat na bazi *B. subtilis* namenjen za tretiranje semena proizveden je 1994. godine. Ovi endofitni mikroorganizmi su sposobni da koloniziraju rizosferu, prodru, prežive i razmnože se unutar vršnih delova korena. Takođe, produkuju katalitičke enzime (proteaze, hitinaze i glukanaze) i peptidne antibiotike (bacilizin, fengimicin, dificidin, bacitracin, bacilin, balilomicin B i iturin) koji su poznati kao antifungalne i antibakterijske supstance (McSpadden Gardener, 2004; Stein, 2005). Produkti metabolizma, lipopeptidi, deluju na različite komponente ćelijskog zida, sprečavaju prijanjanje patogena na biljne organe, a enzim subtilin ometa razvoj patogena (Klokočar-Šmit, 2003). Takođe, istraživanja potvrđuju da *B. subtilis* vrši kolonizaciju korenovog sistema biljaka i na njemu formira film koji sprečava naseljavanje patogena (Morikawa i sar., 2006). Pored toga, utvrđeno je da ova bakterija ispoljava pozitivan uticaj na rast i razvoj biljaka. Pojedini sojevi vrste *B. subtilis* oslobađaju isparljivu supstancu 2,3-butandiol koja stimulatивно deluje na razvoj biljnih tkiva (Ryu i sar., 2003).

Mogućnost praktične primene *B. subtilis* u zaštiti gajenih biljaka od patogena iz zemljišta utvrdili su brojni istraživači. Svojom aktivnošću *B. subtilis* indukuje stvaranje morfoloških barijera i biohemijskih mehanizama odbrane u biljkama i tako indirektno inhibira rast i razvoj parazita. Takođe, utiče i na bolje opšte zdravstveno stanje useva, povećanje otpornosti biljaka i prinosa. Biljke plavog patlidžana inokulisane izolatima *Verticillium* spp., i potom tretirane odabranim sojevima *B. subtilis* imale su veći prinos za 25 % u odnosu na netretiranu kontrolu, a intenzitet zaraze bio je manji za 20-80 % (Tjamos i sar., 2000). Jedan od razloga povećanja prinosa tretiranih biljaka preparatima na bazi *B. subtilis* je i pojačana lignifikacija ćelijskog zida biljnih ćelija što za posledicu ima otežano prodiranje patogena u sudovna tkiva. Dva nezavisna istraživanja pokazala su da je indukovana otpornost krastavca direktno povezana sa pojačanom lignifikacijom membrana korena (Dean i Kuc, 1986; Boller i Metraux, 1988).

Najnovija istraživanja potvrđuju da preparati na bazi bakterije *B. subtilis* u kombinaciji sa svinjskim stajnjakom smanjuju intenzitet pojave „fuzarioznog uvenuća“ na pamuku, naročito kada se primenjuju u rasadu čime se postiže efikasnost od 88 % (Li i sar., 2013). Ista grupa autora utvrdila je uticaj *B. subtilis* na razvoj „fuzarioznog uvenuća“ krastavca. Soj *B. subtilis* BO68150 ispoljio je visok potencijal u suzbijanju *Fusarium* spp., na mladim biljkama krastavca sa efikasnošću od 51 % (Li i sar., 2012). U usevu paprike primenom ovog soja *B. subtilis* intenzitet „fuzarioznog uvenuća“ smanjen je za 12,5-56,9 %. Takođe, utvrđeno je da ispitivani soj osim što utiče na smanjenje brojnosti populacije *F. oxysporum*, stimulatивно deluje na porast biljaka, prinos i masu plodova (Yu i sar., 2011).

Grupa kineskih istraživača potvrdila je da *B. subtilis* (soj NJ-18) daje zadovoljavajuće rezultate u suzbijanju oboljenja koje prouzrokuje *S. sclerotiorum* na pirinču. Uticaj ovog soja na razvoj patogena potvrđen je kako u laboratorijskim, tako i u poljskim uslovima. U laboratorijskim uslovima pomenuti soj je inhibirao porast micelije *S. sclerotiorum* i *R. solani*, a u ogledima u polju najbolji rezultati postignuti su kombinovanom primenom soja NJ-18 sa preparatom na bazi kresoksim-metila (Yang i sar., 2009).

Brewer i Larkin (2005) ispitivali su efikasnost 28 mikroorganizama iz različitih rodova u cilju suzbijanja *R. solani* u usevu krompira. Utvrdili su da je tretman gde je primenjivan *B. subtilis* ispoljio visoku efikasnost u poređenju sa tretmanom u kome su primenjivani sintetski fungicidi. Pored *B. subtilis*, visoku efikasnost u istom ogledu ispoljili su i *Rhizoctonia zea* i *Stibella aciculosa*. Pomenuti istraživači potvrdili su i uticaj kombinovane primene antagonističkih sojeva *B. subtilis* i *T. virens* (efikasnost 46,7 %) u

suzbijanju *R. solani*. Utvrdili su da se na ovaj način postiže veća efikasnost u suzbijanju *R. solani* nego kada se primenjuju zasebno (*B. subtilis* – 30,9 %; *T. virens* – od 12,4 do 39 %).

Berger i sar. (1996) ispitivali su uticaj *B. subtilis* (soj Cot1) na prouzrokovača poleganja rasada *Pythium* spp. tri vrste perena (*Aster hybrida*, *Daphne blagayana* i *Photinia fraseri*). Dokazano je da soj *B. subtilis* ispoljava dobru efikasnost u zaštićenom prostoru u uslovima povećane vlažnosti vazduha, ali da je ona uslovljena gustom bakterijske suspenzije i količinom inokuluma patogena. Najbolji rezultati su postignuti pri umerenoj količini inokuluma ( $\leq 10^2$  oospora/g zemljišta) i u takvim uslovima pomenuti istraživači navode da je postignuta efikasnost slična onoj gde je primenjivan standardni fungicid metalaksil (> 90 %). Međutim, suzbijanje je bilo najefikasnije u uslovima gajenja u kojima je bilo moguće održati gustinu od  $10^5$ - $10^6$  spora *B. subtilis* po gramu korena (Berger i sar., 1996). Grosch i sar. (1999) utvrdili su da nijedan od testiranih sojeva *B. subtilis* nije bio uspešan u suzbijanju *P. aphanidermatum* na biljkama krastavca i paradajza, iako su neki ispoljili visok inhibitorni efekat *in vitro*. Dokazali su i da postoji razlika u efikasnosti bakterije u laboratorijskim uslovima i *in vivo* ogledima. Kod bakterizovanih biljaka došlo je do povećanja prinosa u varijantama u kojima nije prisutan patogen, a u varijantama u kojima je patogen prisutan zabeležena je povećana tolerantnost biljaka. Još jedno istraživanje koje je dokazalo da ne postoji korelacija između rezultata dobijenih u laboratorijskim uslovima i *in vivo* je ispitivanje Schmiedeknecht i sar. (2001). Posmatrana je antifungalna aktivnost dva soja *B. subtilis* na izolate *F. oxysporum* i *S. sclerotiorum* sa kukuruza i suncokreta i njihov uticaj na porast biljaka. Utvrđeno je da antifungalni efekat u uslovima *in vitro* zavisi od sastava i kiselosti podloge i temperature na kojoj se podloge inkubiraju. Aktivnost bakterije povećavala se sa porastom temperature, ali samo u slučaju kada je primenjivana na izolate *S. sclerotiorum*. Najviša aktivnost sojeva *B. subtilis* zabeležena je na blago kiselim podlogama (pH 5,7). Efikasnost sojeva ispitivana je i u poljskim uslovima, a rezultati su pokazali da soj FZB24 *B. subtilis* utiče značajno na smanjenje pojave *S. sclerotiorum* u usevu suncokreta. Između tretmana sa pomenutim sojem i tirama nije postojala statistički značajna razlika. Procenat oboljenja na suncokretu umanjen je za 62 %, a u tretmanu tiramom 62,5-72,4 %. U ogledu izvedenom u usevu kukuruza odabrani sojevi nisu ispoljili značajnu efikasnost. Nijedan od ispitivanih sojeva nije imao statistički značajan uticaj na parametre porasta biljaka iako je potvrđeno da u određenom stepenu pospešuju klijanje, nicanje i rast biljka. Kod suncokreta je zabeleženo i povećanje prečnika glave, stablo je bilo snažnije razvijeno i izduženije, a prinos kukuruza je povećan za 16 %.

U našoj zemlji bio je registrovan preparat F-stop koji u sebi sadrži *B. subtilis*, soj ST 1/III . Efekat ovog preparata u zaštiti i bioregulaciji useva paprike i paradajza određivan je preko nekoliko parametara: visine biljaka, pojave prvog cveta, krupnoće ploda i prinosa. Krupnoća ploda i prinos paprike nisu povećani pri primeni preparata u odnosu na kontrolnu varijantu, ali jeste u odnosu na tretman propamokarb-hidrohloridom. Pri primeni u paradajzu nije bilo značajnih razlika u visini biljaka i pojavi prvog cveta (Klokočar-Šmit i sar., 2003).

Pojedine vrste bakterija stvaraju siderofore – belančevine male molekulske mase koje se vezuju za jone gvožđa iz spoljašnje sredine i prevode ih u biljkama dostupne oblike. Ove belančevine igraju važnu ulogu u kompeticiji između mikroorganizama, ali i stimulatивно deluju na rast i razvoj biljaka (Omar i Abd-Alla, 1998; Yu i sar., 2011).

Potrebno je naglasiti da brojni faktori utiču na ispoljavanje biološkog dejstva antagonističkih mikroorganizama (uslovi spoljašnje sredine i interakcija između biljke domaćina, patogena i korisnih mikroorganizama) (Raaijmaker i sar., 1995). Istraživanjima je potvrđeno da veličina bakterijske populacije varira od korena do korena, te se smatra da nepotpuna kolonizacija značajno utiče na ispoljavanje biološke efikasnosti (Bull i sar., 1991; Weller i Thomashow, 1994). Takođe, podaci dobijeni u brojnim istraživanjima potvrđuju da postoji značajna razlika u delovanju antagonista u laboratorijskim ispitivanjima od one u *in vivo* uslovima. Razlika je uslovljena količinom metabolita koju stvaraju mikroorganizmi. Metaboliti su supstance koje su najvažnije za suzbijanje prouzrokovača oboljenja. U poljskim uslovima njihova produkcija je znatno niža, jer zavisi od brojnih fizičkih i hemijskih procesa koji se odvijaju u zemljištu (Engelkes i sar., 1997). Dokazano je da azot deluje podsticajno na povećanje mikrobiološke aktivnosti antagonističkih mikroorganizama što se pozitivno odražava kako na prinos gajenih biljaka, tako i na njihovu zaštitu od patogena. Pored navedenih, postoje i drugi faktori koji utiču na efikasnost delovanja korisnih mikroorganizama, kao što su: temperatura i pH vrednost zemljišta, sadržaj organske materije u zemljištu i primena organskih đubriva (Duffy i Défago, 1997).

Pored primene mikroorganizama u alternativne mere suzbijanja protiv patogena iz zemljišta ubraja se i primena etarskih ulja.

Etarska ulja su specifični produkti biljnog metabolizma, najčešće tečnog agregatnog stanja. Predstavljaju složene smeše različitih isparljivih mono-, seskviterpena i fenilpropanskih jedinjenja (Dorman i Deans, 2000). Pojedina ulja sadrže preko 60 različitih supstanci među kojima su najviše prisutni terpeni, alkoholi, fenoli, kiseline, ugljovodonici, estri, ketoni i laktoni. Najzastupljenije supstance su terpeni (90 %) iz kojih se izdvaja čitav niz biološki aktivnih supstanci kao što su timol, karvakol, eugenol, geraniol, linalol itd. Za



antimikrobno delovanje etarskih ulja odgovorna je njihova lipofilnost, slobodna -OH grupa i slobodne nezasićene strukture cikloheksanskog prstena. Zbog svoje lipofilnosti i rastvorljivosti u vodi deluju na funkcionalne strukture ćelijskih membrana i enzime, što dovodi do narušavanja metabolizma i normalnog funkcionisanja ćelije (Bakkali i sar., 2008).

Brojna istraživanja ukazuju da pare etarskih ulja origana, timijana, majorana, lavande, ruzmarina, žalfije, nane, lavande i bosiljka inhibiraju porast fitopatogenih gljiva (Daferera i sar., 2003; Tanović i sar., 2004; Karamanoli i sar., 2002; 2005). Ulja kima, anisa i eukaliptusa takođe imaju dobro fumigantno delovanje (Isman, 2000). Inhibitorna aktivnost zavisi kako od vrste etarskog ulja tako i od vrste patogena na koje ulje deluje (Alvarez-Castellanos i sar., 2001; Cimanga i sar., 2002). Utvrđeno je da etarsko ulje timijana fungicidno deluje na nekoliko različitih vrsta fitopatogenih gljiva: *Botrytis cinerea* (Wilson i sar., 1997; Daferera i sar., 2003; Tanović i sar., 2005), *Colletotrichum lindemuthianum*, kao i na gljive iz zemljišta iz rodova *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* i *Verticillium* (Zambonelli i sar., 1996; Tanović i sar., 2004; 2007; Duduk i sar., 2010). Velluti i sar. (2003) utvrdili su da etarska ulja cimeta i origana snažno inhibiraju porast micelije *F. proliferatum*. Etarska ulja nane, bosiljka, ruzmarina, timijana i čajnog drveta u koncentracijama 0,04-0,65 µl/ml delimično ili potpuno inhibiraju porast micelije *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi* i *Verticillium* sp. (Tanović i sar., 2004). Tanović i sar. (2005) ispitivali su uticaj gasovite faze etarskih ulja 18 različitih vrsta biljaka (anisa, bergamota, belog bora, bosiljka, cimeta, eukaliptusa, geranijuma, karanfilića, kleke, lavande, limuna, pitome nane, morača, pomorandže, ruzmarina, timijana, čajnog drveta i bora) na porast micelije izolata *B. cinerea in vitro*. Utvrđeno je da sva etarska ulja delimično ili potpuno inhibiraju rast micelije navedenog patogena. Najslabije inhibitorno delovanje ispoljilo je ulje pomorandže i belog bora, dok su ulja timijana, cimeta, anisa, geranijuma, nane i morača potpuno inhibirala porast micelije *B. cinerea*. Ulja bosiljka, morača, cimeta i timijana deluju fungicidno, dok su ulja geranijuma i nane samo fungistatična.

Ćosić i sar. (2010) utvrdili su da najbolje antifungalno delovanje na porast micelije 12 fitopatogenih gljiva (*Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *Diaporthe helianthi*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *Phomopsis longicolla*, *P. viticola*, *Helminthosporium sativum*, *Colletotrichum coccodes*, *Thanatephorus cucumeris*) ispoljavaju ulja timijana, lista cimeta, klinčićevca i anisa od 11 vrsta etarskih ulja koja su korišćena u ogledu (klinčićevac, ruzmarin, list cimeta, žalfija, bor, gorka narandža, nana, anis, kim, lavanda, timijan). U poređenju sa netretiranom kontrolom, ulja bora, gorke narandže i žalfije pozitivno su uticala na porast micelije *D. helianthi*, dok su ulja bora, žalfije,

nane i lavande stimulatивно delovala na porast micelije *H. sativum*. Sva etarska ulja, izuzev ulja bora i gorke narandže, pokazala su određeno inhibitorno delovanje na porast micelije skoro svih ispitivanih gljiva.

Tanović i sar. (2009) dokazali su u *in vitro* uslovima da ulja origana i geranijuma ispoljavaju najveću toksičnost na *V. fungicola* var. *fungicola* (od ukupno osam ulja – lavande, anisa, kamilice, morača, geranijuma, origana, peršuna i žalfije), sa vrednostima minimalne fungicidne koncentracije od 0,02 i 0,08 µl/ml vazduha.

Grupa turskih autora proučavala je u laboratorijskim uslovima antifungalnu aktivnost etarskog ulja pelina na ekonomski značajne folijarne patogene gljive paradajza kao na i patogene iz zemljišta: *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *Phytophthora infestans* i *V. dahliae*. Ispitivano ulje ispoljilo je najbolji efekat na izolat *S. sclerotiorum*. Minimalne fungicidne koncentracije za *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *P. infestans* i *V. dahliae* iznosile su 1,6; 2,4; 2,4; i 4,4 µg/ml vazduha, a koncentracije od 2,4 i 51,2 µg/ml su u potpunosti inhibirale klijanje spora i porast kličinih cevi ispitivanih patogena (Soylu i sar., 2005).

Hashem i sar. (2010) utvrdili su da najbolji antagonistički efekat na vrste roda *Fusarium* izolovane iz zaraženog korena kima imaju ulja kima, bosiljka i geranijama. Dokazano je da sva tri ulja i u stakleniku i u polju pored uticaja na smanjenje intenziteta oboljenja pozitivno utiču na parametre, kao što su: visina biljaka, masa svežeg korena i broj grana. U uslovima staklenika etarsko ulje kima ispoljilo je najbolji efekat na šest vrsta roda *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. dimerum*, *F. equiseti* i *F. lateritium*), a u poljskim etarsko ulje bosiljka ispoljilo je najveći uticaj na visinu biljaka kima i broj grana. U varijantama sa uljem geranijuma potvrđen je najveći broj cvetova po biljci, a na masu korena najveći uticaj imalo je ulje kima.

Soylu i sar. (2007) utvrdili su toksičnost ulja morača i origana na izolate *S. sclerotiorum*. *In vitro* proučavanja pokazala su da je ulje morača bilo toksičnije od origana i da je u potpunosti inhibiralo porast micelije ispitivanog izolata pri koncentraciji od 0,2 µl/ml vazduha. Sklerocije *S. sclerotiorum* tretirane uljem morača bile su manje vitalnosti u odnosu na varijantu primene ulja origana. Do potpune inhibicije porasta micelije došlo je pri koncentracijama od 1,5 i 2 µl/ml vazduha. Međutim, za razliku od laboratorijskih ispitivanja ulje origana je postiglo bolji efekat u *in vivo* ogledima. Takođe, potvrđeno je da oba ulja značajno utiču na veću klijavost semena paradajza, i na smanjenje intenziteta zaraze. Ulje origana u infestiranom zemljištu pri koncentraciji od 3,2 µl/ml utiče na povećanje broja zdravih sejanaca (69,8 %) u odnosu na inokulisanu kontrolu (26,6 %).

Antiseptičko delovanje ulja čajnog drveta dobro je poznato u humanoj medicini (Hammer i sar., 2000; Carson i sar., 2002). Međutim, toksični efekti ovog ulja na biljne patogene uglavnom nisu proučeni (Tanović i sar., 2004). Pod nazivom čajno drvo podrazumevaju se vrste roda *Leptospermum* i *Malaleuca*. Ekonomski najznačajnija je vrsta *M. alternifolia* (Maid. and Bet.) Cheel, australijsko čajno drvo (Southwell i sar., 2003). Lipofilni terpen terpinen-4-ol predstavlja jednu od najznačajnijih aktivnih komponenti etarskog ulja čajnog drveta. Ovaj terpenol prodire u ćelijsku membranu mikroorganizama i deluje na njenu strukturu tako što utiče na permeabilnost i metabolizam (Cox i sar., 2000). Shao i sar. (2013) su na osnovu rezultata svojih istraživanja zaključili da postoje dva načina delovanja etarskog ulja čajnog drveta: direktno delovanje na ćeliju patogena i aktiviranje odbrambenih mehanizama biljaka. Direktnom interakcijom gljive sa gasovitom fazom etarskog ulja povećava se količina vodonik peroksida što narušava normalno funkcionisanje ćelije patogena i sprečava aktivaciju odbrambenih enzima. S druge strane, u stresnim uslovima biljna ćelija stvara PR (Pathogenesis Related) proteine za koje je poznato da poseduju snažnu antifungalnu aktivnost. Potvrđeno je da primenom etarskog ulja čajnog drveta značajno raste aktivnost  $\beta$ -1,3-glukanaze, jednog od najproučavanijih PR proteina za koji je dokazano da podstiče odbrambene reakcije biljaka i utiče na degradaciju ćelije patogena.

Novija ispitivanja efekata gasovite faze etarskog ulja čajnog drveta na skladišne patogene jagode *B. cinerea* i *Rhizopus stolonifer* pokazala su da se na tretiranim plodovima značajno smanjuje pojava truleži. Primenjeno u koncentraciji od 0,9 g/l vazduha, etarsko ulje čajnog drveta sprečava razvoj truleži i održava svežinu plodova u uslovima skladištenja (Shao i sar., 2013).

Tanović i sar. (2004) utvrdili su najveću toksičnost ulja timijana (od 0,16  $\mu$ l/ml do 0,65  $\mu$ l/ml) i bosiljka (od 0,04  $\mu$ l/ml do 0,16  $\mu$ l/ml) za patogene iz zemljišta (*Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi* i *Verticillium* sp.). Najslabiji efekat utvrđen je za ulje ruzmarina – minimalna letalna koncentracija (MLC) za *Verticillium* sp. *Pythium* sp. i *Rhizoctonia* sp. iznosila je 0,65  $\mu$ l/ml vazduha, a za vrste roda *Fusarium* preko 0,65  $\mu$ l/ml vazduha. Vrednost MLC ulja timijana i bosiljka za *Verticillium* sp. iznosila je 0,08  $\mu$ l/ml vazduha. Najslabije delovanje ispoljila su ulja čajnog drveta i ruzmarina, sa vrednošću MLC od 0,65  $\mu$ l/ml.

U istraživanjima Arslan i Dervis-a (2010) najsnažniju fungistatičnu aktivnost na *V. dahliae* ispoljila su ulja origana i timijana (> 99,9 %), a najslabiju ulje ruzmarina (< 75 %).

Kadoglidou i sar. (2011) takođe su potvrdili dobar efekat ulja origana na porast micelije i sporulaciju *V. dahliae* pri svim ispitivanim koncentracijama (1;5;10 µl/disku).

Ispitivanjem efekata etarskog ulja čajnog drveta na *R. solani* utvrđena je njegova slaba efikasnost na porast micelije ovog patogena (Thobunluepop i sar., 2009). Terzi i sar. (2007) dokazali su da ulje čajnog drveta značajno smanjuje porast micelije *Fusarium* sp. poreklom sa zaraženih klasova pšenice *in vitro*. Ispitivali su delovanje samog ulja i tri najzastupljenija jedinjenja koja se nalaze u njegovom sastavu (terpinen-4-ol, γ-terpinen i 1,8-cineol) i utvrdili da je efekat pojedinačnih komponenti znatno veći od samog ulja. Među testiranim jedinjenjima terpinen-4-ol bio je najefikasniji.

### 2.2.3. Hemijsko suzbijanje

Dezinfekcija zemljišta je za sada najefikasniji način suzbijanja patogena koji se prenose zemljištem. Perzistentnost struktura za održavanje u prirodi kao i njihovo lako rasejavanje prilikom obrade zemljišta i nege useva, predstavljaju glavne razloge višedecenijske primene neselektivnog dezinficijensa metil bromida kao najefikasnijeg zemljišnog fumiganta. Međutim, Montrealskim Protokolom 1992. godine metil bromid je označen kao supstanca koja ima štetan uticaj na ozonski omotač (Watson i sar., 1992). Tim protokolom predviđeno je da zemlje u razvoju treba u potpunosti da obustave upotrebu ovog fumiganta do 2015. godine. Zbog toga je u svetu pažnja sve više usmerena ka jedinjenjima koja bi mogla biti alternativa ovom fumigantu (Ivanović i Ivanović, 2007).

Pored metil bromida u svetu su za dezinfekciju zemljišta registrovani 1,3-dihloropropen, metil izotiocijanat (MITC) (MITC nastaje razgradnjom metam natrijuma i metam kalijuma) i dazomet. Kao potencijalne alternative metil bromidu navode se metil jodid, propargil bromid, ozon, formaldehid, natrijum tetratiokarbonat, ugljen disulfid, anhidrisani amonijak, neorganski azidi i prirodne materije. Za dezinfekciju zemljišta u povrtarskoj proizvodnji registrovan je samo dazomet. To je neselektivni zemljišni fumigant koji nespecifično inhibira veliki broj enzima. Formulisan je u obliku mikrogranula i primenjuje se inkorporacijom 9 (25 °C) do 45 (8 °C) dana pre setve, u zavisnosti od temperature zemljišta. Preparat se ne može koristiti ako je temperatura zemljišta niža od 8 °C. Osim vrsta roda *Verticillium*, dazomet efikasno suzbija i *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Sclerotinia* spp., *B. cinerea* i *R. solani* (Mitić, 2004).

Malo registrovanih fungicida namenjenih za suzbijanje *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp. i *Sclerotinia* spp. ograničava primenu ove mere zaštite povrtarskih useva (Janjić i Elezović, 2010). Dostupni su i drugi fungicidi koji su namenjeni za suzbijanje patogena iz zemljišta, a

koji pripadaju pravim gljivama najviše koristio sistemski fungicid benomil (benzimidazoli). Međutim, stupanjem na snagu direktive EU 91/414 benomil je zbog nepovoljnih toksikoloških osobina stavljen na listu fungicida koji se više ne mogu koristiti u zaštiti biljaka (Anonymous, 2011).

### 2.3. Fungicidi

Fungicidi za suzbijanje patogenih gljiva i pseudogljiva iz zemljišta se mogu podeliti u jedanaest hemijskih grupa:

- 1) Benzimidazoli
- 2) Triazoli i imidazoli
- 3) Strobilurini
- 4) Pirinidil-etil-benzamidi
- 5) Ftalimidi
- 6) Karboksimidi
- 7) Karbamati
- 8) Dikarboksimidi
- 9) Fenilamidi
- 10) Fosfonati
- 11) Ditiokarbamati

#### 2.3.1. Benzimidazoli

Za suzbijanje patogena iz zemljišta iz grupe pravih gljiva najčešće se koriste sistemski fungicidi benzimidazoli. Najvažniji predstavnici fungicida iz ove grupe su benomil, karbendazim, tiabendazol i tiofanat-metil. Primarni mehanizam delovanja ovih fungicida je inhibicija sinteze  $\beta$ -tubulina, što za posledicu ima sprečavanje deobe jedra (Clemons i Sisler, 1971; Hammerschlag i Sisler, 1973; cit. Davidse i Ishii, 1995). Benzimidazoli se mogu primenjivati folijarno i preko korena. Međutim, folijarna primena obezbeđuje samo dobro translaminarno, ali nedovoljno sistemsko delovanje. Najbolje se usvajaju preko korena, odakle se potom lako distribuiraju po celoj biljci (Talboys, 1984).

Istraživanja izvedena početkom 70-tih godina prošlog veka potvrdila su dobro fungistatično delovanje benomila, tiofanat-metila i tiabendazola na izolate *V. dahliae* (Jordan, 1973).

Rekanović i sar. (2006) utvrdili su najveću efikasnost benomila (72,3-84,1 %) u suzbijanju *Verticillium* sp. u svim fenofazama razvoja paprike (seme, ponik i razvijena tri

lista na stablu). Dobra efikasnost u suzbijanju *Verticillium* spp. u usevu pamuka utvrđena je pri primeni tiabendazola. Međutim, visoka efikasnost ovog jedinjenja je dokazana samo u kontrolisanim uslovima (Erwin, 1968; cit. Nene i Thapliyal, 1994). Dobri, ali neekonomični rezultati u polju postignuti su u varijantama u kojima je preparat na bazi tiabendazola primenjivan tri puta, počevši od tretiranja semena i zemljišta do tretiranja biljaka u toku vegetacije (Ranney, 1971; cit. Nene i Thapliyal, 1994).

Song i sar. (2004) potvrdili su osetljivost izolata *F. oxysporum* poreklom iz obolelih biljaka paradajza gajenih u hidroponima na fungicide iz različitih hemijskih grupa. Ispitivani izolati ispoljili su najveću osetljivost na karbendazim sa vrednošću srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50}$ ) od 0,019  $\mu\text{g/ml}$ . U *in vivo* ogledima utvrđeno je da se preventivnom primenom karbendazima u količini od 5  $\mu\text{g/ml}$  postiže znatno bolja efikasnost (87 %) u poređenju sa kurativnim tretmanima (34,4 %).

Amini i Fevzi Sidovich (2010) utvrdili su najveću toksičnost prochloraza ( $EC_{50} = 0,005$   $\mu\text{g/ml}$ ) na *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a nešto nižu toksičnost benomila ( $EC_{50} = 0,006$   $\mu\text{g/ml}$ ). Dokazano je i da su karbendazim i tiofanat-metil u laboratorijskim uslovima statistički značajno uticali na inhibiciju porasta micelije izolata *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Pri najvećoj koncentraciji od 150 mg/100 ml procenat inhibicije porasta micelije za karbendazima iznosio je > 95 %, a za tiofanat-metil oko 90 %. Takođe, i u *in vivo* ogledima ispoljili su najveću efikasnost protiv prouzrokovala „fuzarioznog uvenuća“ pamuka (Rajput i sar., 2006).

Jovićević i sar. (2006) preporučuju primenu karbendazima zajedno sa iprodionom za zaštitu povrtarskih useva od prouzrokovala „bele truleži“ *S. sclerotiorum*. Kishore i Gupta (1997) utvrdili su da se tretiranjem semena suncokreta preparatom na bazi karbendazima postiže zadovoljavajuća efikasnost (66,7 %) u suzbijanju ovog oboljenja. Kutchera i Wolf (2006) dokazali su da benomil i vinklozolin značajno smanjuju i pojavu „bele truleži“ na uljanoj repici. Međutim, iako su fungicidi iz grupe benzimidazola godinama primenjivani u zaštiti ovog useva od *S. sclerotiorum*, sve ređe su u upotrebi zbog opasnosti od pojave rezistentnih izolata (Li i sar., 2004).

Utiamada i sar. (1999a, b, 2000) i Taneja i Grover-a (1982) potvrdili su izuzetno dobru efikasnost (90 %) preparata iz grupe benzimidazola na bazi benomila i tiofanat-metila u suzbijanju vrsta roda *Rhizoctonia* – *R. solani* (u usevu afričkog pasulja) i *R. bataticola* (u usevu suncokreta i susama) i pri niskim dozama primene. U ogledima sprovedenim u polju u usevu soje najefikasniji su bili fungicidi iz grupe strobilurina, triazola i benzimidazola.

### 2.3.2. Triazoli i imidazoli

Praktičnu primenu u poljoprivredi našla su prvenstveno petočlana heterociklična jedinjenja sa dva atoma azota (imidazoli) i jedinjenja sa tri atoma azota (triazoli). Fungicidi iz ovih grupa inhibiraju demetilaciju ugljenika kod prekursora ergosterola, i to kod lanosterola u položaju C-14 ili u položaju C-24 kod metilen dihidrolanosterola, i označeni su kao DMI fungicidi (DeMethylation Inhibitors) (Kuck i sar., 1995).

U gajilištima šampinjona, za suzbijanje *V. fungicola* koriste se uglavnom preparati na bazi prohloraza. Međutim, Kurt i sar. (2003) dokazuju da je moguće postići zadovoljavajuću efikasnost (56,6-80 %) i u suzbijanju *V. dahliae* u usevu pamuka, ukoliko se preparat na bazi prohloraza primeni tretiranjem zemljišta nakon setve, u količini od 1250 g a.m./ha, uz utrošak 200 l vode po ha. Međutim, ovi autori ističu da je prohloraz samo delimično uspešan u suzbijanju prouzrokovača „zelenog uvenuća” i da prvenstveno utiče na ublažavanje simptoma kod već zaraženih biljaka.

Song i sar. (2004) utvrdili su da je srednja efektivna koncentracija prohloraza ( $EC_{50}$ ) za izolat *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* poreklom iz obolelih biljaka paradajza 0,235  $\mu\text{g/ml}$ . Istraživanjima Amini i Fevzi Sidovich-a (2010) u laboratorijskim uslovima utvrđena je najveća toksičnost prohloraza ( $EC_{50} = 0,005 \mu\text{g/ml}$ ) na porast micelije *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Nel i sar. (2006) potvrdili su da je prohloraz statistički značajno inhibirao i porast micelije *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pri koncentraciji fungicida u podlozi od 1 i 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Brojna istraživanja potvrdila su da je prohloraz jedan od najefikasnijih fungicida za suzbijanje prouzrokovača „fuzarioznog uvenuća“ biljaka (Song i sar., 2004; Amini i Fevzi Sidovich, 2010). Nel i sar. (2007) utvrdili su da propikonazol pri koncentraciji od 100 mg/ml u potpunosti inhibira porast micelije *F. oxysporum* f.sp. *cubense*. Pored visoke toksičnosti u *in vitro* ogledima, potvrđeno je i da je preparat na bazi propikonazola bio najefikasniji u suzbijanju prouzrokovača „fuzarioznog uvenuća“ i u poljskim uslovima (81,6 %).

CaiHua i sar. (2009) utvrdili su osetljivost 12 izolata *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* izolovanih iz zaraženih živića jagode na tebukonazol, dinikonazol, difenokonazol i miklobutanil. Vrednosti  $EC_{50}$  za tebukonazol iznosile su od 0,11 do 1,17  $\mu\text{g/ml}$ ; za dinikonazol od 0,14 do 2,26  $\mu\text{g/ml}$ ; za difenokonazol od 0,13 do 9,03  $\mu\text{g/ml}$  i za miklobutanil od 1,20 do 60,93  $\mu\text{g/ml}$ .

### 2.3.3. Strobilurini

Fungicidi iz grupe strobilurina imaju specifičan mehanizam delovanja. Oni se vezuju za proteinske podjedinice citohrom  $bc_1$  kompleksa smeštenog u unutrašnjoj membrani

mitohondrija, remeteći na taj način proces ćelijskog disanja kod gljiva (Jordan i sar., 1999; Tamura i Mizutani, 1999; Fisher i Meunier, 2008). Citohrom  $bc_1$  je ključni enzim u respiratornom elektron-transportnom lancu koji katalizuje transport elektrona sa ubikvinola (Q) do citohroma c. Za funkcionisanje katalitičkog mehanizma, označenog kao Q-ciklus (Mitchell, 1975), potrebna su dva udaljena mesta vezivanja ubikvinola (oksidaciono i redukciono), locirana na suprotnim stranama unutrašnje membrane mitohondrija, koja su povezana transmembranom elektron-transportnog puta. U citohromu b se nalaze i ubikvinol oksidaciono mesto (Qo mesto ili P centar) i redukciono mesto (Qi mesto ili N centar), kao i transmembranski elektronski put (Fisher i Meunier, 2008). Najznačajniji predstavnici fungicida iz ove grupe koji efikasno deluju na prouzrokovaoče uvenuća i truleži biljaka su azoksistrobin, trifloksistrobin i piraklostrobin.

U *in vitro* testovima osetljivosti gljiva i pseudogljiva na fungicide iz grupe strobilurina uočeno je da pojedine vrste poseduju sposobnost aktiviranja alternativnog načina disanja. Zapaženo je da se izolati određenih vrsta nesmetano razvijaju čak i u prisustvu visokih koncentracija ovih jedinjenja, zbog čega se dobija lažna slika o pojavi rezistentnosti. Ovaj fenomen se vezuje isključivo za laboratorijska ispitivanja osetljivosti i nije zabeležen u ispitivanjima efikasnosti *in vivo*. Jedno od objašnjenja ove pojave je da biljka domaćin proizvodi flavonoide koji su odgovorni za sprečavanje stvaranja alternativnih oksidaza. U cilju sprečavanja patogena da koriste alternativne mehanizme disanja, u *in vitro* ogledima primenjuje se supstanca salicilhidroksaminska kiselina (SHAM) koja inhibira aktiviranje alternativnih oksidaza (Ziogas i sar., 1997; Olaya i sar., 2001). Tako, Wise i sar. (2008) navode da je obavezna upotreba SHAM-a u ispitivanjima osetljivosti *Ascochyta rabiei* na QoI fungicide čime se dobijaju znatno niže vrednosti srednjih efektivnih koncentracija. Pasche i sar. (2004) dokazali su da su izolati vrste *Alternaria solani* bili 10 puta osetljiviji na piraklostrobin u tretmanima sa SHAM-om. Uočeno je i da SHAM u kombinaciji sa trifloksistrobinom jače inhibira porast micelije *Mycosphaerella fijiensis* u odnosu na varijante u kojima je primenjivan samo fungicid (Sierotzki i sar., 2000).

Bubici i sar. (2006) dokazali su da azoksistrobin i trifloksistrobin ispoljavaju visoku efikasnost u suzbijanju *V. dahliae* u usevu patlidžana u zaštićenom prostoru. Pri tom, utvrđeno je da azoksistrobin (95 %) ispoljava veću efikasnost u odnosu na trifloksistrobin (78 %), a slični rezultati dobijeni su i u ispitivanjima izvedenim u polju.

Gullino i sar. (2002) utvrdili su najbolji efekat preparata na bazi azoksistrobina u suzbijanju *F. oxysporum* u usevu ciklame i hrizanteme. Pri koncentraciji primene od 250 mg/l na biljkama ciklame procenat obolelih biljaka iznosio je 2,3-36,4 %; a na biljkama



hrizanteme 6,7-35 %. Trifloksistrobin je bio efikasan samo u suzbijanju patogena u usevu ciklame dok je kresoksim-metil izazvao fitotoksične efekte.

U laboratorijskim uslovima utvrđena je i osetljivost 47 izolata *Pythium* spp. na azoksistrobin. Svi izolati ispoljili su visoku osetljivost ( $EC_{50}$  0,001-0,27 mg/ml) (Wheeler i sar., 2005).

Tretiranjem zaraženog semena soje preparatom na bazi azoksistrobina, kao i njegovom kombinovanom primenom sa fludioksonilom i mefenomaksom postignuta je efikasnost od 74,1 i 71,3 % u zaštiti mladih biljaka od „poleganja“ (Ellis i sar., 2009).

Prema istraživanjima Stump i sar. (2002), uspešno suzbijanje truleži korena i korenovog vrata koju prouzrokuje *R. solani* ostvaruje se tretiranjem mladih biljaka šećerne repe fungicidima na bazi strobilurina. U varijantama primene ovih fungicida u poljskim uslovima zaraza na veštački inokulisanim biljkama šećerne repe je smanjena za 41-81 %, a prinos je povećan 3-4 puta u odnosu na netretiranu kontrolu. Takođe, Meyer i sar. (2006) utvrdili su najvišu efikasnost kresoksim-metila i azoksistrobina u suzbijanju *R. solani* na soji u odnosu na ostale ispitivane fungicide (fludioksonil, piraklostrobin + boskalid, karbendazin, difenokonazol, fluazinam, iprodion, tiabendazol, tebukonazol, piraklostrobin, benomil, prosimidon, hlrorotalonil, kresoksim-metil, mankozeb, tiofanat-metil). Međutim, za ova dva fungicida utvrđena je i najmanja toksičnost u *in vitro* ogledima, i to za azoksistrobin  $EC_{50} = 0,67 \mu\text{g/ml}$ , odnosno  $EC_{50} = 9,02 \mu\text{g/ml}$  za kresoksim-metil.

Azoksistrobin i piraklostrobin ispoljavaju dobru efikasnost u suzbijanju prouzrokovala propadanja rasada – *Pythium ultimum*. Takođe, utvrđeno je da ova dva fungicida osim što značajno smanjuju intenzitet oboljenja, deluju i stimulatивно na porast biljaka (Salman i Abuamsha, 2012). Azoksistrobin smanjuje intenzitet propadanja rasada za  $\geq 50$  % (pri koncentracijama primene od 5 do 10  $\mu\text{g/ml}$ ), dok je piraklostrobin pri istim koncentracijama primene smanjio intenzitet oboljenja za  $\geq 60$  %.

#### 2.3.4. Piridinil-etil-benzamidi

Fungicidi iz ove hemijske grupe, označeni kao SDHI (succinate dehydrogenase inhibitor) fungicidi, inhibiraju enzim sukcinat dehidrogenazu (kompleks II) koja je značajan funkcionalni deo Krebsovog ciklusa (ciklus trikarboksilnih kiselina), a povezana je sa elektronskim transportom koji se odvija u procesu mitohondrijalnog disanja. Zahvaljujući ovom specifičnom mehanizmu delovanja, nije utvrđena ukrštena rezistentnost jedinjenja iz ove grupe sa jedinjenjima iz drugih hemijskih grupa, kao što su strobilurini, benzimidazoli ili anilinopirimidini (Leroux i sar., 2002; Avenot i sar., 2008). Prema FRAC klasifikaciji

fluopiram ima oznaku 7 i na osnovu mehanizma delovanja označen je kao fungicid srednjeg do visokog rizika za razvoj rezistentnosti (<http://www.frac.info/>).

Fluopiram je noviji fungicid iz ove grupe, sistemičnog načina delovanja, koji se primenjuje prvenstveno za suzbijanje pravih gljiva. Koristi se folijarno ili preko zemljišta zalivanjem biljaka. S obzirom da je fluopiram relativno novo jedinjenje iz ove grupe, još uvek nema podataka o njegovom delovanju na patogene iz zemljišta.

### 2.3.5. Ftalimidi

Ftalimidi su fungicidi nespecifičnog mehanizma delovanja. Ova jedinjenja deluju preventivno i zahtevaju učestalu primenu i visoke doze. Uglavnom inhibiraju klijanje konidija, dok je njihov efekat na porast micelije *in vitro* značajno slabiji. Primarni mehanizam delovanja zasniva se na blokiranju enzima koji sadrže sumpor, a učestvuju u klijanju konidija. Najpoznatija jedinjenja iz ove grupe su kaptan i folpet. Fungicidi iz ove hemijske grupe uglavnom se koriste za folijarna tretiranja, ali se koriste i za tretiranje semena, prvenstveno kaptan. Koristi se za zaštitu semena šećerne repe, uljane repice, lana, kukuruza, ječma, povrtarskih biljaka i cveća (Stanković, 1972).

Ram i sar. (2004) utvrdili su da je kaptan u uslovima staklenika ispoljio zadovoljavajuću efikasnost u suzbijanju prozrokovača „fuzarioznog uvenuća” gladiola. U varijantama primene preparata na bazi kaptana intenzitet oboljenja je iznosio 23 %, dok je u varijantama gde su primenjivani preparati na bazi karbendazima, benomila i mankozeba procenat obolelih biljaka bio statistički značajno veći. Međutim, autori ističu da je intenzitet oboljenja bio najniži u varijantama primene preparata na bazi benomila (14,2 %) i karbendazima (19,4 %). Kaptan obezbeđuje i dobru zaštitu kukuruza od *F. oxysporum* iz zemljišta i poboljšava nicanje biljaka (Faloon, 1982; cit. McGee, 1988).

Dokazano je da se tretiranjem zaraženog semena kaptanom postiže visoka efikasnost u suzbijanju oboljenja koja prouzrokuje *S. sclerotiorum*. Tu (1989) je utvrdio da se u kombinaciji sa tiofanat-metilom u potpunosti inhibira porast micelije *S. sclerotiorum* na semenu pasulja. Mueller i sar. (1999) takođe su utvrdili da se kombinovanom primenom kaptana, kvintozena, tiabendazola i fludioksonila u potpunosti (100 %) inhibira porast micelije *S. sclerotiorum* na semenu soje.

Iqbal i sar. (2003) utvrdili su uticaj različitih fungicida (propineba, triadimenola, benomila, kaptana, hlorotalonila, mankozeba, metalaksil-m + mankozeb, tiabendazola) na inhibiciju klijanja spora i porast micelije *S. sclerotiorum* poreklom sa patlidžana. Iako je u tretmanu kaptanom pri koncentraciji od 100 mg/l procenat inhibicije porasta micelije bio 90

%, istraživači navode da je ovaj fungicid ispoljio umerenu efikasnost u poređenju sa ostalim ispitivanim fungicidima. Kljavost sklerocija pri istoj koncentraciji kaptana iznosila je 17,2 %.

### 2.3.6. Karboksamidi

Karboksamidi su sistemski fungicidi koji isto kao i pirinidil-etil-benzamidi inhibiraju enzim sukcinat dehidrogenazu, koja predstavlja funkcionalnu jedinicu ciklusa trikarboksilnih kiselina i elektrontransportnog sistema mitohondrija i to uglavnom kod bazidiomiceta (Kulka i Von Schelming, 1995). Zapaženo je da neki karboksamidi deluju inhibitorno i na *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Helminthosporium* spp. i *B. cinerea* *in vitro*. Selektivnost ove grupe fungicida zasniva se na razlici u osetljivosti enzima na delovanje fungicida i/ili na mogućnosti dospevanja fungicida do mesta delovanja (Leroux, 2004). Novije jedinjenje iz ove hemijske grupe je boskalid koji poseduje širok spektar delovanja.

Liu i sar. (2009) utvrdili su osnovnu osetljivost izvorne populacije *S. sclerotiorum* izolovane iz zaraženih biljaka uljane repice na boskalid. Svi izolati ispoljili su visoku osetljivost na ispitivani fungicid sa utvrđenim EC<sub>50</sub> vrednostima u intervalu od 0,002 do 0,391 mg/l. Međutim, Wang i sar. (2009) utvrdili su višu vrednost srednje efektivne koncentracije EC<sub>50</sub> izvorne populacije *S. sclerotiorum* koja je iznosila 0,17 ± 0,09 µg/ml. U ogleđima efikasnosti koje su izveli Matheron i Porchas (2004) u usevu zelene salate, boskalid je smanjio intenzitet oboljenja izazvan *S. sclerotiorum* za 30,4 %, dok je u suzbijanju *S. minor* postignuta nešto veća efikasnost koja je iznosila 55,5 %.

### 2.3.7. Karbamati

Propamokarb i protiokarb su najvažniji karbamatni fungicidi. Spektar delovanja im je ograničen na pseudogljive, i to na vrste iz rodova *Pythium*, *Phytophthora*, *Aphanomyces*, *Bremia*, *Peronospora* i *Pseudoperonospora* (Tomlin, 2003). Uglavnom se koriste u rasadničkoj proizvodnji za suzbijanje prouzrokovala propadanja i poleganja mladih biljaka. Biološki mehanizam delovanja još nije u potpunosti jasan. Međutim, Schwinn i Staub (1995) navode da je uočeno da propamokarb utiče na biosintezu fosfolipida i masnih kiselina u ćelijskim membranama. Pretpostavlja se da je njegovo biološko mesto delovanja zapravo kombinacija umerenog efekta inhibicije klijanja sporangija i izraženijeg efekta sprečavanja porasta micelije patogena (Cohen i Samoucha, 1990). Što se tiče pokretljivosti u odnosu na biljke propamokarb je lokalsistemik i uglavnom se kreće akropetalno (Cohen i Samoucha, 1990; Horne, 1999). Biološka aktivnost je relativno slaba u poređenju sa drugim

lokalsistemičnim fungicidima, tako da se mora primenjivati u većim količinama (Schwinn and Staub 1995). U našoj zemlji koristi se preventivno za zalivanje rasada paprike, tri dana pred rasađivanje (Mitić, 2004).

Papavizas i sar. (1978) utvrdili su  $EC_{50}$  vrednosti propamokarba za vrste *P. aphanidermatum*, *P. splendens*, *P. irregulare*, *P. ultimum* i *P. arrhenomanes* u intervalu od 0,5 do 10  $\mu\text{g/ml}$ . Međutim, novija istraživanja Liu i Liu-a (2007) ukazuju na više vrednosti srednjih efektivnih koncentracija za *P. aphanidermatum* (35,3 mg/l). Isti istraživači dokazali su da je u *in vivo* uslovima efikasnost propamokarba iznosila 72,3-80,2 %. Parađiković i sar. (2012) utvrdili su u varijantama primene preparata na bazi propamokarba u suzbijanju *P. ultimum* veću masu stabljike i lista mladih biljaka paprike (2-4 lista) i to za 32,8 % odnosno 49,1 % u odnosu na inokulisanu kontrolu. Takođe, najveća masa korena izmerena je u tretmanu sa ovim fungicidom (0,51 g), dok je broj preživelih biljaka iznosio 50 %.

Vatchev i Maneva (2012) utvrdili su najveću efikasnost prilikom kombinovane primene tiofanat-metila i propamokarb hidrohlorida od 84 % u suzbijanju mešane infekcije na biljkama krastavca čiji su prouzrokovatori *F. oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. i *Rhizoctonia solani*. Propamokarb hidrohlorid u kombinaciji sa benomilom ispoljio je nešto nižu efikasnost od 77,7 %. Pojedinačnom primenom preparata postignuti su slabiji rezultati: efikasnost benomila iznosila je 52,5 %; tiofanat-metila 38,4 %; a propamokarba 16,2 %.

### 2.3.8. Dikarboksimidi

Dikarboksimidi ispoljavaju protektivno delovanje u suzbijanju fitopatogenih gljiva iz rodova *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Monilinia*, *Alternaria*, *Sclerotium*, *Phoma*, *Helminthosporium*, *Rhizoctonia* i *Corticium*. Različita aktivnost kao i spektar delovanja pojedinih jedinjenja iz ove grupe uslovljena je njihovom hemijskom strukturom. Dikarboksimidi imaju cikličnu komponentu koja može biti oksazolidindion (vinklozolin i hlozolinat), sukcinimid (prosimidon i metomeklan) i hidantoin (iprodion). Dikarboksimidi izazivaju nespecifične morfološke promene micelije, slične promenama koje nastaju pod uticajem sorboze, citohalasina ili inhibitora sinteze proteina (Macris i Georgopoulos, 1973: loc. cit. Edlich i Lyr, 1995). Utvrđeno je da inhibiraju porast micelije i klijanje konidija, s tim što je inhibicija klijanja konidija slabije izražena (Parker i Fisher, 1979: loc. cit. Edlich i Lyr, 1995). Ova jedinjenja utiču na strukturu i mitotsku deobu ćelije, sintezu proteina ćelijskih membrana, RNK i DNK, a remete i metabolizam sterola i lipida. Međutim, i pored velikog broja efekata koje dikarboksimidi mogu da izazovu u različitim delovima metabolizma ćelije, njihov primarni mehanizam delovanja još uvek nije poznat.

Csinos i Stephenson (1999) utvrdili su u *in vitro* testovima da su izolati *R. solani* ispoljili visoku osetljivost na iprodion sa vrednošću srednje efektivne koncentracije od 0,05 mg/l, a ovi rezultati potvrđeni su i u uslovima staklenika gde je iprodion ispoljio najveću efikasnost.

### 2.3.9. Fenilamidi

Fungicidi iz grupe fenilamida ispoljavaju veoma specifično delovanje na patogene reda *Peronosporales* i podeljeni su u dve grupe: a) acilalanini – sa najvažnijim jedinjenjima furalaksil, metalaksil i benalaksil, i b) acilamino-oksazolidioni – ofurak i ciprofuram (Schwinn i Staub, 1995). Iako se sva ova jedinjenja koriste za navedenu namenu, metalaksil ima najširu komercijalnu primenu (Erwin i Ribeiro, 2005). Otkriće fenilamida je vezano za istraživanja strukturalno bliskih hlороacetanilidnih herbicida (Davidse, 1995). Biološki mehanizam delovanja nije u potpunosti jasan, ali Davidse (1995) smatra da je usmeren na inhibiciju biosinteze ribozomalne RNA preko remećenja polimeraze RNA I kompleksa. Inhibiraju porast micelije i sporulaciju patogena (Davidse i sar., 1988). Zbog svoje rastvorljivosti u vodi metalaksil se lako usvaja preko korena i koristi se za suzbijanje *Phythium* i *Phytophthora* vrsta zalivanjem biljaka u rasadničarskoj i proizvodnji ukrasnih biljaka (Benson, 1985; Benson 1990).

Al-Sa'di i sar. (2008) utvrdili su da je pri koncentracijama < 0,80 mg/l metalaksil inhibirao porast micelije izolata *P. aphanidermatum* izolovanih sa mladih biljaka krastavca za 50 % u uslovima *in vitro*.

U ispitivanjima Abdelhazer i sar. (2004) metalaksil je u potpunosti inhibirao porast micelije izolata *P. deliense* i *P. oligandrum* pri koncentraciji u podlozi od 10 ppm. Inhibicija klijanja oospora postignuta je i pri nižoj koncentraciji od 2 ppm.

Salman i Abuamsha (2012) utvrdili su visoku efikasnost metalaksila u zaštiti ponika paradajza od *P. ultimum* kako u tretmanima gde je primenjivan samostalno tako i u slučajevima kombinovane primene sa *P. fluorescens*. Međutim, za razliku od azoksistrobina i piraklostrobina metalaksil nije ispoljio stimulatívno delovanje. Takođe, tretiranjem semena fungicidima (azoksistrobina, metalaksila-M i piraklostrobina) u kombinaciji sa *P. fluorescens* postignuta je efikasnost od 90 %. Pivonia i sar. (2012) navode da je primenom metalaksila moguće u potpunosti redukovati pojavu oboljenja čiji su prouzrokovaci vrste roda *Pythium* na mladim biljkama paprike.

### 2.3.10. Fosfonati

Najznačajniji predstavnik ove grupe fungicida je fosetil-aluminijum i produkt njegove razgradnje fosforna kiselina. Sva jedinjenja ove grupe se ubrzo posle dospevanja u biljno tkivo razgrađuju do fosfatnog anjona koji predstavlja aktivnu komponentu ovih fungicida (Guest i Grant, 1991). Alkil-fosfonati mogu ispoljiti dodatni fungicidni efekat preko svog metalnog katjona. Schwinn i Staub (1995) utvrdili su da se biohemijski mehanizam delovanja fosfonata odnosi na metabolizam amino-kiselina. Pored fungistatičnog efekta, fosfonati indukuju kod biljaka i otpornost na patogene (Griffith i sar., 1992). Fosfonati se odlično translociraju u biljkama i akropetalno i bazipetalno, što ih čini jedinstvenim među svim fungicidima. Međutim, možda je ipak prihvatljivija hipoteza koju zastupaju Guest i Grant (1991) da fosfonati deluju i kao fungistatici i kao stimulatori otpornosti biljaka. Pomenuti autori u svojim istraživanjima zaključuju da iako fosfonati nisu uvek u dovoljnoj meri aktivni protiv *Oomycota in vitro*, mnogo su efikasniji prema ovoj grupi patogena *in vivo*. Fosfonati menjaju metabolizam patogena na takav način da biljka domaćin može mnogo brže i efikasnije da pripremi odbrambenu reakciju. Ove promene metabolizma podrazumevaju kombinaciju dva mehanizma: a) smanjenje broja molekula supresora prisutnih na površini patogena, i b) povećanje broja molekula elicitora koji su izloženi receptorima na ćelijama domaćina. Oba navedena mehanizma ne deluju inhibirajuće na patogene *in vitro*, ali su letalna u prisustvu aktivnog odbrambenog sistema biljke domaćina (Erwin i Ribeiro, 2005).

Cook i sar. (2009) utvrdili su znatno niže  $EC_{50}$  fosforne kiseline koje su se kretale u intervalu od 35,6 do 171,8 mg/l za vrstu *P. aphanidermatum*, dok se za šest izolata *Pythium* spp.  $EC_{50}$  kretala u rasponu od 38,7 do 220,8 mg/l. Poljskim ogledima dokazana je visoka efikasnost fosfonata. Efikasnost svih testiranih fungicida u suzbijanju *P. aphanidermatum* i *Pythium* spp. iznosila je > 89 %.

### 2.3.11. Ditiokarbamati

Prvi ditiokarbamati su otkriveni 40-ih godina XX veka, a dalji razvoj je usledio u periodu između 1951. i 1962. godine (Erwin i Ribeiro, 2005). Njihovom pojavom počela je era primene organskih fungicida (Stein, 2002). Po spektru delovanja i efikasnosti primene ditiokarbamati su slični bakarnim preparatima, ali se zbog smanjene fitotoksičnosti kao i lakše primene i transporta češće primenjuju. Strukturalno se razlikuju dve podgrupe ditiokarbamata: dialkilditiokarbamati (ciram, ferbam, tiram) i monoalkil ditiokarbamati (nabam, cineb, maneb, mankozeb) (Nene i Thapliyal, 1994). Fungitoksično delovanje derivata ditiokarbaminske kiseline vezano je za ditiokarbamatni anjon, koji nakon dospevanja

u ćelije gljive reaguje sa endogenim jonom bakra i u tom obliku ispoljava svoje delovanje (Janjić, 2005).

Mankozeb je visoko stabilni kompleks mangana i cinka čija aktivna komponenta, ditiokarbamatni jon, remeti metalo-enzime ili reaguje sa tiolnim grupama enzima. Jedinjenja iz podgrupe dialkilditiokarbamata pokazuju donekle specifično delovanje na dehidrogenaze koje sadrže lipoamide (Sijpesteijn i sar., 1957: loc. cit. Corbett i sar., 1974). Često se kombinuju sa sistemčnim i lokalsistemčnim fungicidima kao što su metalaksil, cimoksanil, oksadiksil, dimetomorf, famoksadon i fosetil-aluminijum, u cilju sprečavanja razvoja rezistentnosti i proširenja spektra delovanja.

Baličević (2008) je utvrdio visoku efikasnost biološkog preparata na bazi *T. harzianum* u suzbijanju *Pythium debaryanum* u usevu salate u uslovima plasteničke proizvodnje. Najveći broj preživelih biljaka salate utvrđen je u tretmanu gde je korišćen biološki preparat (24,75 biljaka), a najmanji u tretmanu sa mankozebom (9,75 biljaka). Takođe, u kontroli i tretmanu sa propamokarb hidrohloridom utvrđen je veći broj biljaka ( $P < 0,05$ ) u odnosu na biljke tretirane mankozebom.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Uzorkovanje i izolacije gljiva i pseudogljiva

Patogeni roda *Verticillium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Pythium* i *Rhizoctonia* izolovani su iz obolelih biljaka paprike koje potiču sa lokaliteta Padinska Skela, Šabac, Knjaževac i Smederevska Palanka. Izolati *V. dahliae* i *S. sclerotiorum* zolovani su iz biljaka paprike sa simptomima „verticilioznog uvenuća” i „bele truleži”, a *P. aphanidermatum* iz zemljišta. Ovi izolati su deo kolekcije Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine. Izolat *F. oxysporum* izolovan je iz biljaka paprike sa simptomima „fuzarioznog uvenuća” u laboratoriji za fitopatologiju Instituta za povrtarstvo, a izolat *R. solani* izolovan je sa obolele biljke paprike sa simptomima uvenuća i truleži korena i identifikovan u laboratoriji za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Podaci o lokalitetima i vremenu izolacije prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1.** Lokaliteti sa kojih su prikupljeni uzorci obolelih biljaka paprike

Izolati	Lokalitet	Godina sakupljanja uzoraka
<i>V. dahliae</i> <sup>1</sup>	Padinska Skela	2010.
<i>F. oxysporum</i> <sup>2</sup>	Smederevska Palanka	2010.
<i>S. sclerotiorum</i> <sup>1</sup>	Šabac	2009.
<i>P. aphanidermatum</i> <sup>1</sup>	Smederevska Palanka	2007.
<i>R. solani</i> <sup>3</sup>	Knjaževac	2009.

<sup>1</sup>kolekcija Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine – Beograd

<sup>2</sup>kolekcija Instituta za povrtarstvo – Smederevska Palanka

<sup>3</sup>kolekcija Poljoprivrednog fakulteta – Univerzitet u Novom Sadu

Iz sakupljenih uzoraka urađena je izolacija primenom standardnih mikoloških metoda (Dhingra i Sinclair, 1995). Fragmenti obolelih delova korena i prizemnog dela stabla sa prelaza zdravog i obolelog tkiva isecani su sterilnim skalpelom, ispirani pod mlazom vode, zatim površinski sterilisani 2 % rastvorom natrijum hipohlorita (NaOCl) i preneti na sterilnu KDA (krompir-dekstrozni agar) podlogu. Zasejane podloge su inkubirane u mraku, pri temperaturi od 20-25 °C do pojave kolonije gljive/pseudogljive. Dobijena micelija je presejana da bi se dobila čista kultura, koja je za dalji rad održavana na istoj podlozi i istom temperaturnom režimu. Dobijeni izolati su zatim presejani u epruvete sa zakošenom KDA podlogom i čuvane u frižideru na temperaturi od 4 °C (Dhingra i Sinclair, 1995). *Pythium* sp. izolovan je iz zemljišta korišćenjem naklijalog semena paprike kao mamka (Patil i sar., 2012).



### 3.2. Provera patogenosti izolata

Patogenost izolata proverena je u stakleniku veštačkom inokulacijom biljaka paprike sorte Novosadska babura.

Inokulum je pripreman od izolata gljiva gajenih na KDA podlozi u periodu od dva do 15 dana, u zavisnosti od izolata.

Inokulum izolata *V. dahliae* pripremljen je u vidu suspenzije micelije i konidija koja je napravljena dodavanjem 10 ml sterilne destilovane vode u Petri kutije sa odgajenom kulturom starosti dve nedelje. Micelija i konidije patogena su odvojene od podloge sterilnom kopljastom iglom, a suspenzija je korišćena za inokulaciju prilikom presađivanja biljaka paprike starosti šest i više listova. Korenov sistem svake biljke potapan je u inokulum u trajanju 10-15 minuta. Nakon toga biljke su presađene u saksije prečnika 100 mm i zalivene najpre preostalim količinom inokuluma (oko 5 ml po biljci), a potom vodom.

Inokulum ostalih izolata pripreman je gajenjem izolata na sterilisanom zrnu pšenice (*S. sclerotiorum* i *P. aphanidermatum*) ili ječma (*F. oxysporum* i *R. solani*). U Erlenmajer kolbe zapremine 250 ml stavljeno je 60 g zrna pšenice ili ječma i 20 ml destilovane vode. Potopljeno zrno je ostavljeno na sobnoj temperaturi 24 sata, a zatim sterilisano u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i pritisku od 1,2 bara u trajanju od 20 minuta. Nakon sterilizacije, u kolbe su dodati fragmenti micelije ispitivanih izolata. Kolbe su potom inkubirane u termostatu pri temperaturi od 20-25 °C do momenta kada je micelija u potpunosti prorasla supstrat. Tokom perioda inkubacije, kolbe su povremeno protresane radi sprečavanja stvaranja kompaktne mase zrna i micelije.

Provera patogenosti izolata *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *P. aphanidermatum* i *R. solani* izvršena je u uslovima staklenika na sličan način. U saksije napunjene sterilnim zemljišnim supstratom dodavano je po 5 ml pripremljenog inokuluma, a zatim je izvršeno sađenje biljaka paprike. Za *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* i *R. solani* biljke su bile u fazi četiri prava lista, dok su za *P. aphanidermatum* korišćeni klijanci starosti 17-20 dana. Nakon zasađivanja biljke su zalivane vodom, a promene na biljkama u vidu poleganja, zaostajanja u porastu i uvenuća praćene su svakodnevno.

Za rad je korišćen sterilisan zemljišni supstrat B – Medium Course nemačkog proizvođača Floragard®. Kao kontrola korišćene su neinokulisane biljke paprike odgovarajuće starosti, koje su zalivane sterilnom vodom. Posle pojave simptoma uvenuća ili poleganja biljaka, reizolacijom je potvrđeno da su oni posledica patogene aktivnosti izolata korišćenih za inokulaciju.

### 3.3. Morfološke karakteristike izolata

Izolati su identifikovani na osnovu proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika izolata.

Morfološke makroskopske i mikroskopske karakteristike izolata *V. dahliae* proučene su gajenjem izolata na KDA podlozi. Nakon inkubacije od 15 dana pri temperaturi od 25 °C posmatran je tip micelije, oblik i boja kolonije, odlike ruba kolonije, kao i prisustvo sklerocija i konidija parazita. Pravljeni su privremeni mikroskopski preparati od micelije stare 15 dana i posmatran je izgled hifa, konidiofora i konidija, kao i prisustvo i izgled mikrosklerocija (Hawksworth i Talboys, 1970).

Izolat *F. oxysporum* zasejavan je na KDA podlogu i nakon inkubacije od sedam dana pri temperaturi od 25 °C, posmatrane su njegove makroskopske karakteristike: tip micelije, oblik i boja kolonije, odlike ruba kolonije kao i lučenje pigmenta u podlogu. Radi proučavanja mikroskopskih karakteristika, izolat je zasejan na SNA podlogu (Bilijeva podloga, modifikovana po Jofeu: 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g KNO<sub>3</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>; 0,5 g KCl; 0,2 g glukoza; 0,2 g saharoza; 0,2 g skrob; 15 g agar; 1 l destilovane vode) (Lević, 2008). Nakon inkubacije od sedam dana posmatran je izgled konidiofora, prisustvo ili odsustvo makrokonidija, mikrokonidija i hlamidospora (Windels, 1992).

Sa ciljem proučavanja makroskopskih i mikroskopskih karakteristika, izolat *S.sclerotiorum*, zasejan je na KDA podlogu i nakon inkubacije od pet dana pri temperaturi od 25 °C posmatrani su razvoj kolonije, izgled i boja kolonije, kao i prisustvo sklerocija (Cuong i Dohroo, 2006).

Izolat *R. solani* inkubiran je na KDA podlozi pri temperaturi od 25-26 °C i tokom desetodnevnog razvoja posmatran je porast i promena boje micelije, kao i pojava sklerocija. Micelija gljive je mikroskopirana u cilju utvrđivanja sledećih karakteristika: izgled micelije, grananje i septiranost hifa, kao i prisustva višejedarnih ćelija (Bandoni, 1971).

Morfološke karakteristike izolata *P. aphanidermatum* proučene su gajenjem na KDA podlozi u periodu od tri nedelje pri temperaturi od 20 °C pri čemu je praćen razvoj i izgled kolonije kao i prisustvo oospora patogena (Patil i sar., 2012).

### 3.4. Molekularna identifikacija

Identitet proučavanih izolata potvrđen je analizom sekvence amplikona ITS (Internal transcribed spacer) regiona rDNK, dobijenog korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 koji su dizajnirali White i sar. (1990).

### 3.4.1. Priprema izolata

Izolati su zasejavani na KDA podlogu i inkubirani u mraku pri temperaturi 20-25 °C. Nakon inkubacije u trajanju od 7-15 dana iz razvijene micelije svih izolata urađena je ekstrakcija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK).

### 3.4.2. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK obavljena je iz vazdušne micelije sakupljene direktno iz kolonija odgajenih na KDA podlozi, po metodi koju su opisali Harrington i Wingfield (1995). Za ekstrakciju je korišćen komercijalni preparat PrepManX (Applied Biosystems, Foster City, CA) primenom postupka navedenog u uputstvima proizvođača.

### 3.4.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Za PCR protokol koji su opisali White i sar. (1990) korišćeni su sledeći oligonukleotidni prajmeri koji omogućavaju umnožavanje pet genskih segmenata DNK iz ITS regiona rDNK (deo 18S rRNK, ITS1, 5.8S rRNK, ITS2 i deo 28S rRNK):

ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' i

ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'.

PCR reakcije obavljene su u radnoj zapremini od 25 µl, korišćenjem 12,5 µl 2 x PCR Master mix-a (Fermentas, Lithuania), 9,5 µl RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), po 1 µl svakog prajmera i 1 µl izolovane ukupne DNK. U svim reakcijama kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša koja sadrži sve reagense potrebne za umnožavanje DNK u koju je umesto DNK uzorka dodavana RNase-free voda. PCR reakcija izvedena je u Eppendorf Master Cycler-u (Eppendorf, Germany) pri sledećim uslovima reakcije:

1 ciklus	-denaturacija DNK (94 °C - 1 min 30 s)
29 ciklusa	-denaturacija DNK (94 °C - 30 s)
	-vezivanje prajmera (55 °C - 30 s)
	-sinteza fragmenta DNK - elongacija (72 °C - 30 s)
1 ciklus	-elongacija (72 °C - 9 min)

#### **3.4.4. Analiza produkata amplifikacije**

Vizuelizacija produkata amplifikacije, odnosno amplifikovanih fragmenata nukleinske kiseline dobijenih PCR reakcijom, urađena je u 1 % agaroznom gelu u 1xTBE puferu (90 mM Tris; 90 mM borna kiselina; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA), pri naponu od 100 V. Gel je pripreman tako što je potrebna količina agaroze prvo dodavana u 1xTBE pufer, a zatim zagrejana do ključanja u mikrotalasnoj rerni. Količina od 40 ml zagrejanog gela razlivana je u kalup u koji je prethodno postavljen češalj i ostavljena pri sobnoj temperaturi do očvršćavanja. Nakon toga, češalj je izvađen, a gel postavljen u kadicu za horizontalnu elektroforezu (BlueMarine100, Serva) u koju je zatim naliven 1xTBE pufer u količini dovoljnoj da pokrije gel. Pre nanošenja uzoraka u bunarčice, 6 µl svakog uzorka pomešano je sa 1 µl boje za nalivanje (Loading Dye, MBI Fermentas, Lithuania). U gelu je korišćen 1 kb DNK marker (MBI Fermentas, Lithuania), a gel je obojen potapanjem u 0,1 % rastvor etidijum bromida u trajanju od 10 minuta. Vizuelizacija amplifikovanih produkata obavljena je posmatranjem na UV transiluminatoru.

#### **3.4.5. Prečišćavanje i sekvencioniranje**

PCR produkti su pre sekvencioniranja prečišćeni pomoću mi-PCR Purification Kit (Metabion International, Germany), po uputstvu proizvođača. U tubice sa PCR produktima dodat je DNA Binding Buffer (pufer za vezivanje) u količini pet puta većoj od količine PCR smeše i sve je dobro promešano. Smeša je zatim prenetu u kolone i centrifugirana 1 minut pri brzini od 12000 rpm pri sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja filtrat je odbačen, u kolone je dodato 750 µl Column Wash Buffer-a i centrifugirano 1 minut pri brzini od 12000 rpm pri sobnoj temperaturi. Zatim je u kolone dodato još 250 µl istog pufera, centrifugirano pri istim uslovima i na kraju je filtrat odbačen. Kolona je prebačena u novu tubu u koju je potom dodato 50 µl destilovane vode. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 minut pri brzini od 12000 rpm, u tubi ostaje filtrat koji sadrži DNK.

Nakon prečišćavanja amplikoni su sekvencionirani u Macrogen Inc. (Korea). Dobijene sekvence su analizirane i spojene pomoću programa Pregap 4 verzija 1.5, a zatim poređene pomoću programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i softverskog paket MEGA 5 (Tamura i sar., 2011) sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka.

### 3.5. Utvrđivanje osjetljivosti izolata na fungicide i biofungicide *in vitro*

Ispitivanja osjetljivosti izolata fitopatogenih gljiva iz zemljišta obuhvatila su fungicide iz osam hemijskih grupa, korišćene u vidu komercijalno dostupnih preparata, kao i jedan biofungicid koji kao aktivnu materiju sadrži etarsko ulje čajnog drveta. U tabelama 2-6 dat je pregled fungicida i biofungicida koji su korišćeni u ogledima *in vitro*.

**Tabela 2.** *Verticillium dahliae*. Ispitivani fungicidi i intervali korišćenih koncentracija

Aktivna supstanca	Preparat	Intervali koncentracija (mg/l)
Tiofanat-metil	Funomil	1,25; 2,5; 3,5; 5; 7,5; 10;
Difenokonazol	Score 250-EC	0,09; 0,19; 0,37; 0,75; 1,5;
Fluopiram	Luna Privilege	>5000;
Azoksistrobin	Quadris	25; 50; 75; 100;
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	5000; 3000; 2500; 1500
Prohloraz	Spartak 450-EC	1; 0,1; 0,01;

**Tabela 3.** *Fusarium oxysporum*. Ispitivani fungicidi i intervali korišćenih koncentracija

Aktivna supstanca	Preparat	Intervali koncentracija (mg/l)
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	125; 250; 500; 1000
Fluopiram	Luna Privilege	250; 500; 1000; 1500; 2000
Kaptan	Agrokaptan	50; 75; 100; 250
Prohloraz	Spartak 450-EC	0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1
Propikonazol	Bumper 25-EC	1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25
Tiofanat-metil	Funomil	25; 50; 75; 100

**Tabela 4.** *Sclerotinia sclerotiorum*. Ispitivani fungicidi i intervali korišćenih koncentracija

Aktivna supstanca	Preparat	Intervali koncentracija (mg/l)
Boskalid	Cantus	0,05; 0,1; 1; 10
Fluopiram	Luna Privilege	0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2
Kaptan	Agrokaptan	3,12; 6,25; 12,5; 25
Prohloraz	Spartak 450-EC	0,003; 0,006; 0,0125; 0,025; 0,05
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	62,5; 125; 250; 500; 1000
Tiofanat-metil	Funomil	1,12; 2,5; 5

**Tabela 5.** *Rhizoctonia solani*. Ispitivani fungicidi i intervali korišćenih koncentracija

Aktivna supstanca	Preparat	Intervali koncentracija (mg/l)
Tiofanat-metil	Funomil	0,6; 1,25; 2,5; 5; 10;
Iprodion	Kidan 250 SC	0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5;
Prohloraz	Spartak 450-EC	1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25;
Fluopiram	Luna Privilege	250; 350; 500; 700; 1000;
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	62,5; 125; 250; 500; 1000;
Azoksistrobin	Quadris	10; 100; 500; 1000;

**Tabela 6.** *Pythium aphanidermatum*. Ispitivani fungicidi i intervali korišćenih koncentracija

<b>Aktivna supstanca</b>	<b>Preparat</b>	<b>Intervali koncentracija (mg/l)</b>
Azoksistrobin	Quadris	0,006; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	125; 250; 500; 1000
Fosetil-aluminijum	Aliette flash	250; 350; 500; 1000
Mankozeb	Mankogal 80 WP	6,25; 12,5; 25; 50
Metalaksil	Ridomil gold 480 SL	0,5; 1,5; 5; 10; 100
Propamokarb-hidrohlorid	Previcur 607 SL	3,9; 7,81; 15,6; 31,2

Ispitivanja osetljivosti izolata obavljena su primenom metode inkorporacije fungicida u hranljivu KDA podlogu (Leroux i Gredt, 1972; Locher i Lorenz, 1991). Serije koncentracija dobijene su dispergovanjem fungicida u sterilnoj destilovanoj vodi. Razređenja fungicida su zatim, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, u sterilnim uslovima dodavana u rastopljenu KDA podlogu prethodno ohlađenu do 55 °C, pri čemu je odnos fungicida i podloge bio 1:9. Kao kontrola korišćena je KDA podloga u koju je umesto razređenja fungicida dodavana ista količina sterilne destilovane vode. Nakon homogenizacije, podloga je u sterilnim uslovima razlivana u Petri kutije prečnika 90 mm i posle hlađenja zasejavana ispitivanim izolatima.

Za zasejavanje su korišćeni fragmenti micelije prečnika 10 mm, uzeti sa ivice kolonije stare 2-15 dana (zavisno od izolata), odgajane na KDA podlozi pri temperaturi od 20-25 °C u mraku. Sterilnom kopljastom iglom fragmenti micelije su prenošeni u centar Petri kutije sa hranljivom podlogom u koju je prethodno inkorporirano odgovarajuće razređenje fungicida, kao i na podlogu u kontroli i to zasejavanjem po jednog isečka u Petri kutiju. Sva ispitivanja vršena su u četiri ponavljanja.

Zasejane Petri kutije inkubirane su pri temperaturi od 20-25 °C u mraku. Porast micelije meren je nakon 2-15 dana od zasejavanja (zavisno od izolata), odnosno kada micelija izolata ispuni približno 2/3 Petri kutije u kontroli. Očitavanje je vršeno merenjem prečnika kolonije u tri pravca, ne računajući prečnik zasejanog isečka, a dobijena srednja vrednost uzeta je kao vrednost porasta izolata na odgovarajućoj koncentraciji određenog fungicida.

Preliminarnim ispitivanjima sedam koncentracija svakog fungicida (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 i 1000 mg/l) određivan je opseg koncentracija kojima se postiže inhibicija porasta izolata između 5 i 95 % u poređenju sa kontrolom. Na osnovu dobijenih rezultata u preliminarnim istraživanjima određeni su intervali koncentracija fungicida za dalja ispitivanja (tabele 2-6). Za određivanje parametara osetljivosti korišćena je skala sa simetrično raspoređenim koncentracijama u utvrđenom opsegu kako bi se dobila što pouzdanija vrednost

koncentracije fungicida koja inhibira rast micelije 50 % u odnosu na kontrolu (EC<sub>50</sub>) (Robertson i sar., 1984).

### **3.5.1. Ispitivanje osetljivosti izolata na strobilurine u prisustvu salicilhidroksaminske kiseline (SHAM)**

Osetljivost izolata *V. dahliae*, *R. solani* i *P. aphanidermatum* na azoksistrobin ispitivana je metodom inkorporacije fungicida u KDA podlogu. U preliminarnim istraživanjima korišćeno je sedam različitih koncentracija azoksistrobina (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 i 1000 µg/ml). Međutim, nijedna od ispitivanih koncentracija nije inhibirala porast micelije u poređenju sa kontrolom u koju je dodata samo sterilna destilovana voda.

S obzirom da je u ispitivanjima osetljivosti patogena na fungicide koji remete proces disanja uočeno da pojedine vrste imaju sposobnost aktiviranja alternativnog puta ćelijskog disanja i nesmetanog razvoja (Ziogas i sar., 1997), u podlogu je pored fungicida dodavana salicilhidroksaminska kiselina (SHAM) koja inhibira terminalne oksidaze i time blokira alternativni put transporta elektrona u procesu disanja (Olaya i sar., 2001). Za svaki ispitivani izolat izvršena je provera toksičnosti SHAM-a, kako bi se utvrdilo pri kojoj koncentraciji ova supstanca ne utiče na porast patogena. Različite koncentracije SHAM-a od 0,001; 0,01; 0,10; 1; 10; 100 i 1000 mg/l inkorporirane su u KDA podlogu pri čemu je odnos mešanja rastvora SHAM-a i podloge bio 1:9. Kao kontrola korišćena je KDA podloga u koju je dodavana sterilna destilovana voda. Podloga je zatim razlivena u Petri kutije, a nakon hlađenja izvršeno je zasejavanje ispitivanih izolata. Najviša koncentracija SHAM-a pri kojoj ne dolazi do inhibicije porasta micelije izolata korišćena je za ispitivanje osetljivosti na strobilurine. Zatim je smeša SHAM-a i fungicida dodata u PDA podlogu u odnosu 1:9. Ispitivanje osetljivosti izolata na strobilurine obavljeno je na prethodno opisan način, s tim što je odnos mešanja SHAM-a, disperzije fungicida i KDA podloge bio 1:1:8, dok je u kontroli umesto disperzije fungicida korišćena sterilna destilovana voda.

### **3.5.2. Ocena parametara osetljivosti – obrada rezultata**

Dobijene vrednosti prosečnog porasta izolata svake ispitivane varijante (koncentracije fungicida) poređene su sa odgovarajućim prosečnim vrednostima u kontrolnim varijantama i na taj način su dobijeni procenti inhibicije porasta. Statistička obrada dobijenih podataka vršena je metodom probit analize (Finney, 1971; Lakić i Vukša, 1991). Za probit analizu su uzimani rezultati najmanje četiri koncentracije i preračunati na procenat inhibicije u odnosu na kontrolu. Određene su koncentracije koje inhibiraju porast micelije 50 % u odnosu na

kontrolu ( $EC_{50}$ ) i nagib regresione linije (b) (Finney, 1971). U tabelama su prikazane  $EC_{50}$  vrednosti i nagib regresione linije (b). Razlike u osetljivosti izolata određene su na osnovu preklapanja/nepreklapanja intervala poverenja za  $EC_{50}$  vrednosti.

### **3.5.3. Ispitivanje antagonističkog efekta bakterije *B. subtilis* soja Č13 na patogene gljive iz zemljišta *in vitro***

Ispitivan je efekat bakterije *B. subtilis* soja Č13 iz komercijalno dostupnog preparata Ekstrasol (Bisolbi Inter, Rusija) na izolate *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum* koji su u ovom ogledu korišćeni u obliku suspenzije micelije ili konidija.

Bakterija iz preparata Ekstrasol izolovana je metodom zasejavanja razređenja na KDA podlogu i gajena 72 h u tečnoj podlozi *Meynell* (30 g melase; 4 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ; 1 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ; 0,1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1 l destilovane vode) pri temperaturi od 28 °C uz konstantno mešanje na horizontalnoj mešalici brzinom od 240 rpm.

Sa ciljem dobijanja suspenzije micelije, izolati *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum*, odgajeni na KDA podlozi pri temperaturi od 20-24 °C u periodu 2-7 dana, zasejani su u tečnu podlogu od krompira i dekstroze (200 g krompira, 20 g dekstroze i 1 l destilovane vode – KDP) i gajeni 48 h uz mešanje na magnetnoj mešalici. Izolat *V. dahliae* korišćen je u vidu suspenzije konidija koncentracije  $10^6$  cfu/ml u sterilnoj destilovanoj vodi, dobijene od izolata gajenog 15 dana na KDA podlozi u mraku. U Petri kutije sa odgajenom kulturom dodavano je po 10 ml sterilne destilovane vode i po jedna kap Tween-a 20. Konidije patogena odvojene su od konidiofora sterilnom kopljastom iglom, a dobijena suspenzija je filtrirana kroz dvostruku gazu. Pre upotrebe, koncentracija konidija je podešena na  $10^6$  cfu/ml.

Po celoj površini prethodno razlivene i očvrсле KDA podloge (20 ml) u Petri kutiji homogeno je raspoređeno 7 ml suspenzije odabranih izolata pomešane sa toplom KDA podlogom u odnosu 1:3. U centralnom delu zasejanih podloga izbušeni su jamice prečnika 10 mm u koje je dodavano po 100  $\mu$ l suspenzije *B. subtilis* soja Č13. Za standardni tretman korišćena je disperzija odgovarajućih fungicida (*V. dahliae* – tiofanat-metil (0,1 %); *F. oxysporum* i *S. sclerotiorum* – prochloraz (0,08 %); *R. solani* – iprodion (0,3 %); *P. aphanidermatum* – propamokarb-hidrohlorid (0,15 %)), a za negativnu kontrolu sterilna destilovana voda. Ogled je izveden u četiri ponavljanja i ponovljen dva puta.



### 3.5.4. Ocena antagonističkog efekta soja bakterije *B. subtilis* – obrada rezultata

Ocenjivanje antagonističke aktivnosti bakterije *B. subtilis* soja Č13 vršeno je nakon inkubacije od 48 h pri 25 °C poređenjem širine zone inhibicije (mm) koja nastaje oko bunarčića u koji je dodata suspenzija bakterije *B. subtilis* soja Č13 i zone inhibicije nastale dodavanjem odgovarajućeg konvencionalnog fungicida.

### 3.6. Ispitivanje efikasnosti fungicida i biofungicida

U uslovima staklenika izvršeno je ispitivanje efikasnosti fungicida sa različitim mehanizmom delovanja, kao i dva biofungicida: Ekstrasol na bazi bakterije *B. subtilis* soj Č13 i Timorex Gold na bazi etarskog ulja čajnog drveta. U tabelama 7-11 prikazani su osnovni podaci o testiranim supstancama i radne koncentracije korišćene u ogledima.

**Tabela 7.** *Verticillium dahliae*. Korišćeni fungicidi

Aktivna supstanca	Preparat	Proizvođač	Koncentracija primene (%)
<i>B. subtilis</i>	Ekstrasol	Bisolbi Inter	1
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	Stockton	1
Tiofanat-metil	Funomil	Agromarket	0,1
Difenokonazol	Score 250-EC	Syngenta	0,05
Fluopiram	Luna Privilege	Bayer CropScience	0,1
Azoksistrobin	Quadris	Syngenta	0,075
Prothloraz	Spartak 450-EC	Sinochem Ningbo	0,08

**Tabela 8.** *Fusarium oxysporum*. Korišćeni fungicidi

Aktivna supstanca	Preparat	Proizvođač	Koncentracija primene (%)
<i>B. subtilis</i>	Ekstrasol	Bisolbi Inter	1
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	Stockton	1
Fluopiram	Luna Privilege	Bayer CropScience	0,1
Kaptan	Agrokaptan	Agromarket	0,3
Prothloraz	Spartak 450-EC	Sinochem Ningbo	0,08
Propikonazol	Bumper 25-EC	Magan Agrochemicals	0,03
Tiofanat-metil	Funomil	Agromarket	0,1

**Tabela 9.** *Sclerotinia sclerotiorum*. Korišćeni fungicidi

Aktivna supstanca	Preparat	Proizvođač	Koncentracija primene (%)
<i>B. subtilis</i>	Ekstrasol	Bisolbi Inter	1
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	Stockton	1
Boskalid	Cantus	Bayer CropScience	0,15
Fluopiram	Luna Privilege	Bayer CropScience	0,1
Kaptan	Agrokaptan	Agromarket	0,3
Prohloraz	Spartak 450-EC	Sinochem Ningbo	0,08
Tiofanat-metil	Funomil	Agromarket	0,1

**Tabela 10.** *Rhizoctonia solani*. Korišćeni fungicidi

Aktivna supstanca	Preparat	Proizvođač	Koncentracija primene (%)
<i>B. subtilis</i>	Ekstrasol	Bisolbi Inter	1
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	Stockton	1
Tiofanat-metil	Funomil	Agromarket	0,1
Iprodion	Kidan 250 SC	Bayer CropScience	0,3
Prohloraz	Spartak 450-EC	Sinochem Ningbo	0,08
Fluopiram	Luna Privilege	Bayer CropScience	0,1
Azoksistrobin	Quadris	Syngenta	0,075

**Tabela 11.** *Pythium aphanidermatum*. Korišćeni fungicidi

Aktivna supstanca	Preparat	Proizvođač	Koncentracija primene (%)
<i>B. subtilis</i>	Ekstrasol	Bisolbi Inter	1
Ulje čajnog drveta	Timorex Gold	Stockton	1
Azoksistrobin	Quadris	Syngenta	0,075
Fosetil-Al	Aliette flash	Bayer CropScience	0,5
Mankozeb	Mankogal 80 WP	Galenika fitofarmacija	0,25
Metalaksil	Ridomil gold 480 SL	Syngenta	0,03
Propamokarb-hidroklorid	Previcur 607 SL	Bayer CropScience	0,15

### 3.6.1. Priprema inokuluma

*V. dahliae*: Kao izvor inokuluma korišćena je čista kultura *V. dahliae* gajena na KDA podlozi pri temperaturi 25 °C u mraku (Marinković, 1985). Inokulum je pripremljen tako što je podloga sa kolonijom izolata starosti 15 dana iz jedne Petri kutije mlevana mikserom uz dodatak 100 ml destilovane vode do potpune homogenizacije. Tako pripremljen inokulum, korišćen je za inokulaciju biljaka paprike.

*F. oxysporum*: Zrno ječma prethodno inokulisano izolatom *F. oxysporum* korišćeno je kao izvor inokuluma. Za proizvodnju inokuluma korišćeno je 150 g zrna ječma koje je

zajedno sa 300 ml destilovane vode ostavljeno u kolbu (500 ml), da odstoji 24 časa. Nakon isteka ovog perioda sadržaj kolbe je promešan i autoklaviran (120 °C; 1,2 bara; 20 min). Posle autoklaviranja, u kolbe su uneti prethodno pripremljeni isecci micelije starosti 7 dana. Kolbe su potom unošene u termostat i čuvane pri temperaturi od 25 °C u trajanju od 2 nedelje, odnosno sve dok micelija nije u potpunosti prorasla supstrat. Tokom čuvanja kolbe su povremeno protresane da bi se sprečilo stvaranje kompaktne mase od semena ječma i gljive (Hashem i sar., 2010).

**S. sclerotiorum:** Inokulum *S.sclerotiorum* pripreman je po metodi Budge i Whipps (2001). Kao osnova inokuluma korišćeno je 25 g zrna pšenice koje je zajedno sa 50 ml destilovane vode ostavljano u kolbu (250 ml). Kolba je nakon toga blago protresana i odlagana u autoklav (121 °C; 1,2 bara; 20 min). Posle autoklaviranja u prohlađeni supstrat dodavani su isecci nedelju dana stare micelije *S. sclerotiorum*. Tako pripremljene kolbe su inkubirane u termostatu, bez prisustva svetlosti, pri temperaturi od 20 °C u trajanju od četiri nedelje. Tokom ovog perioda kolbe su povremeno protresane da ne bi došlo do stvaranja kompaktne mase od zrna pšenice i gljive. Posle četiri nedelje temperatura u termostatu je podešena na 4 °C i u takvim uslovima kolbe su čuvane još mesec dana. Nakon ovog perioda, u supstratu su uočene brojne sklerocije koje su sakupljane, prosušene i korišćene za inokulaciju biljaka paprike.

**R. solani:** Kao izvor inokuluma *R. solani* korišćeno je inokulisano zrno ječma (520 g) koje je zajedno sa 300 ml destilovane vode ostavljano u kolbu (1000 ml) da odstoji 24 h (Gaskill, 1968). Po isteku ovog perioda kolbe su odlagane u autoklav (120 °C, 1,2 bar; 20 min). Nakon autoklaviranja, u prohlađeno sterilisano zrno ječma su uneti delovi micelije *R. solani* starosti pet dana. Ovako pripremljene kolbe su inkubirane u termostatu bez prisustva svetlosti pri temperaturi od 25-26 °C i čuvane tri nedelje. Tokom perioda čuvanja kolbe su proveravane i povremeno protresane. Nakon ovog perioda, sadržaj kolbi je prebacivan u plitke posude i odlagan u termostat sa vazдушnim strujanjem pri temperaturi od 22-25 °C. Posle prosušivanja inokulum je samleven do veličine fragmenata od približno 3 mm i odlagan u papirne kese. Ovako pripremljen inokulum je do daljeg korišćenja čuvan u frižideru pri temperaturi 2-4 °C.

**P. aphanidermatum:** Kao izvor inokuluma *P. aphanidermatum* korišćeno je inokulisano zrno pšenice (20 g) koje je dodavano u kolbu (250 ml) zajedno sa 25 ml destilovane vode. Ovako pripremljene kolbe su odlagane u autoklav (120 °C; 1,2 bar; 20 min). Nakon autoklaviranja, u kolbe je dodavana micelija *P. aphanidermatum* starosti dva dana. Kolbe su zatim čuvane u termostatu 2-4 nedelje, bez prisustva svetlosti pri temperaturi

od 25 °C. Tokom ovog perioda, kolbe su povremeno proveravane i protresane u cilju sprečavanja zgrušavanja zrna pšenice i pseudogljive (Chellemi i sar., 2006).

### 3.6.2. Ispitivanje efikasnosti fungicida i biofungicida u uslovima staklenika

U cilju ispitivanja biološke efikasnosti proučavanih fungicida izvedena je serija ogleđa u uslovima staklenika. U ogleđima su korišćene saksije dimenzija 15 x 10 cm koje su punjene sa 500 ml gotovog sterilnog supstrata B Medium course (Floragard, Germany), a potom je u svaku saksiju presađivana po jedna mlada biljke paprike (cv. Novosadska babura) starosti 2-6 stalna lista. Jednu ispitivanu varijantu je činilo 5 saksija. U ovako pripremljene saksije je zatim dodavan inokulum proučavanih izolata patogena. U ogleđu u kome su ispitivani efekti preparata na pseudogljivu *P. aphanidermatum* korišćeno je 10 ponika paprike po saksiji. Ispitivani preparati su primenjivani zalivanjem neposredno nakon inokulacije u količini od po 100 ml po saksiji. Kontrolne biljke paprike (K) inokulisane su i zalivane sa 100 ml sterilne vode. Kao druga kontrola (AK) poslužile su biljke paprike koje su neinokulisane i zalivene sa 100 ml sterilne vode. Saksije su održavane u uslovima staklenika pri temperaturi od 24-30 °C, umerenom svetlosnom režimu od 8000-10000 lux-a i relativnoj vlažnosti od 70-90 %. Promene na biljkama su praćene svakodnevno, a konačna ocena intenziteta oboljenja obavljena je 7-45 dana nakon inokulacije određivanjem procenta preživelih biljaka kao i visine i sveže mase biljaka (*F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani*). U ogleđu u kome je korišćen inokulum *V. dahliae* pored visine i sveže mase biljaka merena je i dužina nekrotičnog dela ksilema korena i prizemnog dela stabla (NPDS). Utvrđivanje intenziteta oboljenja izvršeno je po skali: 0 – (0 %) bez vidljivih simptoma, 1 – (0-10 %) blago uvenuće donjeg lišća, 2 – (10-25 %) umereno uvenuće donjeg lišća, 3 – (25-50 %) umereno uvenuće lišća cele biljke, 4 – (50-75 %) – jako uvenuće lišća cele biljke i 5 – (75-100 %) uginule biljke (D'Ercole i sar., 2000; EPPO, 2004c). U ogleđima sa *P. aphanidermatum* svakodnevno je praćena pojava poleganja klijanaca, sve dok smrtnost u inokulisanoj netretiranoj kontroli nije dostigla 70 %.

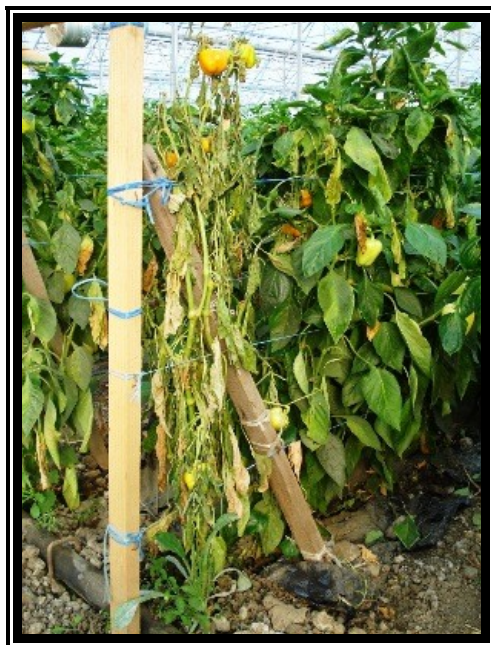
Ogledi su postavljeni po potpunom slučajnom blok sistemu sa četiri ponavljanja. Intenzitet oboljenja je izračunat po Townsend-Heuberger-u, efikasnost po Abbott-u, a za obradu rezultata korišćene su standardne statističke metode, analiza varijanse i Duncan-ov test (EPPO, 1997a; EPPO, 1997b).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Patogene gljive i pseudogljive

#### 4.1.1. Simptomi

Na obolelim biljkama paprike, sakupljenim sa više lokaliteta (Padinska Skela, Smederevska Palanka, Knjaževac i Šabac) uočeni su simptomi koji su se manifestovali u vidu uvenuća biljaka, truleži korena i prizemnog dela stabla, hloroze, nekroze, prevremenog opadanja listova, zakrčljivosti i uginuća biljaka. Kod biljaka sa simptomima „fuzarioznog” i „verticilioznog uvenuća” na uzdužnom preseku prizemnog dela stabla uočena je mrka obojenost sudovnog tkiva, a na pojedinim obolelim biljkama u uslovima visoke vlažnosti vazduha razvila se bela, vunasta micelija na prizemnom delu stabla, listovima i plodovima, a u nekim slučajevima uočeno je poleganje i propadanje sejanaca i mladih biljaka ubrzo nakon ostvarene infekcije (Slike 1-5).



**Slika 1.** *Verticillium dahliae*.  
„Verticiliozno uvenuće” biljke paprike  
u stakleniku – prirodna zaraza



**Slika 2.** *Verticillium dahliae*.  
Nekroza korena i ksilema – prirodna  
zaraza



**Slika 3.** *Sclerotinia sclerotiorum*.  
Trulež korena i prizemnog dela  
stabla mlade biljke paprike –  
prirodna zaraza



**Slika 4.** *Rhizoctonia solani*.  
Trulež korena i prizemnog dela  
stabla paprike – prirodna zaraza



**Slika 5.** *Pythium aphanidermatum*. Propadanje klijanaca  
paprike – prirodna zaraza

#### 4.1.2. Provera patogenosti izolata

Iz obolelih biljaka paprike, dobijen je veći broj izolata od kojih je za dalja istraživanja na osnovu morfoloških karakteristika odabrano pet. U zavisnosti od izolata, na inokulisanim biljkama paprike, nakon inkubacije od 7-45 dana pri temperaturi 20-25 °C, uočeno je uvenuće, trulež korena i poleganje biljaka. Na nadzemnim delovima obolelih biljaka

zapaženo je uvenuće i hloroza listova, trulež prizemnog dela stabla, nekroza sprovodnih sudova, kao i zaostajanje biljaka u porastu ili potpuno propadanje.

Nakon pojave simptoma na inokulisanim biljkama paprike, reizolacijom je potvrđeno da je to posledica patogene aktivnosti izolata (Slike 6-11).



**Slika 6.** Uvenuće biljke paprike 45 dana nakon inokulacije izolatom *Verticillium dahliae*



**Slika 7.** Biljka paprike zalivena vodom – negativna kontrola



**Slika 8.** Propadanje biljke paprike 15 dana nakon inokulacije izolatom *Fusarium oxysporum*



**Slika 9.** Propadanje biljke paprike 20 dana nakon inokulacije izolatom *Sclerotinia sclerotiorum*



**Slika 10.** Propadanje biljke paprike 15 dana nakon inokulacije izolatom *Rhizoctonia solani*



**Slika 11.** Propadanje biljke paprike sedam dana nakon inokulacije izolatom *Pythium aphanidermatum*

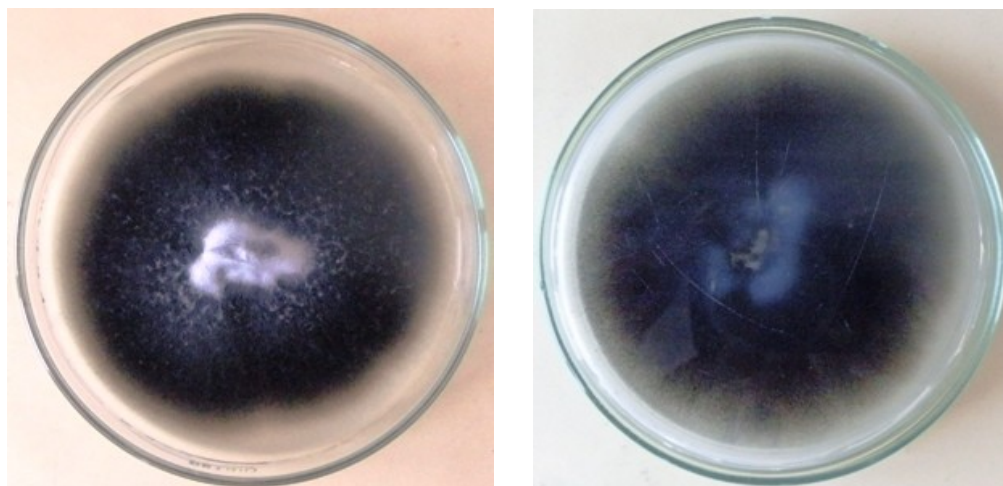
#### 4.1.3. Identifikacija izolata klasičnim metodama

Izolati su identifikovani na osnovu proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika kolonije odgajene na KDA podlozi.

Od morfoloških karakteristika posmatran je: tip micelije, izgled i boja kolonije, odlike ruba kolonije, prisustvo različitih tvorevina za rasejavanje i preživljavanje patogena, kao i lučenja pigmenta u podlogu.

*Verticillium sp.*: Na KDA podlozi izolat je u početku razvoja obrazovao belu koloniju, koja postepeno postaje tamna sa formiranim sitnim crnim sklerocijama (Slika 12). Micelija je dvojaka: substratna tamnomaslinaste i vazдушna bele boje. Izolat obrazuje konidije kao tvorevine za rasejavanje i mikrosklerocije kao tvorevine za preživljavanje. Konidiofore su bezbojne, verticiliozno razgranate sa bočno postavljenim fialidama koje su raspoređene u vidu spratova na nodusima. Konidije su jednoćelijske, bezbojne, okruglastoovalnog oblika (Slika 13). Na osnovu proučenih makroskopskih i mikroskopskih morfoloških karakteristika utvrđeno je da izolat pripada vrsti *V. dahliae*.



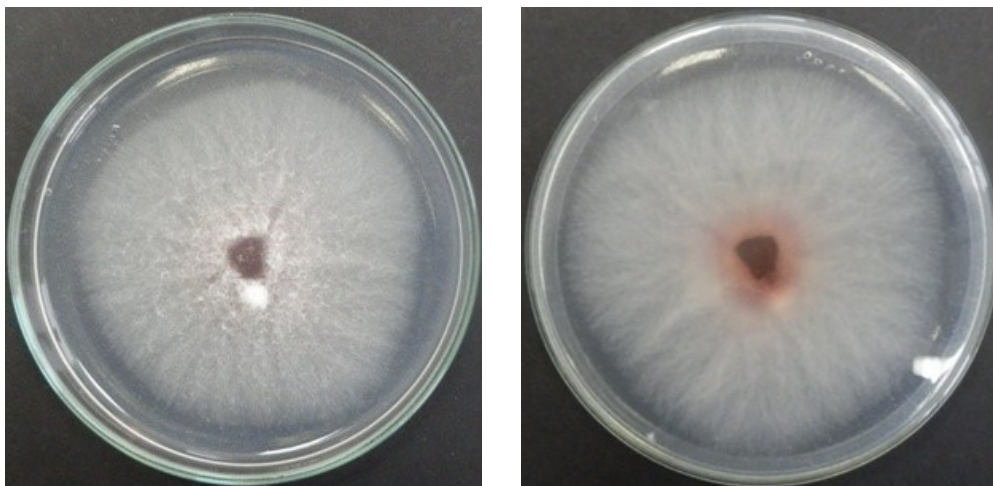


**Slika 12.** Izgled kolonije *Verticillium dahliae* s lica (levo) i naličja (desno) na KDA podlozi nakon inkubacije od 15 dana pri temperaturi od 25 °C



**Slika 13.** *Verticillium dahliae*. Izgled zrelih mikrosklerocija (100 x)

***Fusarium* sp.:** Gajenjem na KDA podlozi izolat formira belu vazдушnu ujednačeno-pamučastu miceliju koja, sedam dana nakon zasejavanja, pri temperaturi od 25 °C u odsustvu svetlosti, obrazuje koloniju prečnika 7 cm. Tri do pet dana od zasejavanja uočava se ružičasto-ljubičasti pigment u hranljivoj podlozi (Slika 14). Prisustvo konidija na KDA podlozi nije zapaženo. Međutim, na SNA podlozi u kulturi starosti pet dana uočene su blago srpaste izdužene i uske makrokonidije, sa tri poprečne pregrade, kao i jednoćelijske izduženo-ovalne mikrokonidije (Slika 15). Na osnovu proučavanih karakteristika utvrđeno je da ispitivani izolat pripada vrsti *F. oxysporum*.

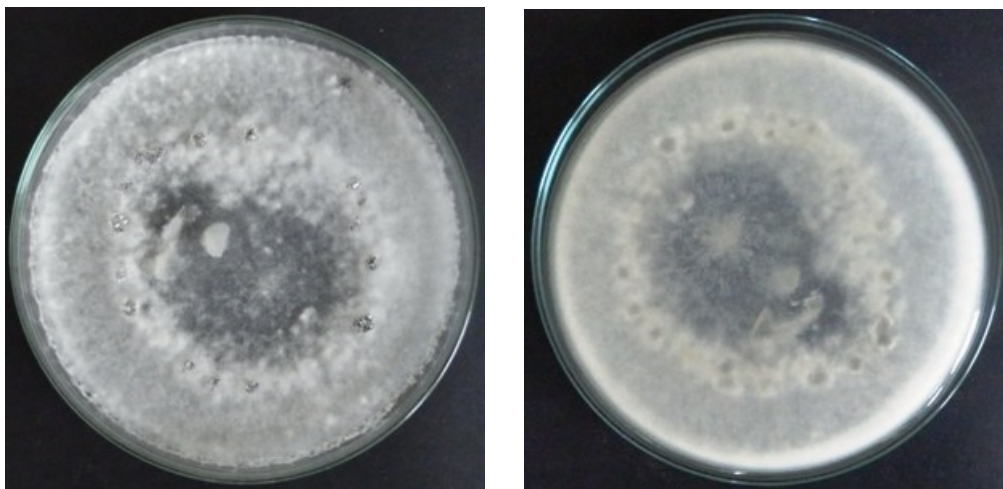


**Slika 14.** Izgled kolonije *Fusarium oxysporum* s lica (levo) i naličja (desno) na KDA podlozi nakon inkubacije od sedam dana pri temperaturi 25 °C

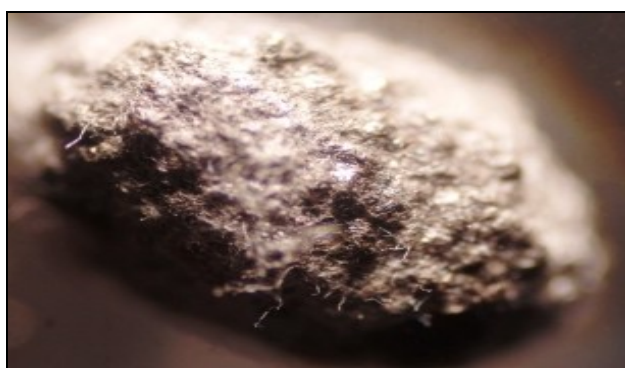


**Slika 15.** *Fusarium oxysporum*. Izgled mikro- i makrokonidija (x 100)

***Sclerotinia* sp.:** Izolat gajen na KDA podlozi pri temperaturi od 25 °C i bez prisustva svetlosti formira dobro razvijenu belu miceliju koja je u početku homogena i vazдушna, dok se kasnije zapažaju pamučaste radijalno raspoređene nakupine hifa (Slika 16). Četiri dana posle zasejavanja u miceliji se uočavaju sklerocije – crne tvorevine, nepravilnog oblika, veličine 1,5-7 x 2-15 mm (Slika 17). Na osnovu proučavanih karakteristika utvrđeno je da izolat pripada vrsti *S. sclerotiorum*.

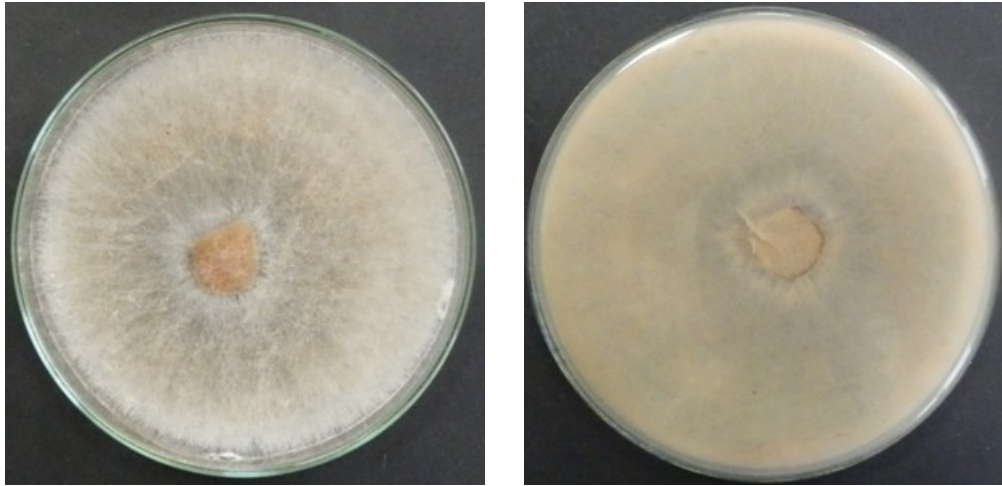


**Slika 16.** Izgled kolonije *Sclerotinia sclerotiorum* s lica (levo) i naličja (desno) na KDA podlozi nakon inkubacije od pet dana pri temperaturi 20 °C



**Slika 17.** *Sclerotinia sclerotiorum*.  
Izgled sklerocije (x 10)

***Rhizoctonia* sp.:** Prilikom izolacije i preliminarnog utvrđivanja karakteristika proučavani izolat je pri gajenju na KDA podlozi ispoljio tipične karakteristike kompleksa *R. solani*, što podrazumeva zrakast raspored hifa na kojima se uočavaju zone različite obojenosti micelije, grananje hifa pod pravim uglom u blizini distalne septe, sužavanje hifa i formiranje septe (Slika 19). Zapaženo je da je micelija brzorastuća, svetlobraon boje i ravnog oboda. Tri dana posle zasejavanja uočava se koncentrična zoniranost (Slika 18). Na osnovu proučavanih karakteristika utvrđeno je da izolat pripada vrsti *R. solani*.

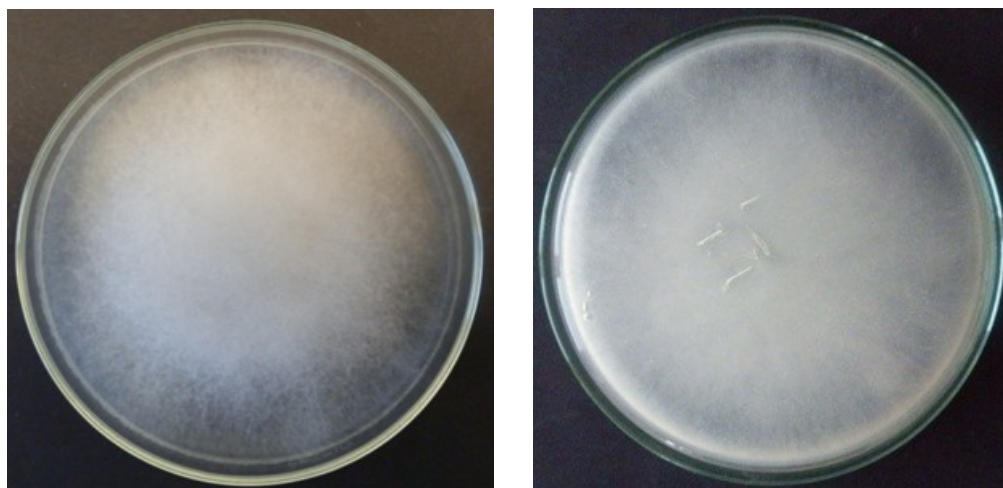


**Slika 18.** Izgled kolonije *Rhizoctonia solani* s lica (levo) i naličja (desno) na KDA podlozi nakon inkubacije od četiri dana pri temperaturi od 20 °C

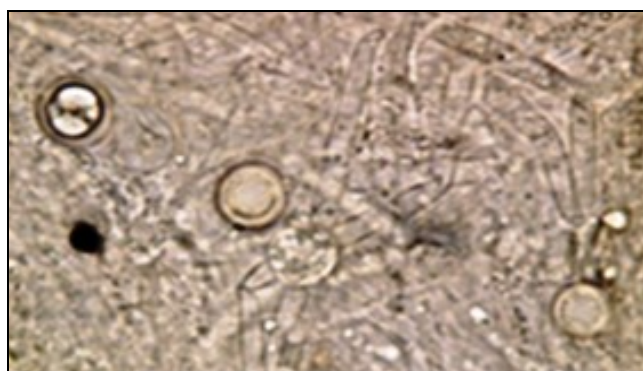


**Slika 19.** *Rhizoctonia solani*.  
Grananje micelije na vodenom agaru (x10)

***Pythium* sp.:** Na KDA podlozi izolat je obrazovao dobro razgranatu, gustu, vazдушnu miceliju bele boje (Slika 20). Pri temperaturi od 20 °C i u odsustvu svetlosti, micelija u potpunosti ispunjava površinu Petri kutije prečnika 90 mm za 48 h. „Topljenje micelije“, koje se uočava tri nedelje nakon zasejavanja, praćeno je formiranjem oospora sa glatkim debelim zidovima (Slika 21). Na osnovu proučavanih karakteristika izolat je preliminarno identifikovan kao *P. aphanidermatum*.



**Slika 20.** Izgled kolonije *Pythium aphanidermatum* s lica (levo) i naličja (desno) na KDA podlozi nakon inkubacije od sedam dana pri temperaturi od 20 °C



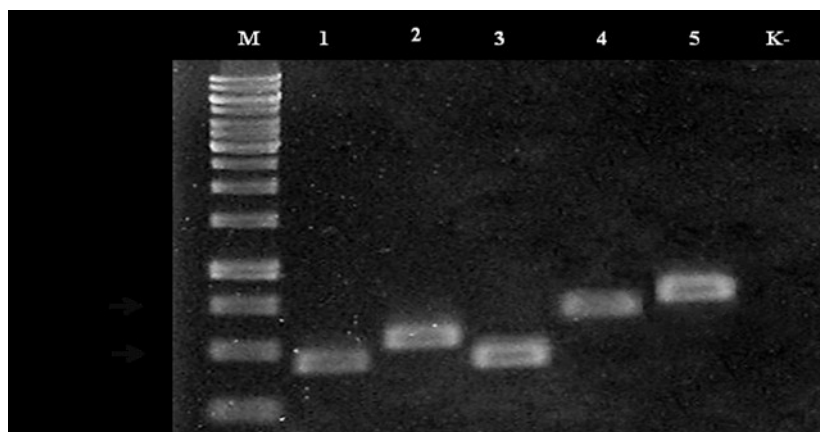
**Slika 21.** *Pythium aphanidermatum*. Oospore sa glatkim debelim zidovima na KDA podlozi (x 100)

#### 4.1.4. Molekularna identifikacija

Identifikacija patogena potvrđena je na osnovu analize sekvence amplikona ITS regiona rDNK, dobijenog korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1 i ITS4 (White i sar., 1990). Kao rezultat lančane reakcije polimeraze amplifikovani su fragmenti nukleinske kiseline veličine: 450-500 bp za *V. dahliae*; 600-650 bp za *F. oxysporum*; 550 bp za *S. sclerotiorum*; 700 bp za *R. solani*; 800 bp za *P. aphanidermatum* (Slika 22). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.

U cilju molekularne identifikacije, uspešno je amplifikovan i sekvencioniran ITS genomni region proučavanih izolata. Nakon sekvencioniranja amplikona i njihove obrade, višestrukim poređenjem sa dostupnim sekvencama odgovarajućeg regiona genoma gljiva u

GenBank bazi podataka, kao i proračunom genetičke sličnosti pomoću BLAST analize i softverskog paketa MEGA 5 obavljena je potvrda identifikacije izolata (tabela 12).



**Slika 22.** Amplifikacija DNK fragmenta veličine 450-800 bp: M = marker 1 kb sa fragmentima veličine: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000; 1 = izolat *Verticillium dahliae*; 2 = izolat *Fusarium oxysporum*; 3 = izolat *Sclerotinia sclerotiorum*; 4 = izolat *Rhizoctonia solani*; 5 = izolat *Pythium aphanidermatum*; K- = negativna kontrola;

**Tabela 12.** Pregled sekvenci izolata dobijenih u ovom radu

Izolat	Sekvenca ITS regiona	GenBank pristupni brojevi izolata sa kojim je nukleotidna identičnost 100 %
<i>V. dahliae</i>	CGAGCTGTAACACTACTACGCAAGGAAGGGCCACCGGGTCCGCCAC TGCTTTAAAGGGCCTACAGACGTAGATCCCCAACACCGGGCCACT GGGGCTCGAGGGTTGAAACGACGCTCGGACAGGCATGCCTCCCG ATACTGGAAGGCATGTGCGTTCAAAGATTCATGATCACTGAA TTCTGCAATTCACACTACATATGCGTTTCGCTGCCTTCTTCTCGA TGCTAGAGCCAGAGATCCGCTGTTAAAAGTTTAATAGTTCGCTG AACACTCAGAACTATCGGTGGCCTAAACAGACACACTGATGGAC CGGCGGGCTCG	KC156634.1 AB551208.1 AB551207.1 AB551207.1 FJ551188.1
<i>F. oxysporum</i>	CTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTTTCCTACCTGATC CGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCGCGA CGATTACCAGAACGAGGGTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGA CGTGACCGCAATCAATTGAGGAACGCGAATCGCGAGTCCCAA CACCAAGCTGTGCTTGAAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCAT GCCCCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCG ATGATCACTGAATTCGCAATTCACATTAATGCAATTTGCTG CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAAGTT TTGATTTATTAGGTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAAACAGAG TTTAGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCTCCGTTTACCAGGAGCGGGC TGATCCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGA GTTGTAACCTCGGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAAG TCT	EF495230.1 JF776163.1 JX045827.1 KC254032.1
<i>S. sclerotiorum</i>	AAAAANNANNANNNTTCCNNTCTGATCCGAGGTCACCATAGA AAATTTGGGTTTGGCAGAAGCCACCGAGAAGTGAACGAGAGA TATTACTACGTTACAGACCCAGCGGGCCGCGCCACTGATTTAGAG CCTGCCATTACTGACATGACTAATACCAAGCTGAGCTTGAGGGT TGAAATGACGCTCGAACAGGATGCCCCCGGAATACCAAGGGGC GCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCATGAAATTCGCAATC	GQ375746.1

	ACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTCTTCATCGATGCAGAACC AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTAATAGTACTCAGAC GACATTAATAAAAAAGAGTTTTGATATTCTCTGGCGAGCATAACA GCCCCGAAGAGCAGCTCGCCAAAAGCAACAAAAGTAATAATACAA AGGGTGGGAGGTCTACCCTTTCGGGCATGAACTCTGTAATGATCC TTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGCCACCATTTTAGGAATTTCTCT CGCCTGAGTAAACCTATTCGGTTAAGAATTATTAACACTGTTTTTT TACTGATACGTAATTCATCAGTGGTATAATACCTCAAATTTGTT AAAAATATTATTTTTGAGATCCCACGTTGGTGAGAAAAATAAA ACTTTTACTCCATATCGAGAGAATTCTATCATCGGGAAAGAAACC ACTAAAGCGGCGGGTCTGTTGATCAGCACTAGTCGTCGTATTTT CAAAATTATCAAGATGTAGTGGGCAATGGATATCAGCGTGTGTGT CTGAGCACCTCTATTTCAACATAAAAAAATTGAAGATTGAGACCA CTTGAATTGTCGGGAGGTCATGATATTGGGCTGCATCCCGTGT CCCAAANAA	
<i>R. solani</i>	NNNNNNNNNGNNNNNACCTGATTTGAGATCAGATCATAAAGGTA TTGTCCAAGTCAATGGACTATTAGAAGCGGTTTCATCTGCATTTAC CTTGCCACCTTTTACAGTGTCTCAGCGATAGATAATTTATCAC GCCGAGTGGAAACCAAGCATAACACTGAGATCCAGCTAATGCACA AAGAGGAGCAGGTGTGAAGCTGCAAAAAGACCTCCAATACCAAAG TGAACCAAAATGAATTAACAAAAGATTTACTTTGAAGAATTTAC ATACTCAAAACAGGCATGCTCCAAGGAATACCAAGGAGCGCAAGG TGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATT ACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAGCCAAGA GATCCGTTGTTGAAAATTAGTATGAGATGTGTTACATCCATTACA TTCGTTTTAAAAATTAATTGAGTTTGTATTAATTGAGTAGACAGAG GGTCCAATAACCTATTGCCTTTGTATTCCAAAAAGCAACAAGTAA ATTCCCATCTGTCTCACAGGTTTACAGGTGTGTGTGGGATGAAA GAGGAAGGTGTGCACATGCCAAAATAAATGGGCCAGTACAACC AAACTCTTCAATTAATAATCAATAATGATCCTTCCGCAGGTTCCCC TACGGAAGNAGGGGAAAATTATTGAAAGTTAATGAAAAAGTTT GGTTGTAGCTGGCCCATTTATTTGGGCATGTGCAACTTCTCTTTCA TCCACACACACCTGTGAACCTGTGAGACAGATGGGGAATTTACGT GTTGCTTTTTTGGAAATACAAGGCATTAGGTTTTATTGGGACTCGNCG CTCATTTAGTACTAGTCGTGAGAGTCTGAAAGAAGATATGGGATG TAACAATCTAACAAGTTTACAACGGATCTTTGGGTCACAGCAGC TANNCGGGCATAGTTTCATATAGAGTGTATTTNNNAATTTGCGG AANCTCTGAATCTGTGAAGCCTGGGCCATGGANTNNCNGNNNCG GGANNNN	JF792354.1 FM867592.1 FM616871.1 JQ616871.1
<i>P. aphanidermatum</i>	TGACCGTTGAATCATGTTCTGTGCTCTCTTTCGGGAGGGCTGAAC GAAGGTGGGCTGCTTAATGTAGTCTGCCGATGATTTTTCAAAC CCATTACCTAATACTGATCTATACTCCAAAAACGAAAGTTTATG GTTTTAATCTATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCA CATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTG CAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTT CGGGTTATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA ACTTGCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGGAGAGAGATGGCAGAA TG	FJ374878.1

Izolat *V. dahliae* ispoljio je 100 % sličnosti sa četiri izolata *V. dahliae* iz GenBank baze podataka poreklom iz Kine izolovanim sa pamuka (pristupni brojevi KC156634; KC156634.1; AB551208.1; AB551207.1 i AB551207.1) i sa jednim izolatom poreklom iz Italije izolovanim sa *Vinca rosea* (FJ572050.1). Za izolat *F. oxysporum* ustanovljena je nukleotidna identičnost od 100 % sa dva izolata *F. oxysporum* iz Kine poreklom sa *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* i *Paris polyphylla* var. *chinensis* (EF495230.1 i JF776163.1), sa jednim izolatom poreklom iz SAD izolovanim sa *Fragaria chiloensis* (JX045827.1) i jednim izolatom iz Grčke (KC254032.1). Izolat *S. sclerotiorum* ispoljio je nukleotidnu identičnost od 100 % sa izolatom *S. sclerotiorum* iz Italije izolovanim sa *Petunia hybrida* (GQ375746.1). Izolat *R. solani* bio je 100 % sličan sa četiri izolata *R. solani* dobijena iz biljaka duvana poreklom iz Argentine (JF792354.1 i FM867592.1) i Turske (FM616871.1 i JQ616871.1).

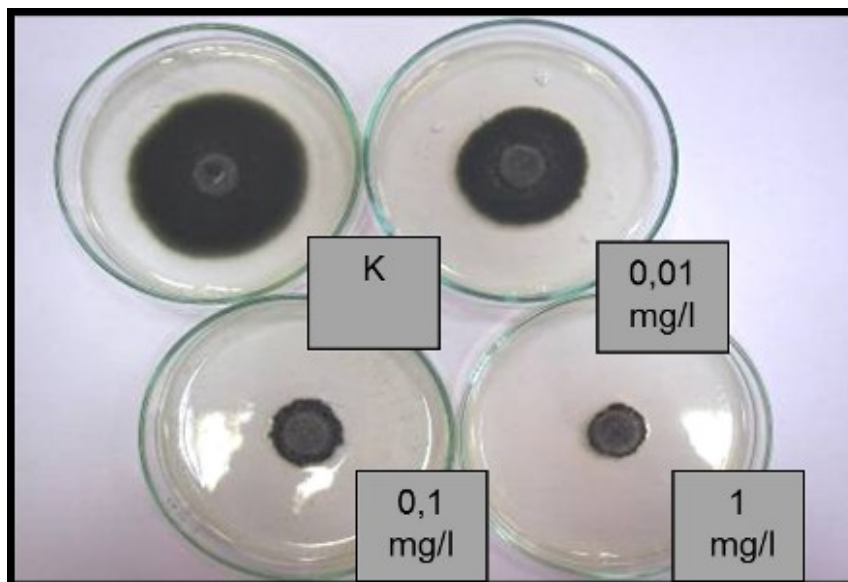
Izolat *P. aphanidermatum* ispoljio je 100 % nukleotidne identičnosti sa izolatom *P. aphanidermatum* dobijenim iz Porto Rika.

Dobijeni rezultati analize ITS regiona proučavanih izolata saglasni su rezultatima dobijenim na osnovu morfoloških karakteristika, pa je i na osnovu sekvence ITS regiona potvrđeno da proučavani izolati pripadaju vrstama: *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum*.

## 4.2. Efekti fungicida i biofungicida na patogene gljive iz zemljišta

### 4.2.1. *V. dahliae*

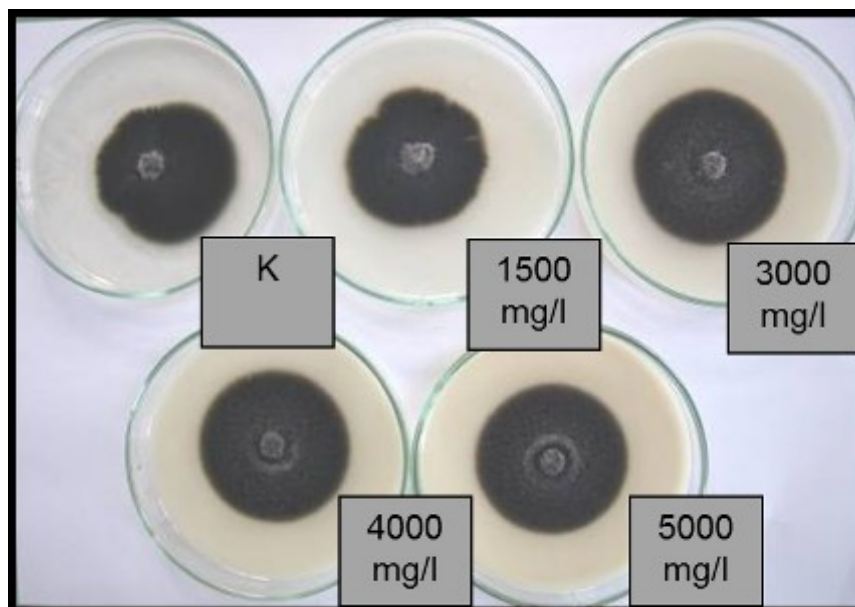
*In vitro*: Pri ispitivanju osetljivosti izolata *V. dahliae* na prohloraz korišćen je interval koncentracija od 0,01 do 1 mg/l. Najniža koncentracija od 0,01 mg/l inhibirala je porast micelije izolata preko 30 % u odnosu na kontrolu, dok je najviša ispitivana koncentracija (1 mg/l) ispoljila jako inhibitorno delovanje koje je iznosilo 83,2 % (Slika 23).



Slika 23. Porast izolata *Verticillium dahliae* na podlozi sa prohlorazom

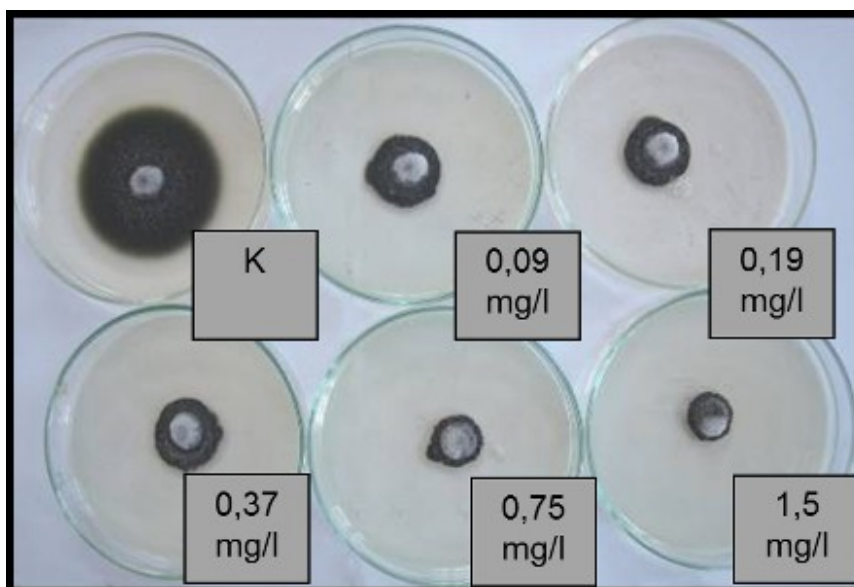
Na podlozi u koju je dodat fluopiram u koncentraciji od 1500 do 5000 mg/l nije zabeležena inhibicija porasta micelije izolata *V. dahliae* (Slika 24).





**Slika 24.** Porast izolata *Verticillium dahliae* na podlozi sa fluopiramom

Pri koncentracijama difenokonazola u intervalu od 0,09 do 1,5 mg/l, zabeležena je inhibicija porasta micelije *V. dahliae* 5-95 % u odnosu na kontrolu. Ispitivanje uticaja različitih koncentracija pokazalo je njegovu visoku toksičnost i u niskim koncentracijama. Najniža ispitivana koncentracija od 0,09 mg/l inhibirala je porast izolata za 65,6 % u odnosu na kontrolu, dok je pri koncentraciji od 0,75 mg/l inhibicija porasta bila preko 80 % (Slika 25).

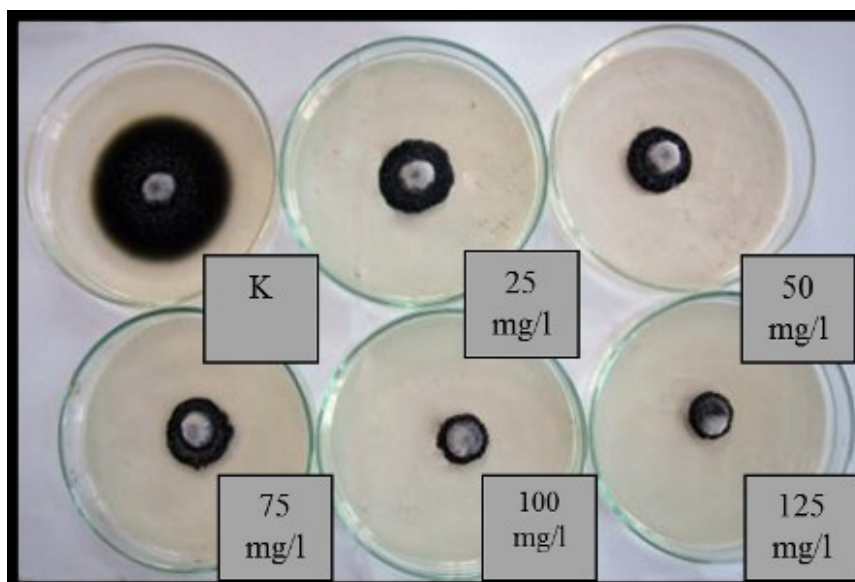


**Slika 25.** Porast izolata *Verticillium dahliae* na podlozi sa difenokonazolom

U ispitivanjima osetljivosti izolata *V. dahliae* na azoksistrobin dodavana je salicilhidroksaminska kiselina (SHAM) u cilju eliminisanja efekta lažne rezistentnosti.

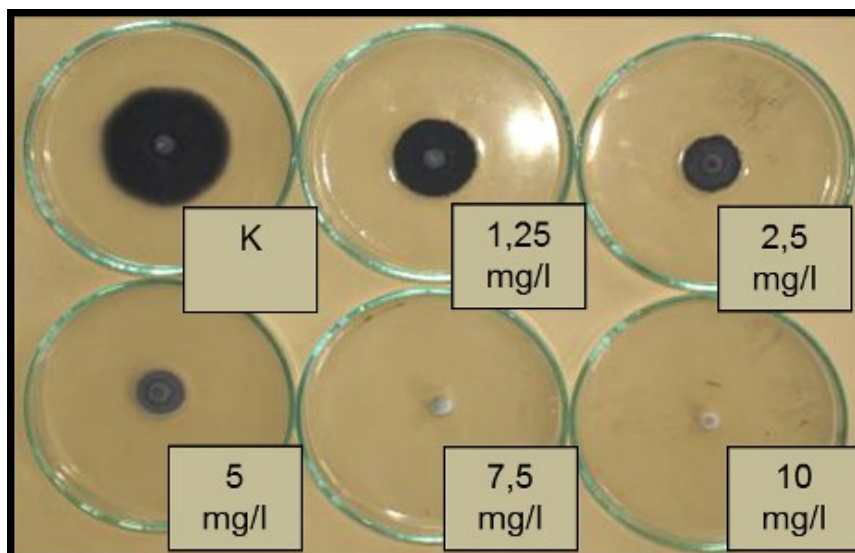
Testovima toksičnosti SHAM-a za izolat *V. dahliae* utvrđeno je da koncentracija od 0,1 mg/l ne remeti porast micelije izolata, pa je ova koncentracija odabrana za korišćenje u testu toksičnosti azoksistrobina za *V. dahliae in vitro*.

U intervalu koncentracija azoksistrobina od 25 do 125 mg/l zabeležena je inhibicija porasta micelije izolata *V. dahliae* u rasponu 5-95 %. Pri koncentraciji od 25 mg/l utvrđena je inhibicija porasta micelije od 30,1 % u odnosu na kontrolu. Za najvišu korišćenu koncentraciju od 125 mg/l inhibicija je iznosila 90,1 % (Slika 26).



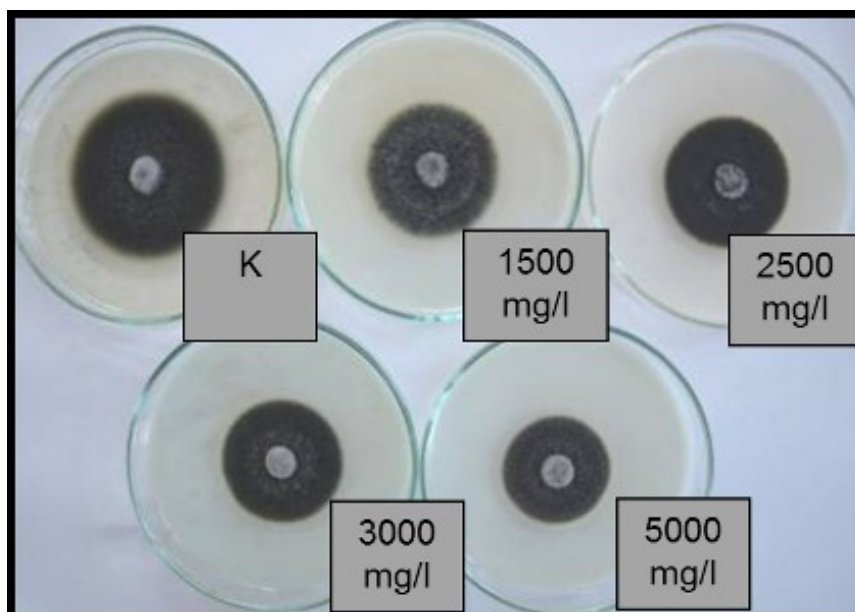
**Slika 26.** Porast izolata *Verticillium dahliae* na podlozi sa azoksistrobinom

Pri ispitivanju osetljivosti *V. dahliae* na tiofanat-metil korišćen je interval koncentracija od 1,25 do 10 mg/l. Najniža koncentracija od 1,25 mg/l inhibirala je porast izolata *V. dahliae* 32,6 %, dok je najviša koncentracija tiofanat-metila (10 mg/l) ispoljila i najveće inhibitorno delovanje od 90,1 % u odnosu na kontrolu (Slika 27).



Slika 27. Porast izolata *Verticillium dahliae* na podlozi sa tiofanat-metilom

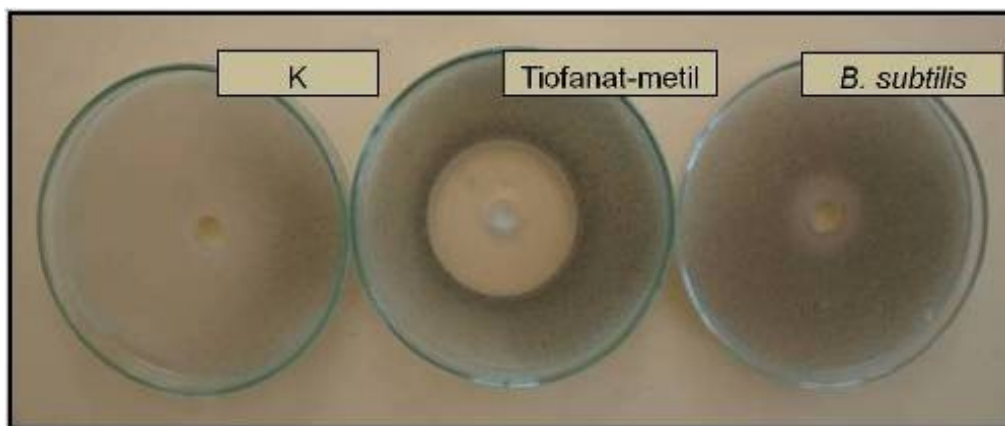
Za proučavanje toksičnosti ulja čajnog drveta *in vitro* korišćen je interval koncentracija od 1500 do 5000 mg/l. Porast micelije izolata *V. dahliae* koji je izlagan delovanju ulja čajnog drveta u koncentraciji od 1500 mg/l bio je inhibiran 14,3 %, dok je najviša ispitivana koncentracija od 5000 mg/l ispoljila inhibitorno delovanje od 64,6 % (Slika 28).



Slika 28. Porast izolata *Verticillium dahliae* na podlozi sa uljem čajnog drveta

Ocenjivanje antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *B. subtilis* vršeno je nakon inkubacije od 48 h pri temperaturi od 25 °C merenjem prečnika zone inhibicije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen

standardni fungicid. Širina inhibitorne zone koja je nastala u tretmanu tiofanat-metilom za izolat *V. dahliae* iznosila je 52,75 mm, dok u tretmanu sa ispitivanim sojem bakterije *B. subtilis* ova zona nije bila uočljiva. Međutim, porast micelije u zoni dejstva nije bio potpuno zaustavljen već je uočena zona delimične inhibicije porasta micelije prečnika 16 mm (Slika 29).



**Slika 29.** Antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *Bacillus subtilis* na izolat *Verticillium dahliae*

Vrednosti parametara osetljivosti ( $EC_{50}$  vrednost i regresioni koeficijent  $b$ ) za izolata *V. dahliae* prikazane su u tabeli 13.

**Tabela 13.** Osetljivost izolata *Verticillium dahliae* na fungicide i biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

Ispitivana jedinjenja	Parametar apsolutne osetljivosti $EC_{50}$ (mg/l)		b
	Vrednost	Opseg	
Ulje čajnog drveta	1507,65	1351,73-1681,93	3,46±0,36
Prohloraz	0,03	0,02-0,06	0,66 ±0,98
Fluopiram	>5000	*NO	*NO
Difenokonazol	0,02	0,0004-0,05	0,51±0,14
Azoksistrobin	71,95	61,05-89,56	2,19±0,33
Tiofanat- metal	3,48	3,03-3,87	2,72±0,30

\*NO – nije određeno

Difenokozol i prohloraz bili su najtoksičniji fungicidi u laboratorijskim uslovima ispitivanja za izolat *V. dahliae*. Vrednost srednje efektivne koncentracije od 0,02 mg/l ustanovljena je za difenokonazol, kao i najniža relativna osetljivost ( $b = 0,51$ ). Za prohloraz

dobijena je vrednost  $EC_{50}$  od 0,03 mg/l. Vrednost srednje efektivne koncentracije za tiofanat-metil iznosila je  $EC_{50} = 3,48$  mg/l, dok je vrednost regresionog koeficijenta  $b$  iznosila 2,72.

Izolat *V. dahliae* u laboratorijskim testovima nije pokazao osetljivost na fluopiram. Pri koncentraciji od 5000 mg/l nije bilo inhibicije porasta micelije u odnosu na kontrolu. Za izolat *V. dahliae* utvrđena je veoma niska osetljivost na biofungicid na bazi ulja čajnog drveta, sa izuzetno visokom vrednošću srednje efektivne koncentracije od 1507,65 mg/l. Za isti izolat ustanovljena je i najveća relativna osetljivost. Vrednost regresionog koeficijenta iznosila je 3,46. Nisku toksičnost za izolat vrste *V. dahliae* ispoljio je azoksistrobin, sa vrednošću  $EC_{50} = 71,95$  mg/l, a vrednost regresionog koeficijenta  $b$  za ovaj izolat iznosila je 2,19.

**In vivo:** U tabeli 14 prikazani su rezultati proučavanja efikasnosti fungicida i biofungicida, primenjenih u fenofazi kada je razvijeno šest i više listova na glavnom stablu, u sprečavanju pojave „zelenog uvenuća” prethodno inokulisanih biljaka paprike. Intenzitet oboljenja u inokulisanoj kontrolnoj varijanti (K) iznosio je 65 % u odnosu na neinokulisanu kontrolu (Slika 37). Najniži intenzitet oboljenja (11 %) zabeležen je u varijanti gde je primenjivan tiofanat-metil (Slika 32). U varijantama primene preparata na bazi fluopirama (Slika 34), prochloraza (Slika 36) i difenokonazola (Slika 33) intenzitet oboljenja je iznosio 16-19 %. Umeren intenzitet oboljenja utvrđen je u varijantama primene preparata na bazi ulja čajnog drveta (35 %) (Slika 31), *B. subtilis* (42 %) (Slika 30) i azoksistrobina (50 %) (Slika 35). Od ispitivanih varijanti, najveću efikasnost ispoljio je preparat na bazi tiofanat-metila (83,1 %), a najmanju na bazi azoksistrobina (23,1 %) i *B. subtilis* (35,4 %). Između difenokonazola, fluopirama i prochloraza nije postojala statistički značajna razlika u pogledu intenziteta oboljenja.

**Tabela 14.** *Verticillium dahliae*. Intenzitet oboljenja i efikasnost (E) fungicida

Ispitivana jedinjenja	Konc. primene (%)	Intenzitet oboljenja (%)		Efikasnost (%)
		Ms	Sd	
<i>B. subtilis</i>	1,00	42,00 c	25,10	35,40
Ulje čajnog drveta	1,00	35,00 bc	13,70	46,20
Tiofanat-metil	0,10	11,00 a	8,90	83,10
Difenokonazol	0,05	19,00 ab	8,20	70,80
Fluopiram	0,10	16,00 ab	8,20	75,40
Azoksistrobin	0,075	50,00 cd	25,00	23,10
Prochloraz	0,08	17,00 ab	21,10	73,80
K	-	65,00 d	13,70	0,00
AK	-	0,00 a	0,00	100,00

LSD<sub>005</sub> = 21,51

LSD<sub>001</sub> = 28,82

U tabeli 15 prikazani su podaci o visini, svežoj masi biljaka paprike i dužini nekrotiranog dela na prizemnom delu stabla (NPDS). U kontrolnoj varijanti (K) visina biljaka je iznosila 12,2 cm, a u varijanti netretiranih i neinokulisanih biljaka (AK) 32,8 cm (Slika 38). U varijantama primene preparata na bazi ulja čajnog drveta (9 cm) i *B. subtilis* (10,4 cm) zabeležena je najmanja visina biljaka. Najveća dužina biljaka utvrđena je u varijantama u kojima su primenjivani preparati na bazi difenokonazola (26,6 cm) i tiofanat-metila (24,6 cm). Između ispitivanih preparata na bazi *B. subtilis* i azoksistrobina (11,5 cm) nije zabeležena statistički značajna razlika u visini biljaka paprike.

Prosečna vrednost sveže mase biljaka paprike u kontroli (K) iznosila je 1,72 g. U odnosu na masu netretiranih i neinokulisanih biljaka paprike (AK) (11,34 g) u varijantama primene preparata na bazi difenokonazola (7,97 g), tiofanat-metila (7,37 g) i prohloraza utvrđene su statistički značajno manje vrednosti ovog parametra. Niske vrednosti mase biljaka utvrđene su u varijantama primene preparata na bazi *B. subtilis* (2,63 g) i ulja čajnog drveta (1,72 g). U varijantama gde su primenjivani preparati na bazi azoksistrobina, ulja čajnog drveta i *B. subtilis* nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na inokulisane i netretirane kontrolne biljke.

Dužina nekrotiranog prizemnog dela stabla (NPDS) biljaka paprike u kontrolnoj varijanti (K) iznosila je 2,3 cm. Najniže vrednosti ovog parametra utvrđene su u varijantama primene preparata na bazi difenokonazola (0,06 cm), tiofanat-metila (0,45 cm) i prohloraza (0,45 cm). Između ovih varijanti nije postojala statistički značajna razlika u vrednostima NPDS. U varijantama primene preparata na bazi ulja čajnog drveta (2,25 cm) i *B. subtilis* (1,3 cm) utvrđene su najviše vrednosti NPDS. Između inokulisanih i netretiranih biljaka paprike i varijante primene preparata na bazi ulja čajnog drveta nije utvrđena statistički značajna razlika.

**Tabela 15.** *Verticillium dahliae*. Visina, masa i nekroza prizemnog dela stabla biljaka paprike

Ispitivana jedinjenja	Konc. primene (%)	Dužina biljaka (cm)		Masa biljaka (g)		Nekroza (cm)	
		Ms	Sd	Ms	Sd	Ms	Sd
<i>B. subtilis</i>	1,00	10,40 ab	7,52	2,63 a	1,33	1,30 c	0,84
Ulje čajnog drveta	1,00	9,00 a	2,24	1,72 a	0,68	2,25 d	0,75
Tiofanat-metil	0,10	24,60 de	2,07	7,37 cd	2,76	0,45 ab	0,32
Difenokonazol	0,05	26,60 ef	2,97	7,97 d	1,46	0,06 ab	0,13
Fluopiram	0,10	17,30 bc	7,51	3,94 ab	1,51	0,75 bc	0,43
Azoksistrobin	0,075	11,50 b	5,09	1,98 a	0,58	1,25 c	0,56
Prothloraz	0,08	19,00 cd	6,16	5,32 bc	3,46	0,45 ab	0,32
K	-	12,20 abc	6,73	1,72 a	1,06	2,30 d	0,57
AK	-	31,80 f	1,30	11,34 e	1,65	0,00 a	0,00

LSD<sub>005</sub> = 6,83    LSD<sub>001</sub> = 9,15    LSD<sub>005</sub> = 2,09    LSD<sub>001</sub> = 2,69    LSD<sub>005</sub> = 0,66    LSD<sub>001</sub> = 0,89

Utvrđena je statistički značajna korelacija između visine i mase biljaka ( $r = 0,98$ ), efikasnosti i visine biljaka ( $r = 0,81$ ), kao i efikasnosti i mase biljaka ( $r = 0,84$ ). Negativna korelacija utvrđena je između NPDS i dužine biljaka ( $r = - 0,87$ ), NPDS i mase biljaka ( $r = - 0,86$ ) i NPDS i efikasnosti ( $r = - 0,84$ ).



**Slika 30.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi *Bacillus subtilis* u koncentraciji od 1 %



**Slika 31.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi ulja čajnog drveta u koncentraciji od 1 %



**Slika 32.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi tiofanat-metila u koncentraciji od 0,1 %





**Slika 33.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi difenokonazola u koncentraciji od 0,05 %



**Slika 34.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi fluopirama u koncentraciji od 0,1 %



**Slika 35.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi azoksistrobina u koncentraciji od 0,075 %



**Slika 36.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Verticillium dahliae* i tretirane preparatom na bazi prochloraza u koncentraciji od 0,08 %



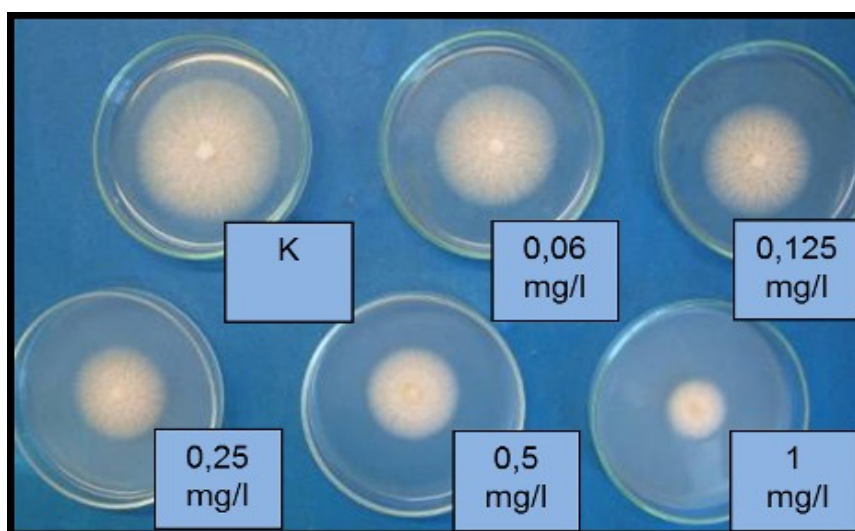
**Slika 37.** *Verticillium dahliae*. Kontrolne inokulisane biljke paprike (K)



**Slika 38.** Neinokulisane i netretirane biljke paprike (AK)

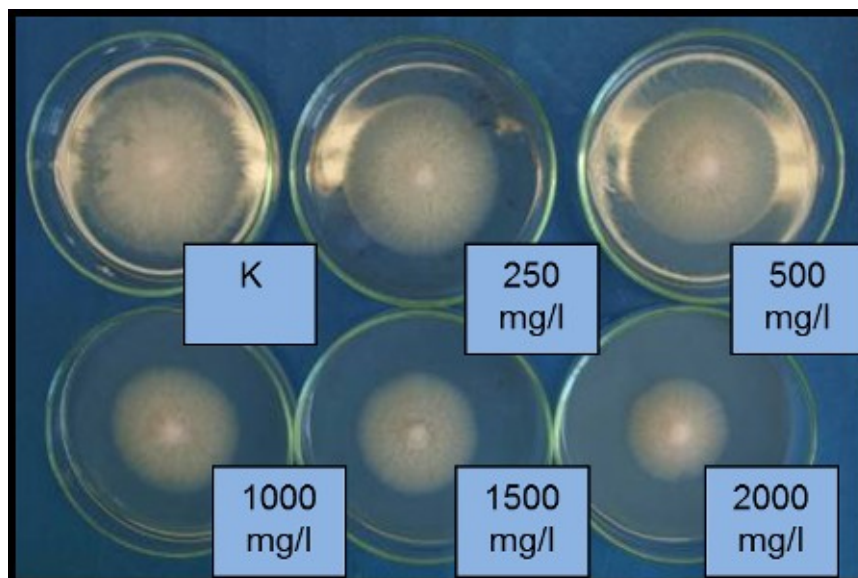
#### 4.2.2. *F. oxysporum*

*In vitro*: Prilikom ispitivanja toksičnosti prochloraza za izolat *F. oxysporum* korišćen je interval koncentracija od 0,06 do 1 mg/l. Najniža koncentracija od 0,06 mg/l inhibirala je porast micelije za 15,6 %. Koncentracije od 0,25 i 0,5 mg/l značajnije su inhibirale porast micelije izolata, pa je procenat inhibicije porasta iznosio preko 60 % za obe primenjene koncentracije. Najviša ispitivana koncentracija (1 mg/l) ispoljila je i najjače delovanje, sa procentom inhibicije od 88,3 % (Slika 39).



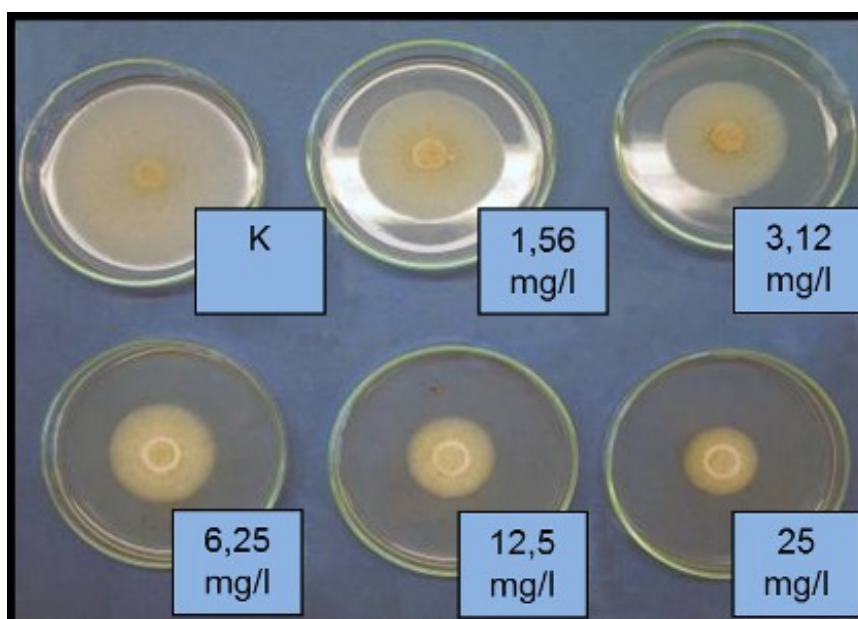
Slika 39. Porast izolata *Fusarium oxysporum* na podlozi sa prochlorazom

Za ispitivanje osetljivosti izolata *F. oxysporum* na fluopiram korišćen je interval koncentracija od 250 do 2000 mg/l. Dve najniže ispitivane koncentracije (250 i 500 mg/l) inhibirale su porast micelije izolata *F. oxysporum* 18,8 % odnosno 23,1 % u poređenju sa kontrolom, dok je najveći procenat inhibicije od 56 % utvrđen pri koncentraciji od 2000 mg/l (Slika 40).



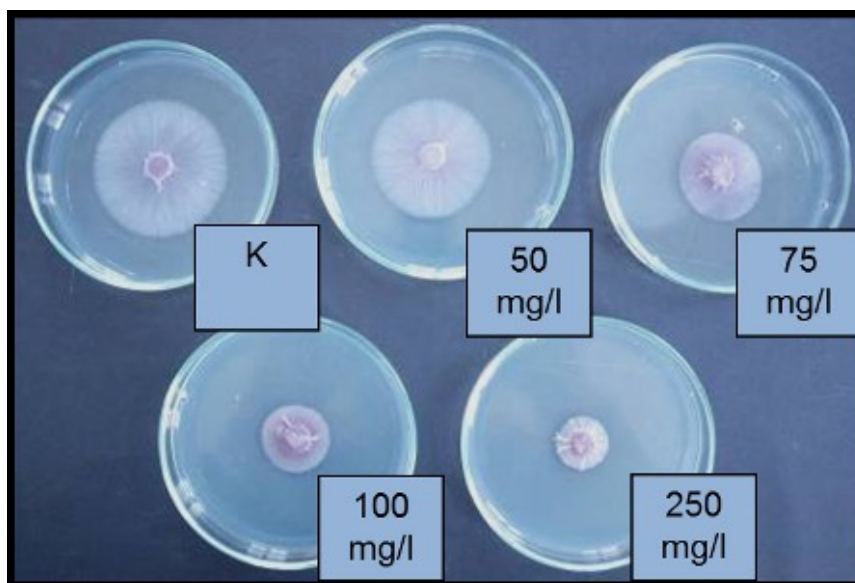
Slika 40. Porast izolata *Fusarium oxysporum* na podlozi sa fluopiramom

Porast micelije izolata *F. oxysporum* inhibiran je u intervalu 5-95 % u odnosu na kontrolu pri intervalu koncentracija od 1,56 do 25 mg/l propikonazola. Najniža ispitivana koncentracija (1,56 mg/l) ispoljila je inhibitorno delovanje na izolat *F. oxysporum* od 20,15 %. Koncentracija od 6,25 mg/l inhibirala je porast za nešto manje od 50 %, dok je najviša ispitivana koncentracija propikonazola (25 mg/l) ispoljila i najjači inhibitorni efekat od 73,26 % (Slika 41).



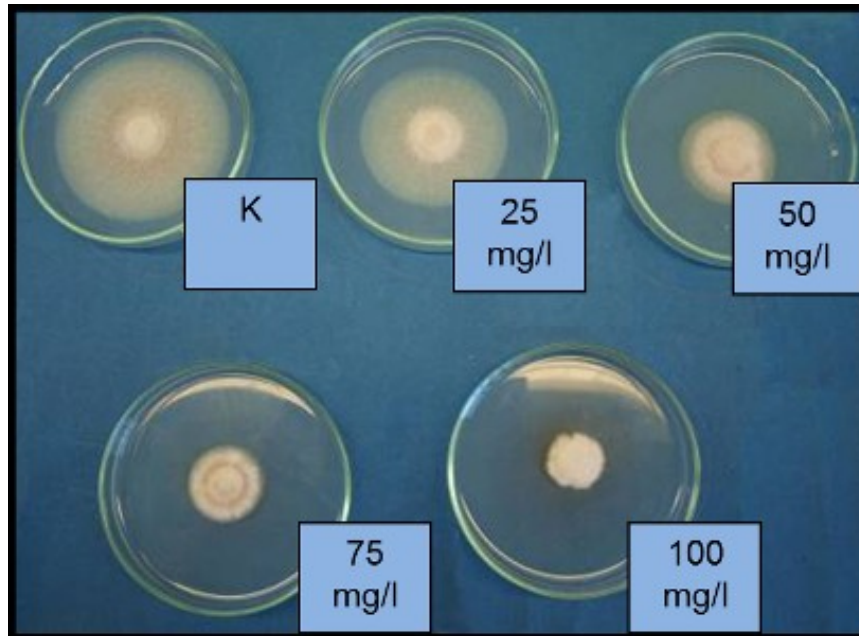
Slika 41. Porast izolata *Fusarium oxysporum* na podlozi sa propikonazolom

Pri ispitivanju toksičnosti kaptana za izolat *F. oxysporum* korišćen je interval koncentracija od 50 do 250 mg/l. Porast micelije izolata *F. oxysporum* bio je inhibiran više od 15 % pod uticajem najniže ispitivane koncentracije (50 mg/l). Koncentracija od 100 mg/l inhibirala je porast 80 %, a najviša ispitivana koncentracija (250 mg/l) zaustavila je porast micelije izolata 88,8 % (Slika 42).



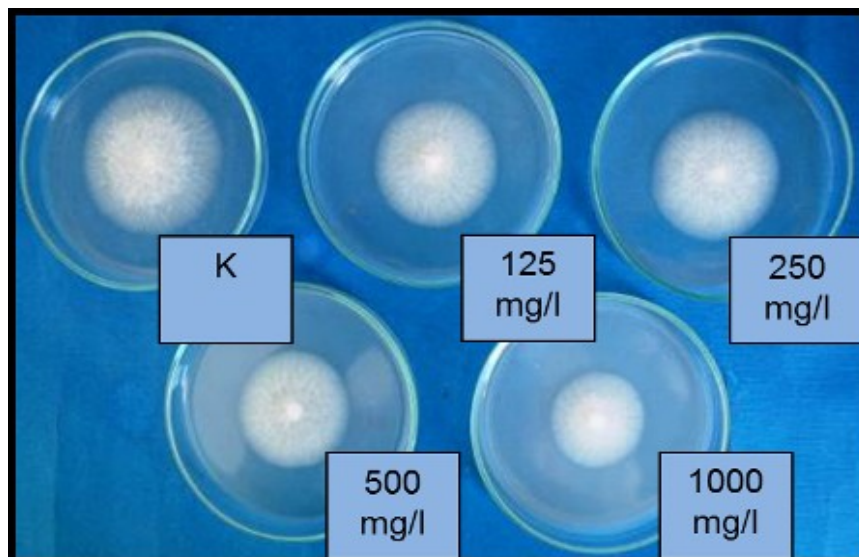
Slika 42. Porast izolata *Fusarium oxysporum* na podlozi sa kaptanom

Ispitivani interval koncentracija tiofanat-metila pri ispitivanju osetljivosti izolata *F. oxysporum* bio je između 25 i 100 mg/l. Najniža koncentracija od 25 mg/l inhibirala je porast izolata *F. oxysporum* 15 %, a naredna ispitivana koncentracija od 50 mg/l inhibirala je porast micelije nešto više od 60 % u poređenju sa kontrolom. Najviša ispitivana koncentracija (100 mg/l) ispoljila je i najjače delovanje sa procentom inhibicije od 93,3 % (Slika 43).



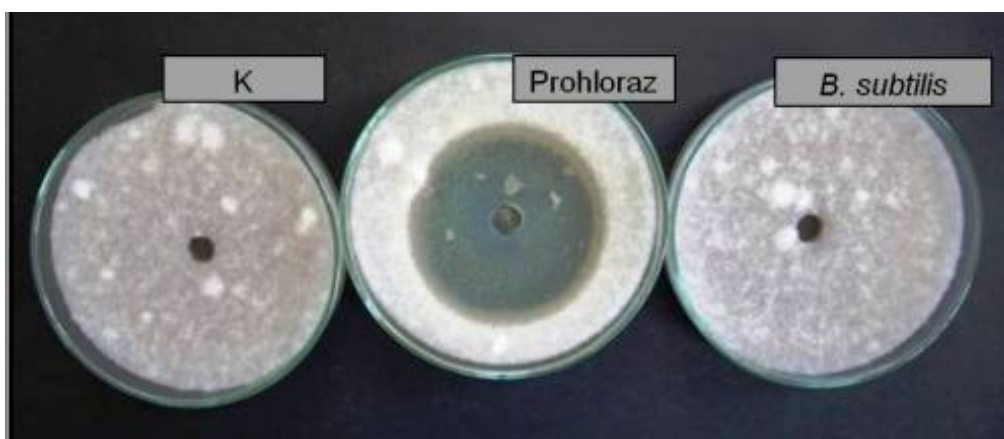
Slika 43. Porast izolata *Fusarium oxysporum* na podlozi sa tiofanat-metilmolom

Pri ispitivanju osetljivosti izolata *F. oxysporum* na ulje čajnog drveta korišćen je interval koncentracija od 125 do 1000 mg/l. Najniža koncentracija od 125 mg/l ispoljila je slabo inhibitorno delovanje na porast micelije *F. oxysporum*. Koncentracija od 250 mg/l inhibirala je porast micelije od skoro 30 % u poređenju sa kontrolom. Najviša ispitivana koncentracija od 1000 mg/l ispoljila je najjače delovanje sa procentom inhibicije od 53,36 % (Slika 44).



Slika 44. Porast izolata *Fusarium oxysporum* na podlozi sa uljem čajnog drveta

Stepen antagonističke aktivnosti soja Č13 *B. subtilis* ocenjivan je nakon inkubacije od 48 h pri temperaturi od 25 °C merenjem prečnika zone inhibicije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen standardni fungicid. Širina inhibitorne zone koja je nastala u tretmanu prohlorazom za izolat *F. oxysporum* iznosila je 61,7 mm, dok u tretmanu ispitivanim sojem bakterije *B. subtilis* nije bila uočljiva. Međutim, iako porast micelije u zoni dejstva nije bio potpuno zaustavljen, uočena je zona delimične inhibicije porasta micelije prečnika 7 mm. (Slika 45).



Slika 45. Antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *Bacillus subtilis* na izolat *Fusarium oxysporum*

Tabela 16. Osetljivost izolata *Fusarium oxysporum* na fungicide i biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

Ispitivana jedinjenja	Parametar apsolutne osetljivosti EC <sub>50</sub> (mg/l)		b
	Vrednost	Opseg	
Prohloraz	0,07	0,04-0,10	0,87 ±0,19
Fluopiram	1075,01	670,50-2321,21	0,56±0,17
Propikonazol	4,69	3,27-6,35	0,86±0,14
Kaptan	19,14	2,79-35,75	1,10±0,30
Tiofanat-metil	71,95	61,05-89,56	2,19±0,33
Ulje čajnog drveta	1205,77	711,74-3470,31	0,71±0,14

Prohloraz je najtoksičniji od svih testiranih fungicida za izolat *F. oxysporum*. Vrednost srednje efektivne koncentracije iznosila je EC<sub>50</sub> = 0,07 mg/l. Nagib regresione linije, tj. koeficijent regresije bio je 0,87. Izolat *F. oxysporum* ispoljio je visoku osetljivost na propikonazol. Vrednost srednje efektivne koncentracije iznosila je EC<sub>50</sub> = 4,69 mg/l, a vrednost regresionog koeficijenta b 0,86.



Izolat *F. oxysporum* ispoljio je umerenu osetljivost na kaptan. Vrednost srednje efektivne koncentracije za ovaj fungicid iznosila je  $EC_{50} = 19,14$  mg/l. Nagib regresione linije, tj. regresioni koeficijent  $b$  bio je 1,1.

Ulje čajnog drveta i fluopiram bili su najmanje toksični od svih testiranih fungicida za izolat *F. oxysporum*. Za ulje čajnog drveta utvrđena je najviša vrednost srednje efektivne koncentracije od 1205,77 mg/l, a koeficijent regresije iznosio je 0,71. U oglecima *in vitro*, za fluopiram ustanovljena je vrednost srednje efektivne koncentracije od 1075,01 mg/l i najviša vrednost relativne osetljivosti  $b = 0,56$ . Za tiofanat-metil takođe je utvrđena relativno visoka  $EC_{50}$  vrednost od 71,95 mg/l, i najniža relativna osetljivost sa vrednošću regresionog koeficijenta  $b = 2,19$ .

**In vivo:** U tabeli 17 prikazani su podaci o pojavi „fuzarioznog uvenuća” paprike i efikasnosti preparata primenjenih u fenofazi kada je razvijeno četiri i više listova na glavnom stablu. Intenzitet oboljenja u inokulisanoj netretiranoj kontrolnoj varijanti (K) iznosio je 90 % (Slika 53). Intenzitet oboljenja u varijantama gde je primenjivan biološki preparat na bazi etarskog ulja čajnog drveta (Slika 47) iznosio je 85 % i nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na inokulisane i netretirane kontrolne biljke (K). U varijantama gde su primenjivani preparati na bazi bakterije *B. subtilis* (Slike 46), propikonazola (Slike 51) i tiofanat-metila (Slike 52) intenzitet oboljenja bio je znatno niži: 20, 22 i 41 %. Od ispitivanih varijanti, najveću efikasnost ispoljili su preparati na bazi kaptana (95,6 %) (Slika 49) i prochloraza (92,2 %) (Slika 50). Takođe, visoka efikasnost zabeležena je u varijantama u kojima su primenjivani preparati na bazi *B. subtilis* (77,8 %), propikonazola (75,6 %) i fluopirama (66,7 %) (Slika 48). Najniža efikasnost od 5,6 % utvrđena je u varijanti primene preparata na bazi etarskog ulja čajnog drveta.

**Tabela 17.** *Fusarium oxysporum*. Intenzitet oboljenja i efikasnost (E) fungicida

Ispitivana jedinjenja	Konc. primene (%)	Intenzitet oboljenja (%)		Efikasnost (%)
		Ms	Sd	E
<i>B. subtilis</i>	1,00	20,00 ab	32,60	77,80
Ulje čajnog drveta	1,00	85,00 c	22,40	5,60
Fluopiram	0,10	30,00 ab	27,40	66,70
Kaptan	0,30	4,00 ab	5,50	95,60
Prohloraz	0,08	7,00 ab	11,00	92,20
Propikonazol	0,03	22,00 ab	43,80	75,60
Tiofanat-metil	0,10	41,00 b	43,40	54,40
K	-	90,00 c	22,40	0,00
AK	-	0,00 a	0,00	100,00

LSD<sub>005</sub> = 30,46 LSD<sub>001</sub> = 40,81

U tabeli 18 prikazane su vrednosti visine i sveže mase biljaka paprike. U inokulisanoj kontrolnoj varijanti (K) prosečna visina biljaka iznosila je 0,3 cm, a u varijanti netretiranih i neinokulisanih biljaka (AK) 10,5 cm. Najveća dužina biljaka utvrđena je u varijanti u kojoj je primenjivan preparat na bazi kaptana (4,86 cm), dok su najniže vrednosti ustanovljene u varijantama u kojima su primenjivani preparati na bazi prohloraza (1,1 cm) i propikonazola (0,84 cm). Ove vrednosti se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na vrednosti visine inokulisanih netretiranih kontrolnih biljaka (K). Takođe, statistički značajna razlika u visini biljaka nije utvrđena ni između varijante primene preparata na bazi *B. subtilis* (4,46 cm) i fluopirama (3,74 cm).

Prosečna vrednost sveže mase biljaka paprike u inokulisanoj kontroli (K) iznosila je 1,5 g, dok je masa netretiranih i neinokulisanih biljaka paprike (AK) bila 14,24 g. Najveće srednje vrednosti mase biljaka dobijene su u varijantama primene kaptana (2,03 g) i prohloraza (2,04 g). U varijantama primene preparata na bazi tiofanat-metila, fluopirama i ulja čajnog drveta zabeležene su niske vrednosti mase biljaka od 0,64 g, 0,91 g i 1,06 g. Između varijanti u kojima su primenjivani preparati na bazi prohloraza i propikonazola i inokulisanih netretiranih kontrolnih biljaka (K) nije postojala statistički značajna razlika u prosečnoj masi biljaka.

**Tabela 18.** *Fusarium oxysporum*. Uticaj različitih jedinjenja na visinu i masu biljaka paprike

Ispitivana jedinjenja	Konc. primene (%)	Dužina biljaka (cm)		Masa biljaka (g)	
		Ms	Sd	Ms	Sd
<i>B. subtilis</i>	1,00	4,46 cd	1,70	1,98 a	1,18
Ulje čajnog drveta	1,00	1,90 ab	1,60	1,06 a	0,89
Fluopiram	0,10	3,74 cd	1,30	0,91 a	0,58
Kaptan	0,30	4,84 d	1,40	2,03 a	1,09
Prohloraz	0,08	1,10 a	0,70	2,04 a	0,76
Propikonazol	0,03	0,84 a	0,70	1,82 a	1,27
Tiofanat-metil	0,10	2,94 bc	1,50	0,64 a	0,39
K	-	0,30 a	0,30	1,50 a	0,91
AK	-	10,50 e	1,90	14,24 b	1,28

LSD<sub>005</sub> = 1,66;    LSD<sub>001</sub> = 2,23;    LSD<sub>005</sub> = 1,30    LSD<sub>001</sub> = 1,74

Utvrđena je statistički značajna korelacija između visine i mase biljaka ( $r = 0,84$ ), a umerena korelacija između efikasnosti primenjenih preparata i visine biljaka ( $r = 0,56$ ). Između efikasnosti i mase biljaka ustanovljena je slaba korelacija, sa vrednošću koeficijenta korelacije  $r = 0,43$ .



**Slika 46.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi *Bacillus subtilis* u koncentraciji od 1 %



Slika 47. Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi ulja čajnog drveta u koncentraciji od 1 %



Slika 48. Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi fluopirama u koncentraciji od 0,1 %



Slika 49. Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi kaptana u koncentraciji od 0,3 %



Slika 50. Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi prochloraza u koncentraciji od 0,08 %



Slika 51. Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi propikonazola u koncentraciji od 0,03 %



Slika 52. Biljke paprike inokulisane izolatom *Fusarium oxysporum* i tretirane preparatom na bazi tiofanat-metila u koncentraciji od 0,1 %



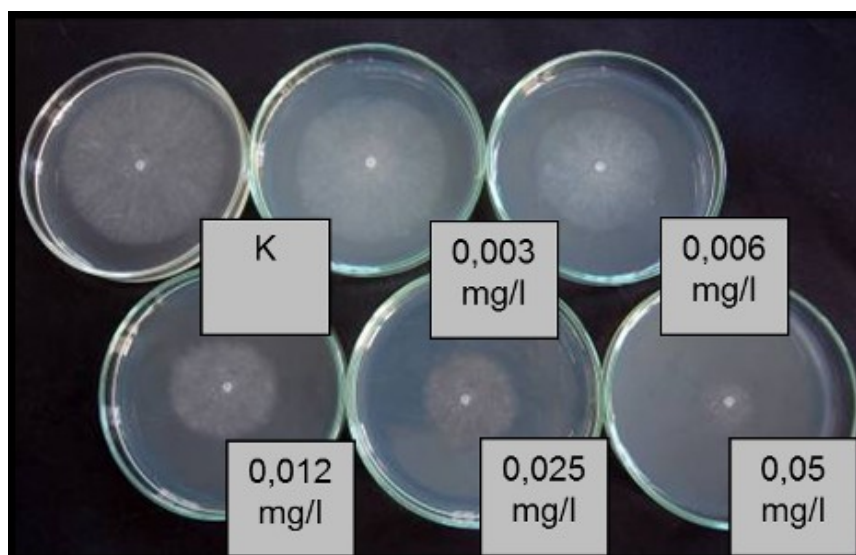
Slika 53. *Fusarium oxysporum*. Kontrolne inokulisane biljke paprike (K)



Slika 54. Neinokulisane i netretirane biljke paprike (AK)

#### 4.2.3. *S. sclerotiorum*

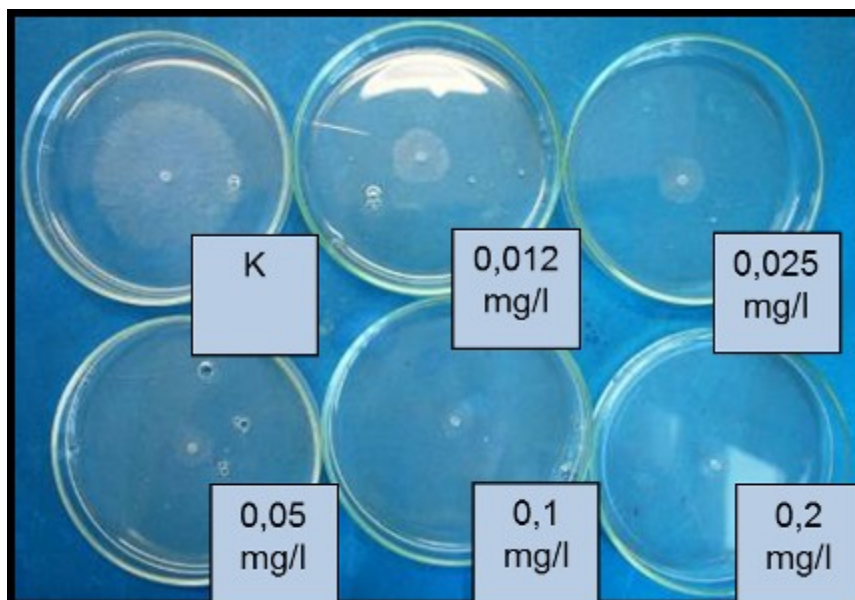
*In vitro*: Pri ispitivanju toksičnosti prohloraza na izolat *S. sclerotiorum* korišćen je interval koncentracija od 0,003 do 0,05 mg/l. Ispitivanja uticaja različitih koncentracija pokazala su visoku toksičnost ovog preparata pri veoma niskim koncentracijama. Najniža ispitivana koncentracija od 0,003 mg/l inhibirala je porast izolata *S. sclerotiorum* 27,8 %. Koncentracija od 0,006 mg/l zaustavila je porast micelije izolata 32,4 %. Koncentracije 0,01 i 0,025 mg/l inhibirale su porast izolata 44,8 % odnosno 56 %. Najveći procenat inhibicije od preko 85 % utvrđen je pri koncentraciji od 0,05 mg/l (Slika 55).



Slika 55. Porast izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na podlozi sa prohlorazom

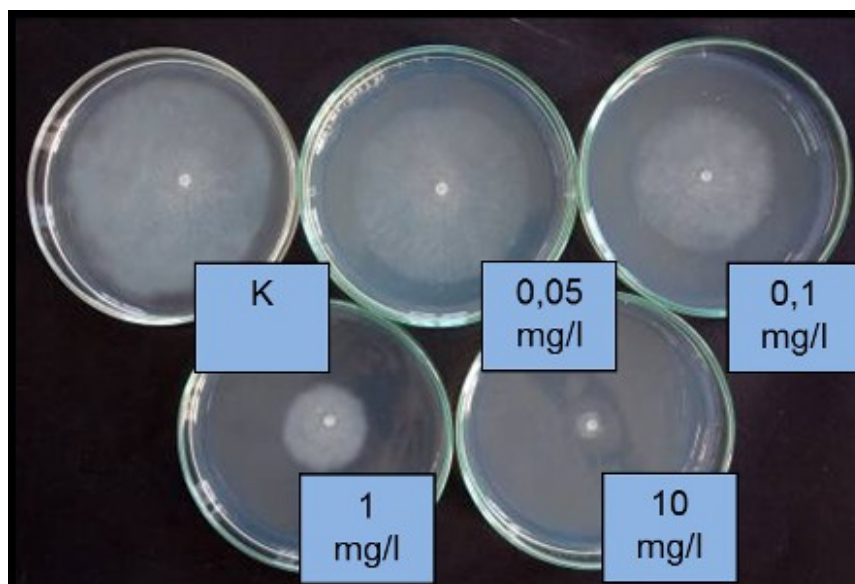
Osetljivost izolata *S. sclerotiorum* na fluopiram ispitivana je korišćenjem intervala koncentracija koje su bile između 0,012 i 0,2 mg/l. Porast micelije izolata *S. sclerotiorum* bio je inhibiran više od 60 % pod uticajem najniže ispitivane koncentracije fluopirama od 0,012 mg/l. Naredne dve veće koncentracije (0,025 i 0,05 mg/l) značajnije su inhibirale porast micelije izolata, pa je procenat inhibicije porasta iznosio preko 70 %. Najveća koncentracija od 0,2 mg/l snažno je zaustavila porast micelije izolata za 88,8 % (Slika 56).





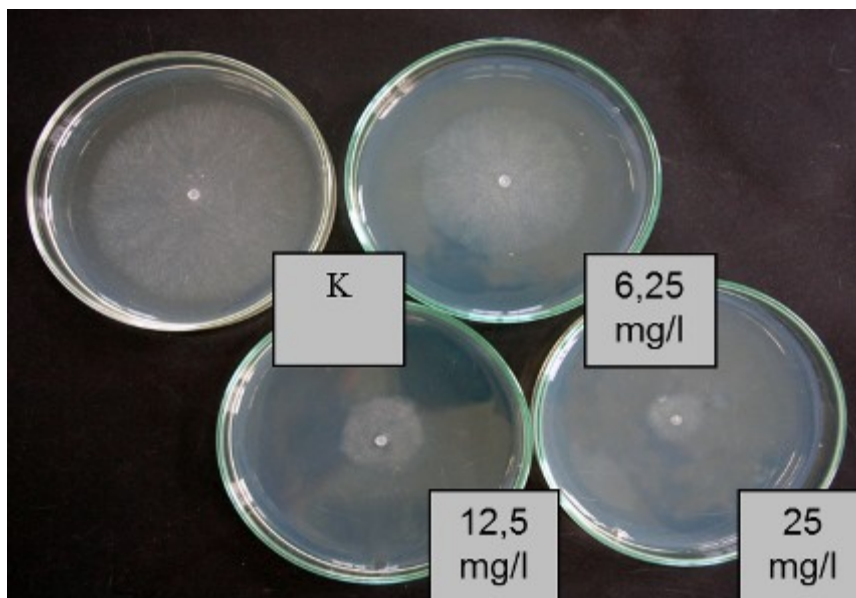
Slika 56. Porast izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na podlozi sa fluopiramom

Porast izolata *S. sclerotiorum* inhibiran je između 5-95 % u odnosu na kontrolu korišćenjem intervala koncentracija boskalida u rasponu od 0,05 do 10 mg/l. Najniža koncentracija boskalida od 0,05 mg/l inhibirala je porast micelije *S. sclerotiorum* u odnosu na kontrolu 16,9 %. Koncentracija od 0,1 mg/l ispoljila je inhibitorno delovanje koje je iznosilo preko 30 %. Najviša ispitivana koncentracija (10 mg/l) ispoljila je snažno inhibitorno delovanje na porast micelije izolata *S. sclerotiorum*, tako da je procenat inhibicije iznosio 91,2 % (Slika 57).



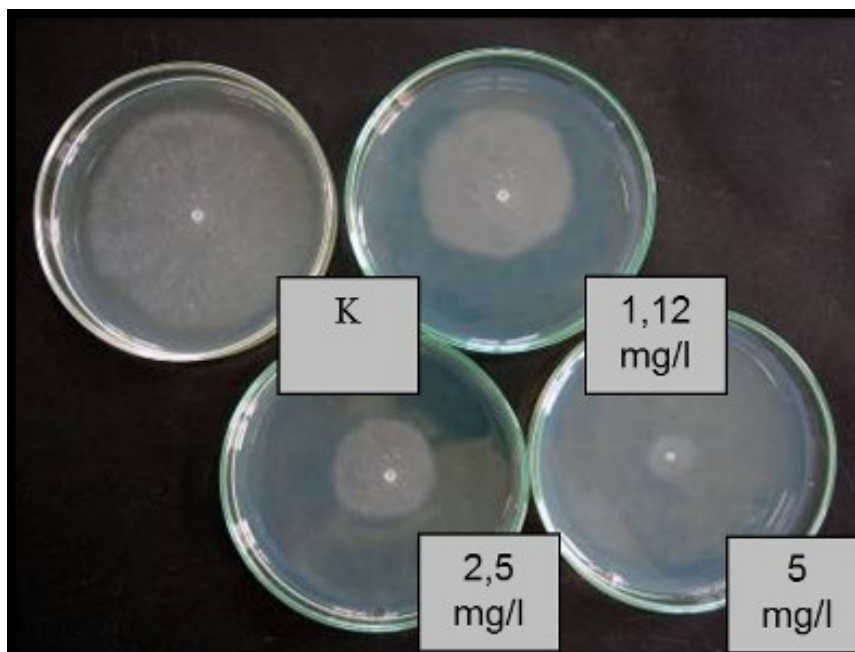
Slika 57. Porast izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na podlozi sa boskalidom

Pri ispitivanju osetljivosti izolata *S. sclerotiorum* na kaptan korišćen je interval koncentracija od 6,25 do 25 mg/l. Ispitivanja uticaja različitih koncentracija pokazala su da je najniža koncentracija od 6,25 mg/l inhibirala porast izolata *S. sclerotiorum* 15,5 %. Koncentracija od 12,5 mg/l inhibirala je porast micelije preko 55 % u poređenju sa kontrolom, a najveća ispitivana koncentracija od 25 mg/l snažno je zaustavila porast micelije izolata (85,9 %) (Slika 58).



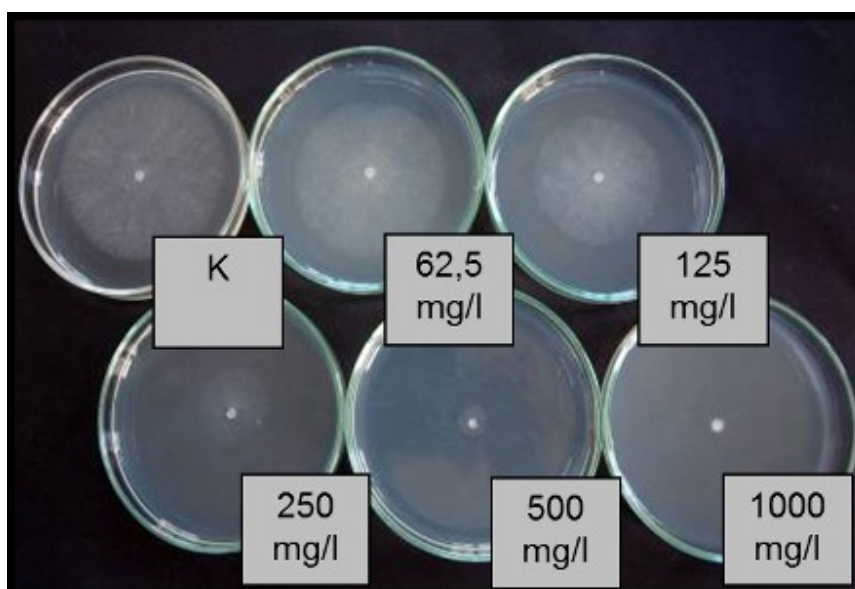
**Slika 58.** Porast izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na podlozi sa kaptanom

Za ispitivanje osetljivosti izolata *S. sclerotiorum* na tiofanat-metil korišćene su koncentracije u intervalu od 1,12 do 5 mg/l. Porast micelije izolata *S. sclerotiorum* bio je inhibiran više od 40 % pod uticajem najniže ispitivane koncentracije od 1,12 mg/l. Koncentracija od 2,5 mg/l značajno je inhibirala porast micelije izolata i procenat inhibicije porasta iznosio je preko 70 %. Najviša ispitivana koncentracija od 5 mg/l snažno je zaustavila porast micelije izolata (95,3 %) (Slika 59).



**Slika 59.** Porast izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na podlozi sa tiofanat-metilom

Osetljivost izolata *S. sclerotiorum* na ulje čajnog drveta proučavana je korišćenjem intervala koncentracija od 62,5 do 1000 mg/l. Najniža koncentracija od 62,5 mg/l inhibirala je porast micelije za 15,5 %. Koncentracija od 250 mg/l ispoljila je inhibitorno delovanje koje je iznosilo preko 65 %, dok je najviša testirana koncentracija od 1000 mg/l inhibirala porast micelije 95,8 % u poređenju sa kontrolom (Slika 60).



**Slika 60.** Porast izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na podlozi sa uljem čajnog drveta

Merenjem prečnika zone inhibicije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen standardni fungicid vršeno je ispitivanje stepena antagonističke aktivnosti soja Č13 *B. subtilis*, nakon inkubacije od 48 h pri temperaturi od 25 °C. Zona inhibicije nije bila uočljiva u varijanti primene ispitivanog soja, dok je u varijanti primene prohloraza porast micelije izolata u potpunosti inhibiran (Slika 61).



Slika 61. Antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *Bacillus subtilis* na izolat *Sclerotinia sclerotiorum*

Vrednosti parametara osetljivosti ( $EC_{50}$  vrednost i regresioni koeficijent  $b$ ) za izolata *S. sclerotiorum* prikazane su u tabeli 19.

Tabela 19. Osetljivost izolata *Sclerotinia sclerotiorum* na fungicide i biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

Ispitivana jedinjenja	Parametar apsolutne osetljivosti $EC_{50}$ (mg/l)		
	Vrednost	Opseg	$b$
Prohloraz	1,01	0,007-0,11	$0,78 \pm 0,13$
Fluopiram	0,003	0,0002-0,02	$0,60 \pm 0,51$
Boskalid	0,17	0,08-0,31	$0,50 \pm 0,07$
Kaptan	8,94	7,85-10,20	$2,47 \pm 0,23$
Tiofanat- metil	1,32	1,07-1,55	$2,64 \pm 0,33$
Ulje čajnog drveta	70,28	23,78-118,17	$0,63 \pm 0,15$

Fluopiram je najtoksičniji od svih testiranih fungicida za izolat *S. sclerotiorum*. Vrednost srednje efektivne koncentracije iznosila je 0,003 mg/l. Nagib regresione linije, tj.

koeficijent regresije bio je 0,60. Na osnovu laboratorijskih testova, izračunate su vrednosti parametara koji ukazuju na relativno visoku toksičnost boskalida na izolate *S. sclerotiorum*. Utvrđena je relativno niska vrednost srednje efektivne koncentracije –  $EC_{50} = 0,1$  mg/l. Ovaj izolat poseduje i najvišu relativnu osetljivost na ovaj fungicid sa vrednošću regresionog koeficijenta  $b = 0,50$ . Izolat *S. sclerotiorum* ispoljio je visoku osetljivost na prohloraz. Vrednost srednje efektivne koncentracije za ovaj fungicid iznosila je 1,01 mg/l, a nagib regresione linije, tj. regresioni koeficijent  $b$  bio je 0,78. Testirani izolat ispoljio je visoku osetljivost na tiofanat-metil. Vrednost srednje efektivne koncentracije pri kojoj je prosečni rast izolata bio inhibiran za 50 % u odnosu na kontrolu iznosila je 1,32 mg/l. Vrednost regresionog koeficijenta  $b$  bila je 2,64.

Izolat *S. sclerotiorum* ispoljio je umerenu osetljivost na kaptan. Vrednost srednje efektivne koncentracije za ovaj fungicid iznosila je 8,94 mg/l, a nagib regresione linije, tj. regresioni koeficijent  $b$  bio je 2,47.

Ispitivani izolat *S. sclerotiorum* ispoljio je najnižu osetljivost na ulje čajnog drveta. Vrednost srednje efektivne koncentracije pri kojoj je prosečan rast izolata bio inhibiran za 50 % u odnosu na kontrolu iznosila je 70,28 mg/l. Vrednost regresionog koeficijenta  $b$  iznosila je 0,63.

**In vivo:** U tabeli 20 prikazani su podaci o pojavi uvenuća i efikasnosti primenjenih preparata u fenofazi kada je razvijeno četiri i više listova na glavnom stablu. Intenzitet oboljenja u kontrolnoj varijanti (K) iznosio je 100 % (Slika 69). Pri ovako visokom intenzitetu oboljenja, intenzitet oboljenja u varijantama primene preparata na bazi fluopirama (Slika 65), prohloraza (Slike 67) i ulja čajnog drveta (Slika 63) iznosio je 50, 55 i 57 %. U varijanti u kojoj je primenjen preparat na bazi boskalida (Slika 64), intenzitet oboljenja bio je 24 %. Od ispitivanih varijanti najveću efikasnost ispoljili su preparati na bazi kaptana (98 %) (Slika 66) i tiofanat-metila (80 %) (Slika 68). Umerena efikasnost postignuta je primenom preparata na bazi ulja čajnog drveta (43 %), prohloraza (45 %) i fluopirama (50 %). Za biološki preparat na bazi *B. subtilis* utvrđena je najmanja efikasnost od 5 % koja se nije statistički značajno razlikovala od inokulisane netretirane kontrole (K) (Slika 62).



Utvrđena je statistički značajna korelacija između visine i mase biljaka ( $r = 0,94$ ), efikasnosti i visine biljaka ( $r = 0,88$ ), kao i efikasnosti i mase biljaka ( $r = 0,92$ ).



Slika 62. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi *Bacillus subtilis* u koncentraciji od 1 %



Slika 63. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi ulja čajnog drveta u koncentraciji od 1 %



Slika 64. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi boskalida u koncentraciji od 0,15 %



Slika 65. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi fluopirama u koncentraciji od 0,1 %





Slika 66. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi kaptana u koncentraciji od 0,3 %



Slika 67. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi prohloraza u koncentraciji od 0,08 %



Slika 68. Biljke paprike inokulisane izolatom *Sclerotinia sclerotiorum* i tretirane preparatom na bazi tiofanat-metila u koncentraciji od 0,1 %



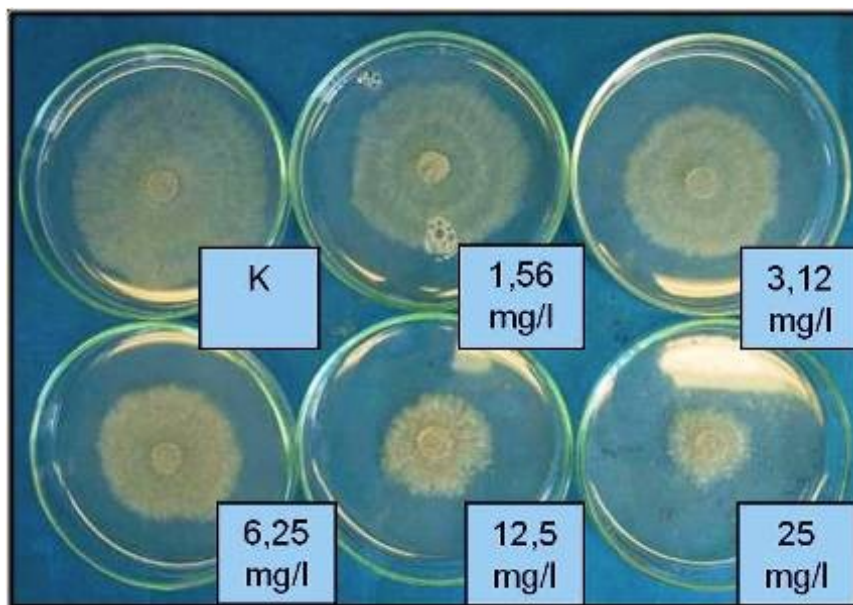
Slika 69. *Sclerotinia sclerotiorum*. Kontrolne inokulisane biljke paprike (K)



**Slika 70.** Neinokulisane i netretirane biljke paprike (AK)

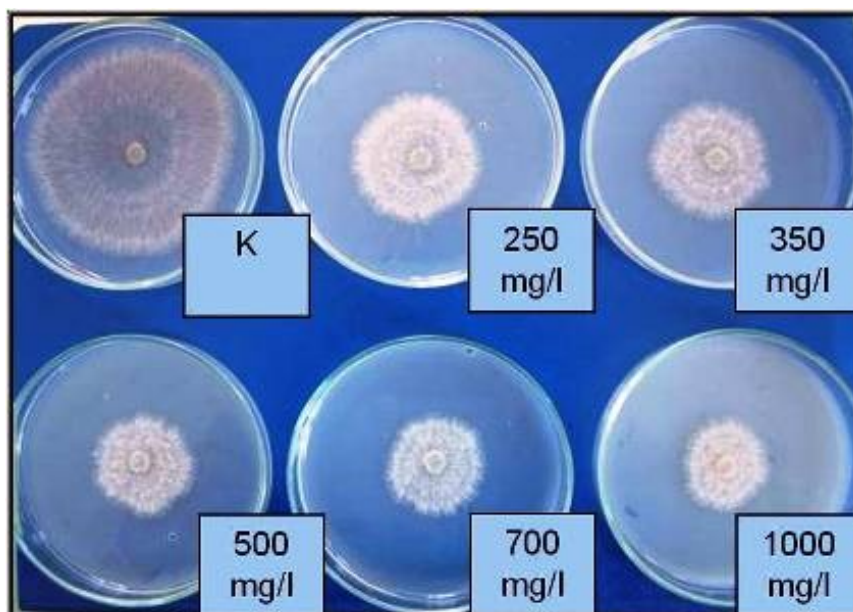
#### **4.2.4. *R. solani***

***In vitro***: Pri ispitivanju osetljivosti izolata *R. solani* na prochloraz korišćen je interval koncentracija od 1,56 do 25 mg/l. Koncentracija od 1,56 mg/l inhibirala je porast izolata *R. solani* za nešto manje od 20 %. Pri koncentraciji od 12,5 mg/l porast je inhibiran 45,2 % u poređenju sa kontrolom, a najveća koncentracija od 25 mg/l zaustavila je porast micelije 66,5 % (Slika 71).



**Slika 71.** Porast izolata *Rhizoctonia solani* na podlozi sa prohlorazom

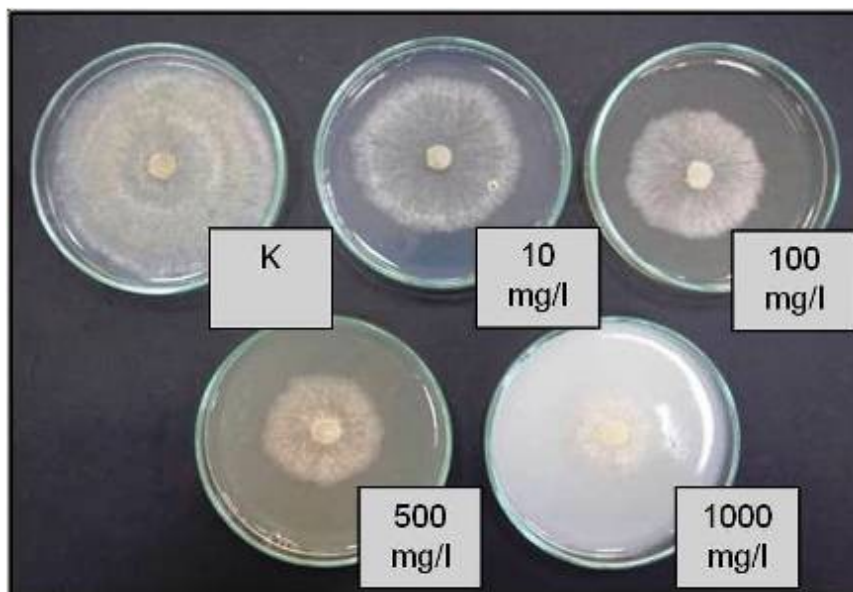
Toksičnost fluopirama na izolat *R. solani* u uslovima *in vitro* ispitivana je korišćenjem intervala koncentracija od 250 do 1000 mg/l. Pri koncentraciji od 250 mg/l porast micelije izolata *R. solani* inhibiran je 40,3 %, a naredna koncentracija (350 mg/l) inhibirala je porast 45,5 %. Najveća koncentracija od 1000 mg/l inhibirala je porast izolata preko 60 % (Slika 72).



**Slika 72.** Porast izolata *Rhizoctonia solani* na podlozi sa fluopiramom

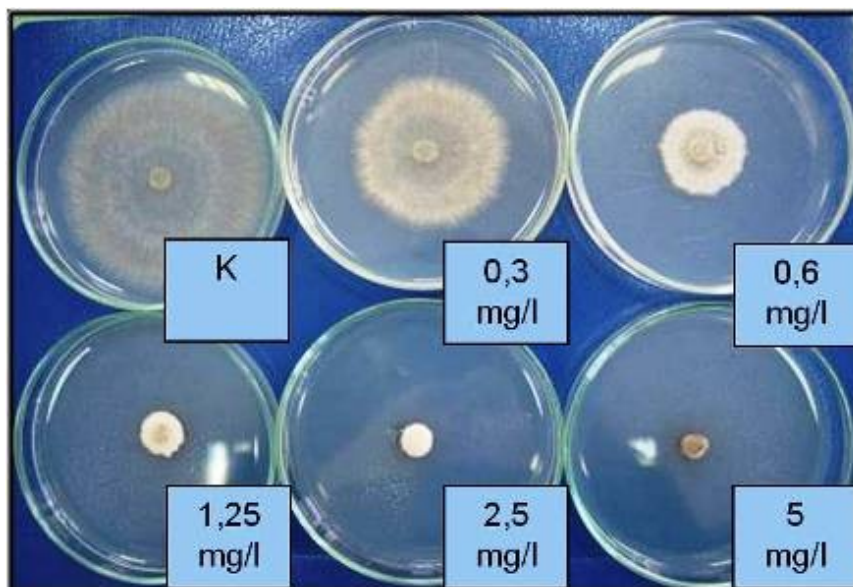
Pri ispitivanju osetljivosti izolata *R. solani* na azoksistrobin korišćen je interval koncentracija od 10 do 1000 mg/l. Porast micelije izolata *R. solani* bio je inhibiran više od 20

% pod uticajem najniže ispitivane koncentracije azoksistrobina od 10 mg/l. Pri koncentraciji od 500 mg/l došlo je do inhibicije porasta micelije izolata 50 %, dok je najveća koncentracija (1000 mg/l) snažno zaustavila porast micelije izolata preko 54,39 % (Slika 73).



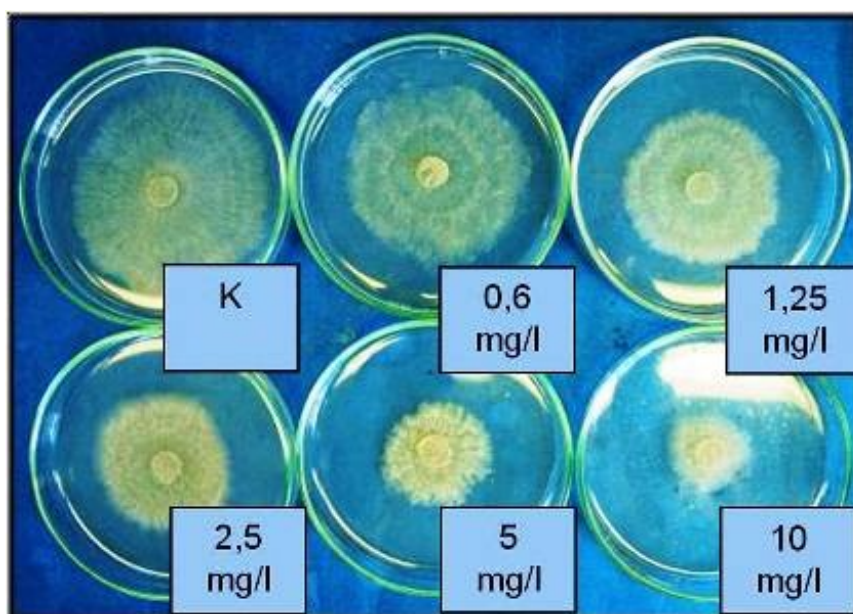
**Slika 73.** Porast izolata *Rhizoctonia solani* na podlozi sa azoksistrobinom

Porast izolata *R. solani* inhibiran je u intervalu 5-95 % u odnosu na kontrolu pri koncentracijama iprodiona u rasponu od 0,3 do 5 mg/l. Koncentracija od 0,3 mg/l zaustavila je porast micelije izolata 33,3 %. Naredne tri koncentracije od 0,6; 1,25 i 2,5 mg/l inhibirale su porast micelije izolata 64,4; 87 i 93,9 %. Najviša ispitivana koncentracija (5 mg/l) ispoljila je jako inhibitorno delovanje, a procenat inhibicije iznosio je 97,3 % (Slika 74).



**Slika 74.** Porast izolata *Rhizoctonia solani* na podlozi sa iprodionom

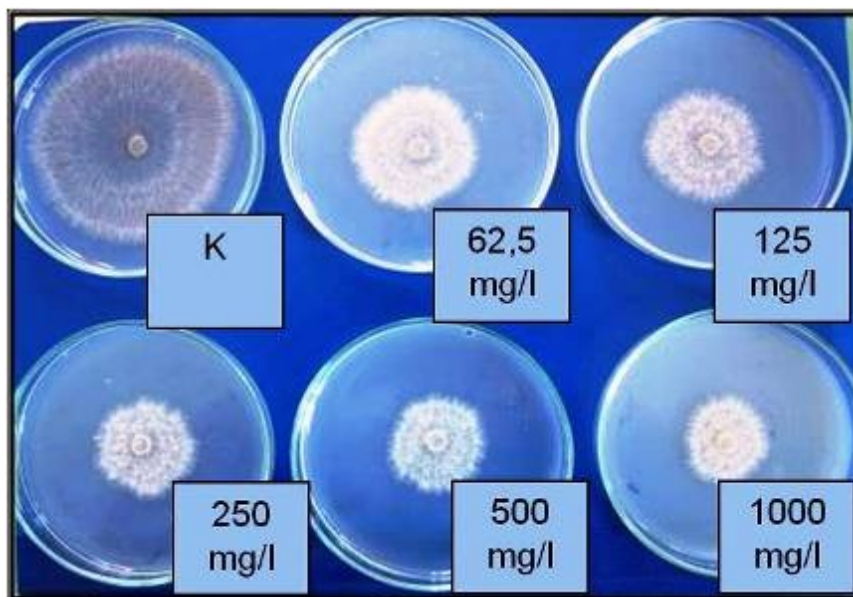
Osetljivost izolata *R. solani* na karbendazim proučavana je korišćenjem intervala koncentracija od 0,6 do 10 mg/l. Porast micelije izolata bio je inhibiran manje od 15 % pod uticajem najniže koncentracije karbendazima od 0,6 mg/l. Koncentracija od 2,5 mg/l inhibirala je porast skoro 60 %, a najviša ispitivana koncentracija od 5 mg/l zaustavila je porast micelije izolata 78,2 % (Slika 75).



**Slika 75.** Porast izolata *Rhizoctonia solani* na podlozi sa karbendazimom

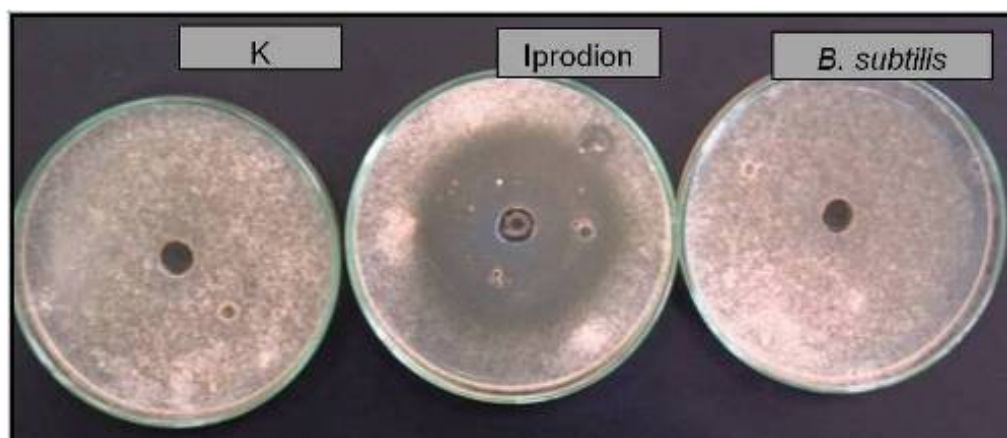
Za ispitivanje toksičnosti ulja čajnog drveta na izolat *R. solani* korišćene su koncentracije u intervalu od 62,5 do 1000 mg/l. Najniža koncentracija od 62,5 mg/l inhibirala

je porast micelije *R. solani* 18,4 %. Koncentracije od 125 i 250 mg/l ispoljile su nešto jače inhibitorno delovanje koje je iznosilo više od 24 %, dok je porast izolata najsnažnije zaustavljen pri koncentraciji od 1000 mg/l i to skoro 70 % (Slika 76).



Slika 76. Porast izolata *Rhizoctonia solani* na podlozi sa uljem čajnog drveta

Antagonistička aktivnost soja Č13 *B. subtilis* utvrđena je merenjem prečnika zone inhibicije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen standardni fungicid. Za izolat *R. solani* potvrđeno je odsustvo antagonističkog delovanja ispitivanog soja. U tretmanu sojem Č13 *B. subtilis* nije došlo do zaustavljanja porasta micelije izolata, dok je širina inhibitorne zone u tretmanu standardnim fungicidom iprodionom iznosila 62 mm (Slika 77).



Slika 77. Antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *Bacillus subtilis* na izolat *Rhizoctonia solani*

Vrednosti parametara osetljivosti ( $EC_{50}$  vrednost i regresioni koeficijent  $b$ ) za izolata *R. solani* prikazane su u tabeli 22.

**Tabela 22.** Osetljivost izolata *Rhizoctonia solani* na fungicide i biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

Ispitivana jedinjenja	Parametar apsolutne osetljivosti $EC_{50}$ (mg/l)		b
	Vrednost	Opseg	
Prohloraz	13,84	10,58-19,98	1,09 ±0,15
Fluopiram	430,37	301,92-555,57	1,03±0,27
Azoksistrobin	596,60	308,81-790,56	0,47±0,09
Iprodion	0,43	0,35-0,51	2,07±0,18
Karbendazim	1,84	1,57-2,18	1,91±0,21
Ulje čajnog drveta	496,79	371,19-742,20	1,15±0,15

Iprodion je bio najtoksičniji fungicid u laboratorijskim uslovima ispitivanja za izolat vrste *R. solani*, sa vrednošću  $EC_{50} = 0,43$  mg/l i koeficijentom regresije  $b = 2,07$ .

Na osnovu laboratorijskih testova, izračunate su vrednosti parametara koji ukazuju na relativno visoku toksičnost karbendazima na miceliju izolata *R. solani*. Utvrđena je relativno niska vrednost srednje efektivne koncentracije –  $EC_{50} = 1,84$  mg/l, dok je koeficijent regresije bio 1,91.

Testirani izolat *R. solani* ispoljio je umerenu osetljivost na prohloraz. Vrednost srednje efektivne koncentracije pri kojoj je prosečni rast izolata bio inhibiran za 50 % u odnosu na kontrolu iznosila je 13,84 mg/l. Vrednost regresionog koeficijenta  $b$  iznosila je 1,09.

Azoksistrobin bio je najmanje toksičan fungicid za izolat vrste *R. solani*, sa vrednošću  $EC_{50} = 596,60$  mg/l i vrednošću regresionog koeficijenta  $b = 0,47$ .

Ulje čajnog drveta ispoljilo je nisku toksičnost na izolat *R. solani*, sa visokom vrednošću srednje efektivne koncentracije od 496,79 mg/l. Vrednost regresionog koeficijenta  $b$  za ovaj izolat iznosi 1,15. Takođe, na osnovu laboratorijskih testova, izračunate su vrednosti parametara koji ukazuju na relativno nisku toksičnost fluopirama na porast micelije izolata *R. solani*. Utvrđena je relativno visoka vrednost srednje efektivne koncentracije od 430,37 mg/l, dok je nagib regresione linije, tj. koeficijent regresije  $b$  bio 1,03.





Prosečna vrednost sveže mase biljaka paprike u kontroli (K) iznosila je 0,48 g, a u varijanti netretiranih i neinokulisanih biljaka (AK) 14,24 g. Najviša vrednost mase biljaka utvrđena je u varijanti u kojoj je primenjivan preparat na bazi iprodiona (1,57 g), dok je u varijanti u kojoj je korišćen azoksistrobin zabeležena najniža vrednost sveže masa biljaka paprike od 0,96 g. Između varijanti u kojima su korišćeni preparati na bazi azoksistrobina (0,96 g), *B. subtilis* (1 g), ulja čajnog drveta (1,04 g), tiofanat-metila (1,04 g), prohloraza (1,1 g) i fluopirama (1,22 g) nije utvrđena statistički značajna razlika u masi biljaka paprike.

**Tabela 24.** *Rhizoctonia solani*. Visina i masa biljaka paprike

Ispitivana jedinjenja	Konc. primene (%)	Dužina biljaka (cm)		Masa biljaka (g)	
		Ms	Sd	Ms	Sd
<i>B. subtilis</i>	1,00	4,30 de	1,20	1,00 ab	0,40
Ulje čajnog drveta	1,00	3,40 bcd	0,70	1,04 ab	0,40
Tiofanat-metil	0,10	3,48 cd	2,10	1,04 ab	0,30
Iprodion	0,30	5,96 e	1,30	1,56 b	0,40
Prohloraz	0,08	4,10 de	1,40	1,10 ab	0,80
Fluopiram	0,10	4,24 de	1,10	1,22 ab	0,60
Azoksistrobin	0,075	3,70 d	1,20	0,96 ab	0,50
K	-	1,40 a	2,20	0,48 a	0,20
AK	-	10,50 f	1,90	14,24 c	1,28

LSD005 = 1,93    LSD001 = 2,59    LSD005 = 0,82    LSD001 = 1,10

Utvrđena je statistički značajna korelacija između visine i mase biljaka ( $r = 0,91$ ), a umerena korelacija između efikasnosti primenjenih preparata i visine biljaka ( $r = 0,60$ ). Između efikasnosti i mase biljaka ustanovljena je slaba korelacija, sa vrednošću koeficijenta korelacije  $r = 0,34$ .



**Slika 78.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi *Bacillus subtilis* u koncentraciji od 1 %



**Slika 79.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi ulja čajnog drveta u koncentraciji od 1 %



**Slika 80.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi tiofanat-metila u koncentraciji od 0,1 %



**Slika 81.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi iprodiona u koncentraciji od 0,3 %



**Slika 82.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi prochloraza u koncentraciji od 0,08 %



**Slika 83.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi fluopirama u koncentraciji od 0,1 %



**Slika 84.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Rhizoctonia solani* i tretirane preparatom na bazi azoksistrobina u koncentraciji od 0,075 %



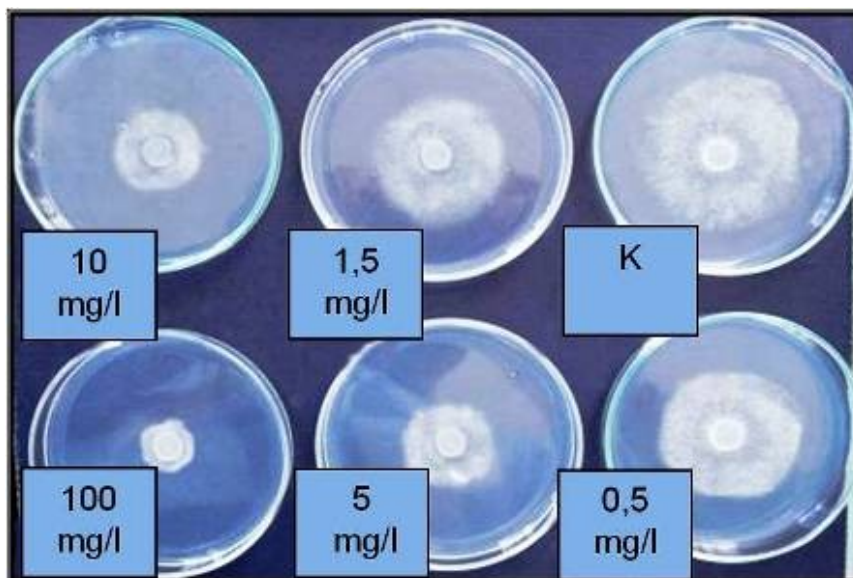
**Slika 85.** *Rhizoctonia solani*. Kontrolne inokulisane biljke paprike (K)



Slika 86. Neinokulisane i netretirane biljke paprike (AK)

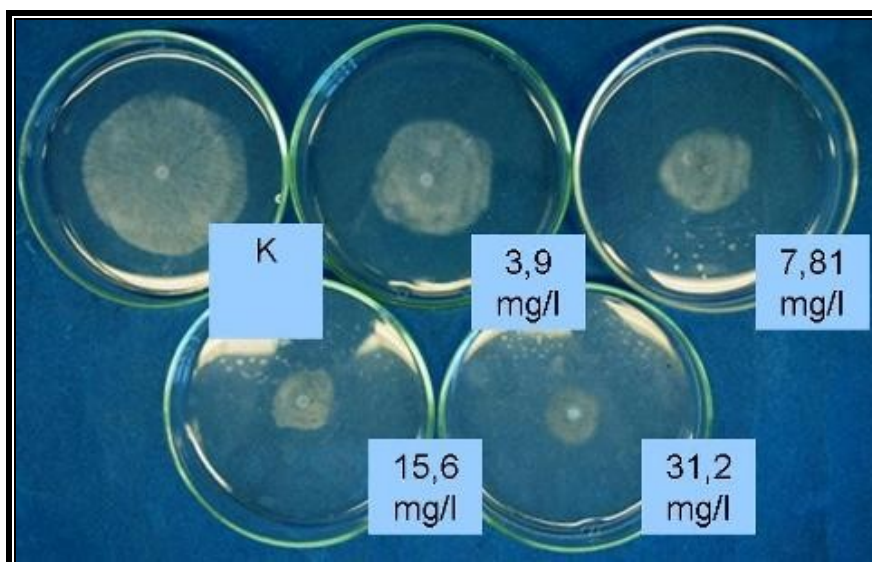
#### 4.2.5. *P. aphanidermatum*

*In vitro*: Pri ispitivanju osetljivosti izolata *P. aphanidermatum* na metalaksil korišćen je interval koncentracija od 0,5 do 100 mg/l. Pod uticajem najniže ispitivane koncentracije od 0,5 mg/l porast micelije izolata *P. aphanidermatum* inhibiran je 34,5 %. Naredne koncentracije (1 i 10 mg/l) inhibirale su porast micelije izolata 47,1 i 73,9 %, a najviša ispitivana koncentracija od 1000 mg/l snažno je zaustavila porast micelije izolata preko 80 % (Slika 87).



Slika 87. Porast izolata *Pythium aphanidermatum* na podlozi sa metalaksilom

Osetljivost izolata *P. aphanidermatum* na propamokarb-hidrohlorid ispitivana je korišćenjem intervala koncentracija od 3,9 do 31,2 mg/l. Najniža koncentracija od 3,9 mg/l inhibirala je porast micelije izolata *P. aphanidermatum* 19,2 %. Naredna koncentracija od 7,81 mg/l ispoljila je inhibitorno delovanje koje je iznosilo 42,3 %, dok je najviša ispitivana koncentracija 31,2 mg/l zaustavila porast micelije izolata 78,2 % (Slika 88).

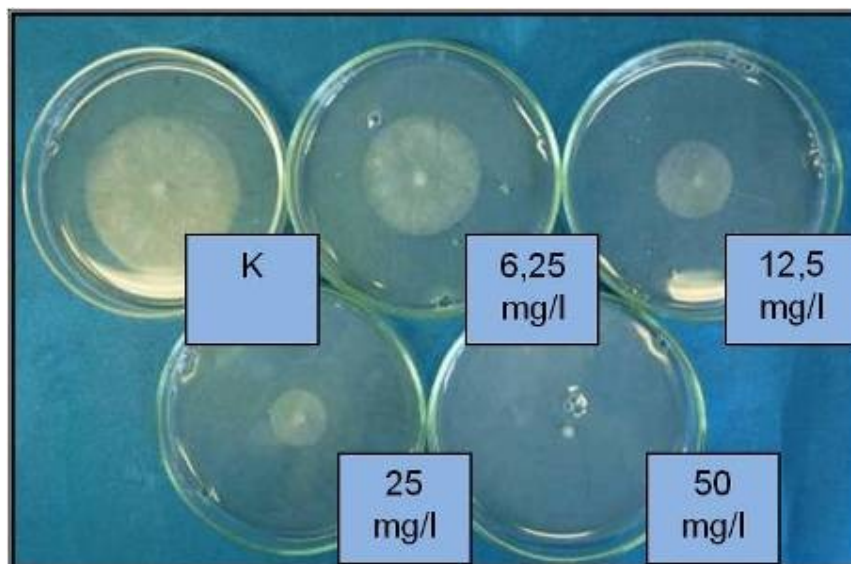


Slika 88. Porast izolata *Pythium aphanidermatum* na podlozi sa propamokarb-hidrohloridomom

Prilikom ispitivanja toksičnosti mankozeba na izolat *P. aphanidermatum* korišćene su koncentracije u intervalu od 6,25 do 50 mg/l. Koncentracija od 6,25 mg/l inhibirala je porast izolata *P. aphanidermatum* 31,8 %, a naredna ispitivana koncentracija od 12,5 mg/l inhibirala

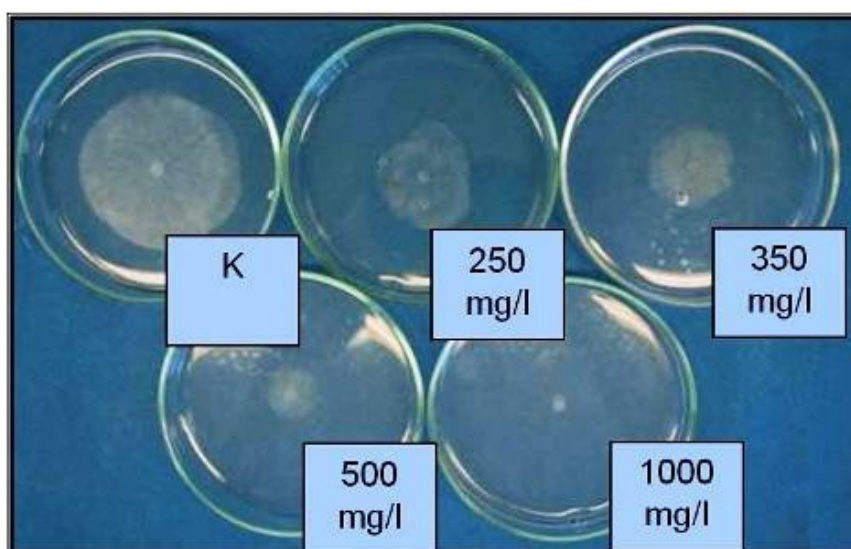


je porast micelije nešto više od 50 % u poređenju sa kontrolom. Najviša ispitivana koncentracija od 50 mg/l snažno je zaustavila porast micelije izolata (97 %) (Slika 89).



Slika 89. Porast izolata *Pythium aphanidermatum* na podlozi sa mankozebom

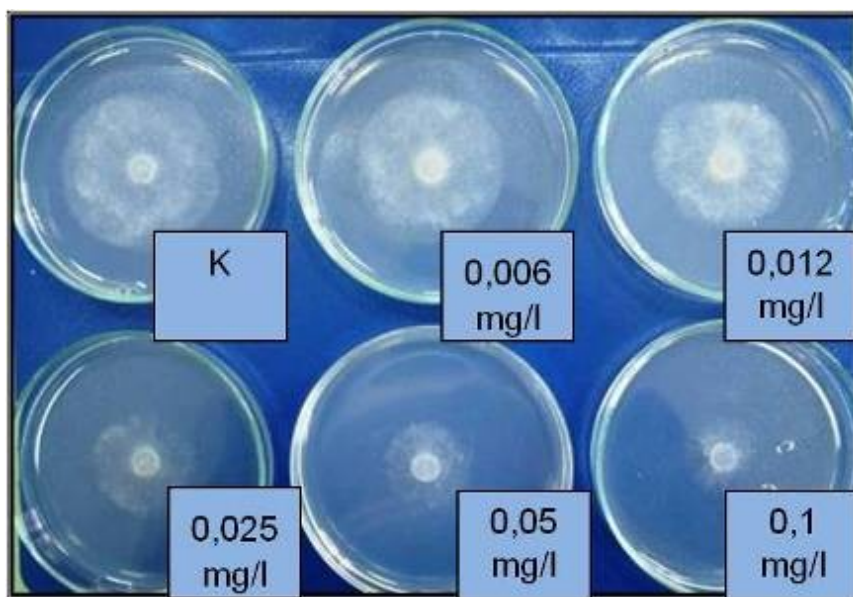
Inhibicija porasta micelije izolata *P. aphanidermatum* iznosila je 5-95 % u odnosu na kontrolu pri intervalu koncentracija fosetil-aluminijuma od 250 do 1000 mg/l. Porast micelije izolata bio je inhibiran za više od 45 % pod uticajem najniže ispitivane koncentracije fosetil-aluminijuma od 250 mg/l. Pri koncentraciji od 500 mg/l došlo je do inhibicije porasta micelije izolata preko 70 %, a najviša ispitivana koncentracija (700 mg/l) snažno je zaustavila porast micelije izolata preko 90 % (Slika 90).



Slika 90. Porast izolata *Pythium aphanidermatum* na podlozi sa fosetil-aluminijumom

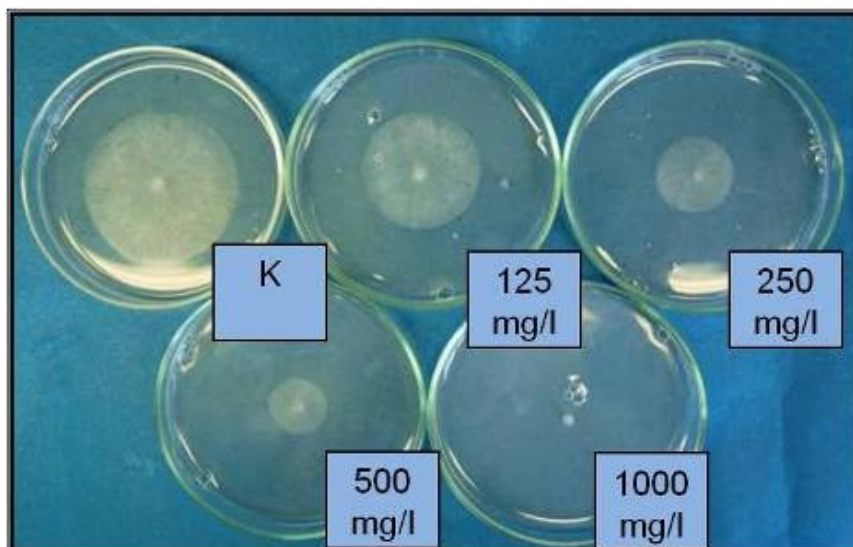
Pri proučavanjima toksičnosti fungicida iz grupe strobilurina, kao što je azoksistrobin, na izolat *P. aphanidermatum*, dodata je salicilhidroksaminska kiselina (SHAM) u koncentraciji od 10 mg/l za koju je testovima toksičnosti utvrđeno da ne remeti porast micelije izolata.

Pri ispitivanju osetljivosti izolata *P. aphanidermatum* na azoksistrobin korišćen je interval koncentracija od 0,006 do 0,1 mg/l. Azoksistrobin je pokazao visoku toksičnost u veoma niskim koncentracijama. Najniža testirana koncentracija od 0,006 mg/l inhibirala je porast izolata *P. aphanidermatum* 11,5 %. Koncentracija od 0,01 mg/l zaustavila je porast micelije izolata 22,9 ,a dve naredne više koncentracije (0,02 odnosno 0,05 mg/l) inhibirale su porast izolata 35,5 %, odnosno 56,3 %. Najveći procenat inhibicije od 64,5 % zabeležen je pri koncentraciji od 0,1 mg/l (Slika 91).



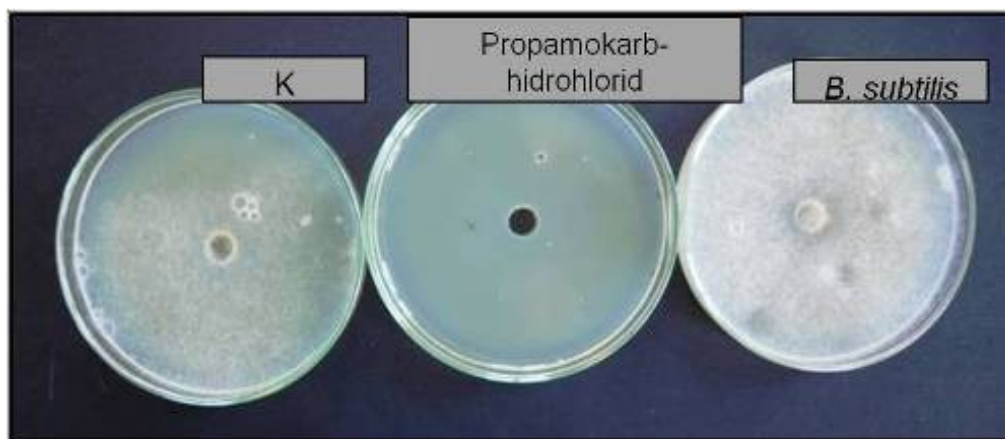
**Slika 91.** Porast izolata *Pythium aphanidermatum* na podlozi sa azoksistrobinom

Osetljivost izolata *P. aphanidermatum* na ulje čajnog drveta ispitivana je korišćenjem intervala koncentracija od 125 do 1000 mg/l. Ispitivanjem uticaja različitih koncentracija utvrđeno je da najniža ispitivana koncentracija od 125 mg/l inhibira porast izolata *P. aphanidermatum* 15,1 %. Koncentracija od 250 mg/l zaustavila je porast micelije izolata 62,1 %, dok je najviša ispitivana koncentracija (1000 mg/l) snažno inhibirala porast micelije izolata, preko 95 % (Slika 92).



**Slika 92.** Porast izolata *Pythium aphanidermatum* na podlozi sa uljem čajnog drveta

Ocenjivanje antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *B. subtilis* vršeno je merenjem prečnika zone inhibicije (mm) i poređenjem sa prečnikom inhibitorne zone u kontroli i tretmanu u kome je korišćen standardni fungicid. Prečnik inhibitorne zone nastao u tretmanu propamokarb-hidrochloridom za izolat *P. aphanidermatum* iznosio je 90 mm. Ispitivani soj nije iskazao antagonističku aktivnost, tako da zona inhibicije nije bila uočljiva, kao ni zona delimične inhibicije porasta micelije (Slika 93).



**Slika 93.** Antagonističke aktivnosti soja Č13 bakterije *Bacillus subtilis* na izolat *Pythium aphanidermatum*

Vrednosti parametara osetljivosti ( $EC_{50}$  vrednost i regresioni koeficijent  $b$ ) za izolata *P. aphanidermatum* prikazane su u tabeli 25.

**Tabela 25.** Osetljivost izolata *Pythium aphanidermatum* na fungicide i biofungicid na bazi ulja čajnog drveta

Ispitivana jedinjenja	Parametar apsolutne osetljivosti EC <sub>50</sub> (mg/l)		
	Vrednost	Opseg	b
Metalaksil	1,27	0,64-2,10	0,56 ±0,08
Propamokarb-hidrochlorid	10,21	8,62-12,01	1,88±0,21
Mankozeb	11,18	9,46-12,90	2,29±0,23
Fosetil-aluminijum	302,65	260,73-337,15	3,07±0,42
Azoksistrobin	0,05	0,04-0,06	1,33±0,15
Ulje čajnog drveta	175,33	132,46-201,57	2,29±0,22

Azoksistrobin je bio najtoksičniji fungicid za izolat *P. aphanidermatum*, sa EC<sub>50</sub> vrednošću od 0,05 mg/l. Vrednost regresionog koeficijenta b za ovaj izolat iznosila je 1,33. Takođe, utvrđena je visoka toksičnost metalaksila na ispitivani izolat, sa EC<sub>50</sub> od 1,27 mg/l. Ovaj izolat poseduje i najvišu relativnu osetljivost na ovaj fungicid (b = 0,56).

Izolat *P. aphanidermatum* ispoljio je umerenu osetljivost na propamokarb-hidrochlorid. Vrednost srednje efektivne koncentracije za ovaj fungicid iznosila je 10,21 mg/l. Nagib regresione linije, tj. regresioni koeficijent b bio je 1,88.

Na osnovu laboratorijskih testova, izračunate su vrednosti parametara koji ukazuju na umerenu toksičnost mankozeba na izolate *P. aphanidermatum*. Utvrđena je relativno visoka vrednost srednje efektivne koncentracije od 11,18 mg/l, dok je nagib regresione linije, tj. koeficijent regresije bio 2,29.

Izolat *P. aphanidermatum* ispoljio je najnižu osetljivost na fosetil-aluminijum. Vrednost srednje efektivne koncentracije pri kojoj je prosečni rast izolata bio inhibiran za 50% u odnosu na kontrolu iznosila je 302,65 mg/l. Ovaj izolat poseduje i najnižu relativnu osetljivost na ovaj fungicid sa vrednošću regresionog koeficijenta b = 3,07.

Ulje čajnog drveta ispoljilo je relativno nisku toksičnost na izolat *P. aphanidermatum*. Za ovaj biofungicid utvrđene su visoke vrednosti srednjih efektivnih koncentracija od 175,33 mg/l. Nagib regresione linije, tj. koeficijent regresije b bio je 2,29.

**In vivo:** U tabeli 26 prikazani su podaci o pojavi poleganja biljaka paprike čiji je prouzročivač *P. aphanidermatum* i efikasnosti primenjenih preparata. U kontrolnom tretmanu sve biljke ispoljile su simptome oboljenja (Ms = 10) (Slika 101). Između jedinjenja postojala je statistički značajna razlika u pogledu efikasnosti. Od testiranih varijanti, najefikasniji bio je preparat na bazi fosetil-aluminijuma (97,5 %) (Slika 97), čija se efikasnost

nije statistički značajno razlikovala u odnosu na efikasnost postignutu u varijanti netretiranih i neinokuliranih biljaka (Slika 102). Najmanja vrednost efikasnosti utvrđena je za preparate na bazi biološki aktivnih supstanci: *B. subtilis* – 22,5 % (Slika 94) i za ulje čajnog drveta – 35 % (Slika 95). Umerena efikasnost postignuta je primenom preparata na bazi propamokarb-hidroklorida (62,5 %) (Slika 96), metalaksila (75 %) (Slika 100) i mankozeba (77,5 %) (Slika 98).

**Tabela 26.** *Pythium aphanidermatum*. Intenzitet oboljenja i efikasnost (E) fungicida

Ispitivana jedinjenja	Konc. primene (%)	Intenzitet oboljenja (%)		Efikasnost (%)
		Ms	Sd	E
<i>B. subtilis</i>	1,0	7,76 e	1,70	22,50
Ulje čajnog drveta	1,0	6,50 e	1,30	35,00
Propamokarb-hidroklorid	0,15	3,76 cd*	1,70	72,50
Fosetil-aluminijum	0,5	0,30 a	0,50	97,50
Mankozeb	0,25	2,30 b	0,50	77,50
Azoksistrobin	0,075	4,30 d	2,20	57,50
Metalaksil	0,03	2,50 b	1,30	75,00
K	-	10,0 d	0,00	-
AK	-	0,00 a	0,00	-

LSD<sub>005</sub> = 1,45 LSD<sub>001</sub> = 1



**Slika 94.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi *Bacillus subtilis* u koncentraciji od 1 %



**Slika 95.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi ulja čajnog drveta u koncentraciji od 1 %



**Slika 96.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi propamokarb-hidrohlorida u koncentraciji od 0,15 %



**Slika 97.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi fosetil-aluminijuma u koncentraciji od 0,5 %



**Slika 98.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi mankozeba u koncentraciji od 0,25 %



**Slika 99.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi azoksistrobina u koncentraciji od 0,075 %



**Slika 100.** Biljke paprike inokulisane izolatom *Pythium aphanidermatum* i tretirane preparatom na bazi metalaksila u koncentraciji od 0,03 %





**Slika 101.** *Pythium aphanidermatum*. Kontrolne inokulisane biljke paprike (K)



**Slika 102.** Neinokulisane i netretirane biljke paprike (AK)

## 5. DISKUSIJA

Patogeni iz zemljišta predstavljaju značajan problem u gajenju povrtarskih biljaka kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju. Rasprostranjeni su u svim važnijim povrtarskim područjima Srbije. U zavisnosti od plodoreda, osetljivosti sorte ili hibrida, virulentnosti patogena, tipa zemljišta i uslova spoljne sredine gubici koji nastaju mogu dostići i 100 % (Purdy, 1979). Štete u proizvodnji paprike sa simptomima „zelenog uvenuća“ bile su u intervalu od 6,3 do čak 97,8 % (Bhat i sar., 2003), dok su gubici u prinosu biljaka paradajza sa simptomima „fuzarioznog uvenuća“ u istraživanjima Rivard i Louws (2008) bili oko 46-50 %. Yanar i sar. (1996) dokazali su da gubici u proizvodnji paprike koje uzrokuje vrsta *S. sclerotiorum* iznose 30-40 %. Takođe, utvrđeni su gubici u prinosu biljaka krompira (10 %) i kupusa (20-30 %) zaraženih gljivom *R. solani* (Ivanović, 2004), kao i biljaka pasulja (70 %) zaraženih vrstama roda *Pythium* (Otsyula i sar., 2003). Koike i sar. (2003) utvrdili su da vrste iz rodova *Verticillium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* i *Pythium* predstavljaju najčešće patogene iz zemljišta koji ugrožavaju biljnu proizvodnju. Naša istraživanja potvrđuju ove navode. U ovom radu utvrđeno je da upravo vrste iz rodova *Verticillium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* i *Pythium* prouzrokuju štete u proizvodnji paprike u Srbiji. Na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika izolata dobijenih iz obolelih biljaka paprike, kao i na osnovu analize ciljanih sekvenci ITS regiona rDNK umnoženih PCR metodom, utvrđeno je da izolati pripadaju vrstama: *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum*.

Imajući u vidu značaj patogenih gljiva iz zemljišta u povrtarskoj proizvodnji i, broj registrovanih preparata za suzbijanje ovih patogena u našoj zemlji je nedovoljan. Protiv poleganja rasada koje prouzrokuju *Pythium* spp. registrovano je šest preparata na bazi propamokarb-hidrohlorida za zalivanje useva paradajza, paprike, krastavca i petunije. Isti preparat u kombinaciji sa fosetil-aluminijumom registrovan je za suzbijane vrsta roda *Pythium* u usevu paprike, paradajza i lubenice. Međutim, za suzbijanje vrsta roda *Rhizoctonia* registrovan je samo preparat na bazi karboksina namenjen za tretiranje semena šećerne repe, soje i uljane repice. Ova aktivna supstanca registrovana je i za suzbijanje vrsta roda *Pythium* u kukuruzu, šećernoj repi i uljanoj repici, ali ne i u povrtarskim kulturama.

Za suzbijanje vrsta roda *Verticillium* u našoj zemlji nema registrovanih preparata, dok su preparati registrovani za suzbijanje vrsta roda *Fusarium* (protiokonazol, tebukonazol, prochloraz, fludioksonil, gvazatin, kaptan, tiram, mankozeb, tiofanat-metil, tiabendazol,

iprodion) uglavnom namenjeni sprečavanju „fuzarioza” žita ili „fuzariozne truleži” u usevu šećerne repe i uljane repice (karboksini+tiram). Boskalid i karbendazim registrovani su za suzbijanje *S. sclerotiorum* u usevu suncokreta, a prosimidon za suzbijanje prouzrokovala „bele truleži” u uljanoj repici. Međutim, ni u jednom od ovih slučajeva, preparati nisu namenjeni za zaštitu povrtnarskih biljaka od patogena iz zemljišta (Janjić i Elezović, 2010).

Takođe, literaturni podaci o osetljivosti ovih, biološki veoma raznolikih patogena na raspoložive fungicide, kao i efikasnosti fungicida u uslovima praktične primene veoma su oskudni. Nedostatak istraživanja u ovoj oblasti verovatno je posledica dugogodišnje primene metil bromida kao univerzalnog sredstva za dezinfekciju zemljišta pre početka proizvodnog ciklusa. Dodatno, u slučaju pojave oboljenja ili pri rasađivanju biljaka, dugo godina je za potapanje rasada i za zalivanje uspešno korišćen benomil. Izbacivanje iz upotrebe metil bromida i benomila zbog njihovih nepovoljnih ekotoksikoloških i toksikoloških svojstava, nametnulo je potrebu proučavanja mogućnosti primene drugih fungicida koji bi bili njihova alternativa. Naša istraživanja su međutim pokazala da proučavane vrste patogena iz zemljišta različito reaguju na pojedine aktivne supstance, kao i da je za svaku vrstu patogena moguće izdvojiti jednu ili nekoliko aktivnih supstanci zadovoljavajuće efikasnosti. Međutim, uzimajući u obzir specifičnost epidemiologije ovih oboljenja, kao i neophodnost primene preparata preko zemljišta, istraživanja mogućnosti biološke zaštite useva od patogena iz zemljišta dobijaju sve veći značaj. U brojnim publikacijama nalaze se podaci koji ukazuju na opravdanost proučavanja mogućnosti primene antagonističkih sojeva mikroorganizama i etarskih ulja lekovitih i aromatičnih biljaka umesto konvencionalnih fungicida (Nejad i Johnson, 2000; Tjamos, 2000; Alström, 2001; Cotxarrera i sar., 2002; Daferera i sar., 2003; Tanović i sar., 2004;2005;Garmendia i sar., 2004; Mercado-Blanco i sar., 2004; Brewer i Larkin, 2005; Huang i sar., 2008;Srivastava i sar., 2010; Hashem i sar., 2010;Hariprasad i sar., 2011). Rezultati ovog rada pokazuju da ni preparati biološkog porekla nemaju isti efekat na sve proučavane vrste patogena.

### 5.1. Efekti fungicida na patogene iz zemljišta

*V. dahliae*: U ispitivanjima efekata fungicida hemijskog porekla (tiofanat-metila, difenokonazola, fluopirama, azoksistrobina i prochloraza) na *V. dahliae* utvrđeno je da fungicidi ispoljavaju različit nivo toksičnosti, kao i da različite vrednosti srednjih efektivnih koncentracija i relativne osetljivosti ukazuju na heterogenost odgovora na jedinjenja sa različitim mehanizmom delovanja. U uslovima *in vitro*, difenokozol je ispoljio najveću toksičnost za proučavani izolat *V. dahliae* sa  $EC_{50}$  vrednošću od 0,02 mg/l. U dostupnoj

literaturi nema podataka o intervalu osetljivosti *V. dahliae* na difenokonazol koji je u našoj zemlji registrovan za suzbijanje *Alternaria solani*, *Podosphaera leucotricha* i za vrste roda *Venturia* (*Venturia inequalis* i *V. pyrina*). Literaturni podaci pokazuju da je osetljivost *A. solani* na ovu aktivnu supstancu u intervalu od 0,018-0,035 mg/l, dok je osetljivost *V. inequalis* u rasponu od 0,016-0,362 mg/l (Stević i sar., 2010; Stepanović, 2012), tako da dobijena vrednost  $EC_{50}$  od 0,02 mg/l ukazuje na visoku osetljivost *V. dahliae* na difenokonazol.

$EC_{50}$  vrednost za osetljivost *V. dahliae* na prohloraz iznosila je 0,03 mg/l. Rezultati su delimično u saglasnosti sa rezultatima Kurt i sar. (2003) koji su u laboratorijskim uslovima, korišćenjem metode inhibicije porasta micelije, utvrdili značajno više vrednosti srednje efektivne koncentracije  $EC_{50} = 0,52-0,84$  mg/l za izolate *V. dahliae*.

Vrednost srednje efektivne koncentracije za tiofanat-metil iznosila je 3,48 mg/l. Dobro fungistatično delovanje fungicida iz grupe benzimidazola (benomil, tiofanat-metil i tiabendazol) na izolate vrste *V. dahliae* utvrdio je i Jordan (1973). Međutim, za vrstu *V. theobromae*, Boubaker i sar. (2008) ustanovili su pojavu rezistentnih izolata na benomil i tiofanat-metil. Za izolate iz divljih populacija *V. theobromae* oni su dobili vrednosti srednjih efektivnih koncentracija od 0,47 mg/l za benomil i 0,91 mg/l za tiofanat-metil, dok je  $EC_{50}$  vrednost za pojedine rezistentne izolate za tiofanat-metil iznosila 233 mg/l. Ovaj nalaz potvrđuje visok rizik razvoja rezistentnosti na benzimidazole.

U istraživanjima izvedenim u uslovima staklenika, fungicidi su ispoljili različit stepen efikasnosti u suzbijanju *V. dahliae*. Najveću efikasnost, koja se nije statistički značajno razlikovala od neinokulisane netretirane kontrole, ispoljio je preparat na bazi tiofanat-metila (83,1 %). Slična efikasnost utvrđena je i za difenokonazol, prohloraz i fluopiram. Rezultati su u skladu sa rezultatima Rekanovića i sar. (2006) koji su utvrdili visoku efikasnost benzimidazola u zaštiti paprike od prouzrokovala „zelenog uvenuća“. U njihovim istraživanjima najveću efikasnost u suzbijanju *Verticillium* sp. na paprici u svim fenofazama razvoja ispoljio je benomil (72,3-84,1 %). Takođe, u ranijim istraživanjima Buchenauer i Erwin-a (1971) utvrđeno je da fungicidi iz grupe benzimidazola efikasno deluju na prouzrokovala „zelenog uvenuća“, kada se primene u koncentraciji od 2500 ppm na biljkama pamuka, dva puta u intervalu od 1-3 dana. U zaštiti pamuka od *V. dahliae* Kurt i sar. (2003) potvrdili su zadovoljavajuću efikasnost prohloraza (56,6-80 %) u količini od 1250 g/ha a.m., uz utrošak 200 l vode po ha primenjenog nakon setve. Međutim, autori su dokazali da je ovaj fungicid samo delimično uspešan u suzbijanju *V. dahliae*, ali da svakako utiče na ublažavanje simptoma „zelenog uvenuća“.

Najniža efikasnost u suzbijanju *V. dahliae* u ovom radu zabeležena je za preparat na bazi azoksistrobina (23,1 %), dok su Bubici i sar. (2006) utvrdili da azoksistrobin i trifloksistrobin pružaju odličnu zaštitu patlidžana od „zelenog uvenuća” u uslovima staklenika. Efikasnost azoksistrobina iznosila je 95 %.

Rezultati proučavanja efekata fungicida na *V. dahliae in vitro* u pojedinim slučajevima značajno se razlikuju od rezultata dobijenih u uslovima staklenika. Difenokonazol je u laboratorijskim istraživanjima bio najtoksičniji, dok je u uslovima staklenika najveću efikasnost ispoljio tiofanat-metil (83,1 %). Međutim, efikasnost difenokonazola nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na tiofanat-metil. Najveća razlika u vrednostima između *in vitro* i *in vivo* ispitivanja utvrđena je u ogledima gde je primenjivan preparat na bazi fluopirama. U laboratorijskim uslovima fluopiram nije inhibirao porast micelije *V. dahliae* čak ni pri koncentraciji od 5000 mg/l, dok je u uslovima staklenika zabeležena efikasnost od 75,4 %. Ovo bi se moglo dovesti u vezu sa mehanizmom delovanja jedinjenja iz grupe piridinil-etil-benzamida kojoj fluopiram pripada. S obzirom da fluopiram inhibira disanje preko inhibitora sukcinat dehidrogenaze (SDHI kompleks), moguće je da u *in vitro* uslovima patogene gljive brže aktiviraju alternativne načine disanja (Avenot i Michailides, 2010). Takođe, Hu i sar. (2011a) su na osnovu proučavanja osetljivosti *Monilinia fructicola* na fluopiram zaključili da KDA podloga nije pogodna za ispitivanje toksičnosti fluopirama jer su dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti za pojedine izolate ove vrste bile više od 100 mg/l, dok su na drugim podlogama dobili višestruko niže vrednosti (0,059-15,6 mg/l) (Hu i sar., 2011b). Uzimajući u obzir rezultate *in vivo* testa, utvrđeno je da KDA podloga verovatno nije pogodna za ispitivanje osetljivosti vrste *V. dahliae* na fluopiram *in vitro*, što bi budućim istraživanjima trebalo dokazati.

***F. oxysporum***: Istraživanjem efekata prohloraza, fluopirama, propikonazola, kaptana i tiofanat-metila na *F. oxysporum* utvrđeno je da ovi fungicidi ispoljavaju različitu toksičnost, a različite vrednosti srednjih efektivnih koncentracija i relativne osetljivosti ukazuju na heterogenost odgovora na jedinjenja sa različitim mehanizmom delovanja.

Prohloraz je ispoljio najveću toksičnost za izolat *F. oxysporum* sa vrednošću srednje efektivne koncentracije od 0,07 mg/l, što potvrđuje visoku toksičnost prohloraza utvrđenu u istraživanjima Amini i Fevzi Sidovich-a (2010). Oni su u ispitivanjima osetljivosti izolata *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, izolovanih iz obolelih biljaka paradajza, na šest različitih fungicida (benomil, karbendazim, prohloraz, fludioksonil, bromukonazol i azoksistrobin), korišćenjem metode inhibicije porasta micelije, dobili najnižu vrednost srednje efektivne koncentracije za prohloraz (EC<sub>50</sub> = 0,005 mg/l).

Visoka toksičnost utvrđena je i za propikonazol sa nešto većom vrednošću  $EC_{50}$  (4,69 mg/l) u odnosu na prochloraz. Najveća koncentracija propikonazola od 0,025 mg/l ispoljila je inhibiciju porasta micelije od 73,3 % u odnosu na kontrolu. Međutim, u istraživanjima Nel i sar. (2007) utvrđeno je da propikonazol u potpunosti inhibira porast micelije *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pri koncentraciji od 100 mg/l.

Od svih testiranih fungicida, fluopiram je bio najmanje toksičan za izolat *F. oxysporum* *in vitro*, sa utvrđenom najvećom vrednošću srednje efektivne koncentracije od 1075,01 mg/l.

Suprotno rezultatima Song i sar. (2004), u našim istraživanjima je za tiofanat-metil utvrđena relativno visoka vrednost srednje efektivne koncentracije ( $EC_{50} = 71,95$  mg/l) i najniža relativna osetljivost. Ovi istraživači utvrdili su visoku toksičnost karbendazima na *F. oxysporum* poreklom iz obolelih biljaka paradajza, sa vrednošću srednje efektivne koncentracije od 0,019 mg/l, što je nekoliko hiljada puta niža vrednost od naših rezultata dobijenih za tiofanat-metil.

U ogledima *in vivo*, fungicidi su ispoljili različit stepen efikasnosti u suzbijanju *F. oxysporum*. Na inokulisanim biljkama paprike najbolji efekat ustanovljen je za preparate na bazi kaptana (95,6 %) i prochloraza (92,2 %). Visoka efikasnost kaptana u smanjenju intenziteta „fuzarioznog uvenuća“ utvrđena je i u zaštiti gladiola (Ram i sar., 2004).

U varijantama primene preparata na bazi propikonazola (75,6 %) i fluopirama (66,7 %) u našim istraživanjima utvrđena je dobra efikasnost. Nel i sar. (2007) takođe potvrđuju efikasnost propikonazola (80,6 %) u poljskim uslovima u suzbijanju „fuzarioznog uvenuća“ lubenice. Od sintetskih jedinjenja u varijanti primene tiofanat-metila postignut je najslabiji efekat u suzbijanju *F. oxysporum* od 54,4 %, dok su Song i sar. (2004) utvrdili da se primenom 5 µg/ml karbendazima postiže efikasnost od 87 % kada se primenjuje preventivno, odnosno 34,4 % kada se primenjuje kurativno.

Rezultati istraživanja sprovedenih u uslovima staklenika su u potpunosti saglasni sa rezultatima laboratorijskih ispitivanja.

***S. sclerotiorum***: Istraživanjima su obuhvaćena ispitivanja efekata konvencionalnih fungicida (prochloraza, fluopirama, boskalida, kaptana, tiofanat-metila) na *S. sclerotiorum*. Fungicidi su ispoljili različit nivo toksičnosti, a različite vrednosti srednjih efektivnih koncentracija i relativne osetljivosti ukazuju na heterogenost odgovora na jedinjenja sa različitim mehanizmom delovanja.

Fluopiram je bio najtoksičniji od svih testiranih fungicida za izolat *S. sclerotiorum*. Vrednost srednje efektivne koncentracije iznosila je 0,003 mg/l. Vrednost srednje efektivne koncentracije za prochloraz bila je relativno niska i iznosila je 1,01 mg/l, dok su Qiu i sar.

(2010) za izolat *S. sclerotiorum* izolovan iz repe dobili skoro dva puta veću  $EC_{50}$  vrednost koja je iznosila 2,24 mg/l. Na osnovu laboratorijskih testova, izračunate su vrednosti parametara koji ukazuju i na relativno visoku toksičnost boskalida na izolate *S. sclerotiorum*. Utvrđena je relativno niska vrednost srednje efektivne koncentracije od 0,1 mg/l. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima u saglasnosti su sa rezultatima Liu i sar. (2009) koji su utvrdili osnovnu osetljivost divlje populacije *S. sclerotiorum* izolovane iz obolelih biljaka uljane repice na boskalid korišćenjem metode inhibicije porasta micelije. Svi izolati ispoljili su visoku osetljivost na boskalid sa  $EC_{50}$  vrednošću u intervalu od 0,002 do 0,391 mg/l. Relativno niska vrednost  $EC_{50}$  od 1,32 mg/l utvrđena je i za tiofanat-metil. Mueller i sar. (2002) utvrdili su osetljivost izolata *S. sclerotiorum* sa soje na fungicide (benomil, tebukonazol, tiofanat-metil i vinklozolin) u laboratorijskim uslovima i u odnosu na naša istraživanja dobili nešto višu toksičnost na tiofanat-metil. Dobijena je  $EC_{50}$  vrednost od 2,2 mg/l. Izolat *S. sclerotiorum* u našim istraživanjima u uslovima *in vitro* ispoljio je najnižu osetljivost na kaptan, sa vrednošću srednje efektivne koncentracije od 8,94 mg/l.

Fungicidi su ispoljili visok stepen efikasnosti u suzbijanju *S. sclerotiorum* u ogledima *in vivo*. Najbolji efekat u suzbijanju *S. sclerotiorum* u uslovima staklenika ispoljio je preparat na bazi kaptana (98 %). Visoku efikasnost ovog jedinjenja iz grupe ftalimida potvrdili su Mueller i sar. (1999) u svojim istraživanjima. Pomenuti istraživači utvrdili su da se kombinovanom primenom kaptana, pentahloronitrobenzena, tiabendazola i fludioksonila 100 % inhibira porast micelije *S. sclerotiorum*. Takođe, utvrđeno je da se tretiranjem zaraženog semena soje kaptanom ostvaruje dobra efikasnost u suzbijanju ovog patogena. Tu (1989) navodi da kaptan primenjen zajedno sa tiofanat-metilom u potpunosti inhibira porast micelije *S. sclerotiorum* na semenu pasulja. Međutim, Iqbal i sar. (2003) istakli su da kaptan ispoljava umerenu efikasnost u sprečavanju klijanja sklerocija.

Visoka efikasnost u suzbijanju *S. sclerotiorum* utvrđena je i za tiofanat-metil (80 %). Efikasnost jedinjenja iz grupe benzimidazola potvrdili su i Jovičević i sar. (2006) koji preporučuju upotrebu karbendazima zajedno sa iprodionom za zaštitu povrtarskih useva od prouzrokovala bele truleži. U ranijim istraživanjima Kishore i Gupta (1997) dokazali su da se tretiranjem semena suncokreta karbendazimom postiže dobra efikasnost u suzbijanju *S. sclerotiorum* (66,7 %).

Ispitivanjima izvedenim u uslovima staklenika utvrđen je i dobar efekat boskalida (76 %) u suzbijanju *S. sclerotiorum*. Smith (2008) je utvrdio efikasnost ovog jedinjenja iz grupe inhibitora enzima sukcinat dehidrogenaze u smanjenju intenziteta „bele truleži“ u uslovima staklenika čiji je prouzrokovalac takođe jedna od vrsta iz roda *Sclerotinia* – *S. minor*. Međutim,

u ogedima koji su izveli Matheron i Porchas (2004) u usevu zelene salate, efikasnost boskalida u suzbijanju *S. sclerotiorum* iznosila je 30,4 %, dok je u suzbijanju *S. minor* postignuta nešto viša efikasnost od 55,5 %.

Od ispitivanih fungicida, u ogedima *in vivo* najniži efekat u suzbijanju *S. sclerotiorum* na inokulisanim biljkama paprike postignut je primenom preparata na bazi prohloraza (45 %) i fluopirama (50 %).

Rezultati ispitivanja efikasnosti fungicida u *in vivo* i u *in vitro* uslovima delimično su u saglasnosti. U ogedima *in vitro* izolat *S. sclerotiorum* je ispoljio najveću osetljivost na fluopiram ( $EC_{50} = 0,003$  mg/l), dok je u uslovima staklenika ispitivani fungicid bio umereno efikasan (50 %). Najveća efikasnost u suzbijanju *S. sclerotiorum* zabeležena je u varijantama primene preparata na bazi kaptana.

**R. solani:** Istraživanja su obuhvatila proučavanja efekata prohloraza, fluopirama, azoksistrobina, iprodiona i karbendazima na *R. solani*. Fungicidi su ispoljili različit nivo toksičnosti, a različite vrednosti srednjih efektivnih koncentracija i relativne osetljivosti ukazuju na heterogenost odgovora na jedinjenja sa različitim mehanizmom delovanja.

Iprodion je u laboratorijskim uslovima ispoljio najveću toksičnost za izolat *R. solani*, sa vrednošću srednje efektivne koncentracije od 0,43 mg/l. Csinos i Stephenson (1999) takođe su, u ispitivanjima osetljivosti izolata *R. solani* na fungicide sa različitim mehanizmom delovanja, utvrdili da su svi izolati bili izuzetno osetljivi na iprodion. Međutim dobijena vrednost srednje efektivne koncentracije bila je znatno niža od one koja je dobijena u našim ispitivanjima ( $EC_{50} = 0,05$  mg/l).

Za karbendazim utvrđena je relativno niska vrednost srednje efektivne koncentracije od 1,84 mg/l na *R. solani*. Zhao i sar. (2009) ispitivali su toksičnost karbendazima na izolata *R. solani* sa pirinča i dobili znatno nižu  $EC_{50}$  vrednost od 0,27 mg/l.

Umerena toksičnost na *R. solani* utvrđena je za prohloraz. Vrednost srednje efektivne koncentracije iznosila je 13,84 mg/l, što je samo delimično u saglasnosti sa rezultatima Carling i sar. (1990) koji su u ispitivanjima osetljivosti 57 izolata *R. solani* na fungicide (benomil, heksakonazol, iprodion, pentahloronitrobenzen i prohloraz) dobili  $EC_{50}$  vrednosti za prohloraz koje su bile u intervalu od 0,3 do > 10 mg/l.

Azoksistrobin je ispoljio najnižu toksičnost ( $EC_{50} = 596,60$  mg/l) na izolat *R. solani*. Međutim, iako istraživanja Meyer i sar. (2006) ukazuju da su fungicidi iz grupe strobilurina, krezoksim-metil ( $EC_{50} = 9,02$  µg/ml) i azoksistrobin ( $EC_{50} = 0,67$  µg/ml) ispoljili najnižu toksičnost u *in vitro* ogedima, dobijene vrednosti su znatno niže od onih koje su dobijene u našim istraživanjima. Ovakva razlika u  $EC_{50}$  može se objasniti specifičnim mehanizmom



delovanja strobilurina (inhibicija respiracija) i mogućnosti aktiviranja alternativnih puteva disanja gljiva. Otuda se u *in vitro* testovima sa strobilurinima dodaje SHAM koji sprečava ove fiziološke procese.

U istraživanjima izvedenim u uslovima staklenika, na inokulisanim biljkama paprike fungicidi su ispoljili visok stepen efikasnosti u suzbijanju *R. solani*.

Preparat na bazi iprodiona ispoljio je efikasnost koja se nije razlikovala u odnosu na neinokulisane netretirane kontrolne biljke (95,8 %). Csinos i Stephenson (1999) su takođe u istraživanjima potvrdili dobar efekat iprodiona u suzbijanju *R. solani* u uslovima staklenika. Visok stepen efikasnosti utvrđen je i u varijantama primene azoksistrobina (89,5 %). Dobru zaštitu biljaka šećerne repe od prouzrokovača truleži korena primenom jedinjenja iz grupe strobilurina potvrdili su Stump i Franc (2003). U tretiranim varijantama intenzitet oboljenja smanjen je za 41-81 %, a prinos je povećan 3-4 puta u odnosu na inokulisanu netretiranu kontrolu u uslovima veštačke inokulacije šećerne repe u polju.

Tiofanat-metil ispoljio je relativno visoku efikasnost od 84,2 %. Takođe, ispitivanja Utiamada i sar. (1999a, b, 2000) i Taneja i Grover-a (1982) potvrdila su izuzetno dobru efikasnost benzimidazola tiofanat-metila i benomila (90 %) u zaštiti useva afričkog pasulja od *R. solani*. Ovi istraživači utvrdili su da su u oglecima sprovedenim u polju u usevu soje najefikasniji bili fungicidi iz grupe strobilurina, triazola i benzimidazola. Od sintetskih fungicida, najslabiji efekat u suzbijanju *R. solani* ispoljio je fluopiram (47,4 %).

Podaci dobijeni u laboratorijskim istraživanjima samo su delimično u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u uslovima staklenika. Iprodion je bio najtoksičniji od svih fungicida i u *in vitro* i *in vivo* testovima. Međutim, preparat na bazi azoksistrobina ispoljio je dobru efikasnost (89,5 %) u uslovima staklenika u suzbijanju *R. solani*, dok je u oglecima *in vivo* bio najmanje toksičan za isti izolat ( $EC_{50} = 596,60$  mg/l).

***P. aphanidermatum***: Istraživanjima su obuhvaćena ispitivanja efekata metalaksila, propamokarb-hidrohlorida, mankozeba, fosetil-aluminijuma i azoksistrobina na *P. aphanidermatum*. Fungicidi su ispoljili različit nivo toksičnosti, a različite vrednosti srednjih efektivnih koncentracija i relativne osetljivosti ukazuju na heterogenost odgovora na jedinjenja iz različitih hemijskih grupa.

U uslovima *in vitro*, azoksistrobin je ispoljio najveću toksičnost za izolat *P. aphanidermatum* sa  $EC_{50}$  vrednošću od 0,05 mg/l. Dobijena vrednost srednje efektivne koncentracije je u saglasnosti sa vrednostima dobijenim u istraživanjima Wheeler i sar. (2005). Ovi istraživači su u laboratorijskim uslovima ispitivali osetljivost 47 izolata *Pythium*

spp. na azoksistrobin i ustanovili da su svi izolati bili veoma osetljivi ( $EC_{50} = 0,001-0,27$  mg/l).

Relativno niska vrednost srednje efektivne koncentracije od 1,27 mg/l utvrđena je i za metalaksil, dok su Al-Sa'di i sar. (2008) dobili nešto niže vrednost srednje efektivne koncentracije ovog fungicida ( $EC_{50} < 0,80$  mg/l) za izolat *P. aphanidermatum* poreklom iz obolelih klijanaca krastavca. Pri koncentraciji metalaksila 10 mg/l porast micelije *P. aphanidermatum* inhibiran je 73,9 %, dok su Abdelhazer i sar. (2004) utvrdili da se pri istoj koncentraciji metalaksila u podlozi porast micelije izolata *P. deliense* i *P. oligandrum* u potpunosti inhibira.

Umerena toksičnost u ogleđima *in vitro* dobijena je za propamokarb-hidrohlorid ( $EC_{50} = 10,2$  mg/l) i mankozeb ( $EC_{50} = 11,2$  mg/l). Podaci dobijeni u našim istraživanjima za propamokarb-hidrohlorid delimično su saglasni sa rezultatima Papavizas i sar. (1978) koji su utvrdili da su  $EC_{50}$  vrednosti propamokarb-hidrohlorida za vrste *P. aphanidermatum*, *P. splendens*, *P. irregulare*, *P. ultimum* i *P. arrhenomanes* bile u intervalu od 0,50 do 10 mg/l. Međutim, nasuprot rezultatima prethodnih ispitivanja, Liu (2007) je dobio znatno veću vrednost srednje efektivne koncentracije za *P. aphanidermatum* koja je iznosila 35,30 mg/l. Dobijeni podaci za mankozeb u saglasnosti su sa rezultatima istraživanja Zhang i sar. (2008) koji su utvrdili vrednost srednje efektivne koncentracije od 8,25 mg/l za izolat *Pythium* sp. poreklom sa luka.

Izolat *P. aphanidermatum* ispoljio je najnižu osetljivost na fosetil-aluminijum, a  $EC_{50}$  vrednost iznosila je 302,65 mg/l. U varijanti primene ovog fungicida utvrđena je i najveća relativna osetljivost sa vrednošću regresionog koeficijenta  $b$  od 3,07. Cook i sar. (2009) utvrdili su znatno niže  $EC_{50}$  fosforne kiseline (koja je produkt razlaganja fosetil-aluminijuma) koje su bile u intervalu od 35,6 do 171,8 mg/l za vrstu *P. aphanidermatum*, dok je za šest izolata *Pythium* spp.  $EC_{50}$  bila u rasponu od 38,7 do 220,8 mg/l.

U istraživanjima izvedenim u uslovima staklenika, fungicidi su ispoljili različit stepen efikasnosti u suzbijanju *P. aphanidermatum*. Najbolja efikasnost u suzbijanju ovog patogena utvrđena je za preparata na bazi fosetil-aluminijuma (97,5 %), čija se efikasnost nije statistički značajno razlikovala u odnosu na apsolutnu kontrolu (netretirane neinokulisane biljke).

Umerena efikasnost utvrđena je u varijantama primene preparata na bazi propamokarb-hidrohlorida (62,5 %) i mankozeba (77,5 %). Baličević i sar. (2008) dokazali su efikasnost propamokarb-hidrohlorida, mankozeba i biološkog preparata na bazi *T. harzianum* u suzbijanju *P. debaryanum* u usevu salate u uslovima plasteničke proizvodnje. Pomenuti

autori utvrdili su da je najveći broj preživelih biljaka bio u varijanti primene biološkog preparata (24,75 biljaka), a najmanji u tretmanu sa mankozebom (9,75 biljaka).

U *in vivo* istraživanjima u varijanti primene preparata na bazi metalaksila utvrđena je efikasnost od 75 %, a uočeno je i njegovo stimulatívno dejstvo na porast biljaka, dok je efikasnost preparata na bazi azoksistrobina iznosila 57,5 %. Salman i Abuamsha (2012) utvrdili su visoku efikasnost metalaksila u zaštiti ponika paradajza od *P. ultimum* kako u tretmanima gde je primenjivan samostalno tako i u slučajevima kombinovane primene sa *P. fluorescens*. Međutim, za razliku od azoksistrobina i piraklostrobina metalaksil nije ispoljio stimulatívno delovanje. Takođe, tretiranjem semena fungicidima (azoksistrobin, metalaksil-M i piraklostrobin) u kombinaciji sa *P. fluorescens* postignuta je efikasnost od 90 %.

Rezultati istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uslovima su u velikoj meri slični. Međutim, u ogleđima u kojima su ispitivani efekti fosetil-aluminijuma utvrđeno je bolje delovanje *in vivo* nego u laboratorijskim uslovima. U *in vitro* ogleđima fosetil-aluminijum je ispoljio najmanju toksičnost za izolat *P. aphanidermatum*. Niska osetljivost *P. aphanidermatum* na ovaj fungicid je očekivana, imajući u vidu njegov mehanizam delovanja. Fosetil-aluminijum menja metabolizam patogena na takav način da biljka domaćin može mnogo brže i efikasnije da pripremi odbrambenu reakciju. Ove promene metabolizma podrazumevaju kombinaciju dva mehanizma: a) smanjenja broja molekula supresora prisutnih na površini patogena, i b) povećanje broja molekula elicitora koji su izloženi receptorima na ćelijama domaćina. Oba navedena mehanizma ne deluju inhibirajuće na patogena *in vitro*, ali su letalna u prisustvu aktivnog odbrambenog sistema biljke domaćina.

Od fungicida hemijskog porekla, najširi spektar delovanja utvrđen je za tiofanat-metil, koji je ispoljio visoku efikasnost u suzbijanju *V. dahliae*, *S. sclerotiorum* i *R. solani* (80-84,2 %). Međutim, nijedan od fungicida ne predstavlja podjednako dobro rešenje za suzbijanje patogena iz zemljišta s obzirom na razliku u spektru delovanja korišćenih supstanci.

## 5.2. Efekti biofungicida na patogene iz zemljišta

Od bioloških preparata proučavani su efekti etarskog ulja čajnog drveta i soja Č13 *B. subtilis* na sve izolate u uslovima *in vitro* i *in vivo*.

Najveću osetljivost na etarsko ulje čajnog drveta u uslovima *in vitro* ispoljio je izolat *S. sclerotiorum*, sa  $EC_{50}$  vrednošću od 70,28 mg/l. Najniža toksičnost ovog etarskog ulja utvrđena je za izolate *V. dahliae* ( $EC_{50} = 1507,65$  mg/l) i *F. oxysporum* ( $EC_{50} = 1205,78$  mg/l) za koje su utvrđene veoma visoke vrednosti srednjih efektivnih koncentracija. Rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja Tanović i sar. (2004) koja su obuhvatila ispitivanja

efekata gasne faze etarskih ulja na patogene iz zemljišta (*Verticillium* sp., *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp. i *Pythium* sp.). U njihovim istraživanjima, najveću toksičnost za sve proučavane izolate ispoljila su etarska ulja timijana i bosiljka sa vrednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) od 0,04-0,65  $\mu$ l/ml vazduha, dok su za ulje čajnog drveta dobijene značajno niže vrednosti (između 0,16-0,65  $\mu$ l/ml vazduha u zavisnosti od patogena).

U oglecima izvedenim u uslovima staklenika na inokulisanim biljkama paprike, preparat na bazi etarskog ulja čajnog drveta ispoljio je u najvećem broju slučajeva nedovoljnu efikasnost suzbijanja patogena iz zemljišta. Jedini izuzetak predstavlja efikasnost suzbijanja vrste *R. solani* koja je u prikazanim eksperimentalnim uslovima bila 90,5 %. Između neinokulisane netretirane kontrole i varijante primene ulja čajnog drveta nije bilo statistički značajne razlike u intenzitetu oboljenja ( $P > 0,05$ ). Najslabiji efekat etarskog ulja čajnog drveta utvrđen je na *F. oxysporum*, sa procentom efikasnosti od 5,6 %. Za izolat *V. dahliae* ustanovljena je najveća antagonistička aktivnost soja Č13 u poređenju sa ostalim patogenima. Međutim, porast micelije *V. dahliae* u zoni dejstva nije bio potpuno zaustavljen već je uočena zona delimične inhibicije porasta micelije prečnika 16 mm. Nizak stepen antagonističke aktivnosti soja Č13 *B. subtilis* utvrđen je i za izolat *F. oxysporum*, dok je za izolate *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum* antagonistička aktivnost potpuno izostala. Istraživanja Grosch i sar. (1999) takođe potvrđuju slabe efekte biofungicida na pseudogljive iz roda *Pythium*. Pomenuti istraživači utvrdili su da nijedan od testiranih sojeva *B. subtilis* nije zadovoljavajuće delovao na razvoj *P. aphanidermatum in vivo*, mada su pojedini sojevi ispoljili visok inhibitorski efekat u laboratorijskim uslovima.

U oglecima izvedenim u stakleniku, soj Č13 *B. subtilis* ispoljio je najbolji efekat u suzbijanju *F. oxysporum* sa efikasnošću od 77,8 %. Međutim, Yu i sar. (2011) utvrdili su nižu efikasnost (50,7 %) *B. subtilis* u suzbijanju prouzrokovala „fuzarioznog uvenuća“ na krastavcu. Isti autori utvrdili su da su u usevu paprike primenom *B. subtilis* simptomi „fuzarioznog uvenuća“ smanjeni za 12,50-56,9 %. Takođe, potvrdili su da ispitivani soj *B. subtilis* stimulatивно deluje na porast biljaka, prinos i masu plodova krastavca. U uslovima staklenika, Tjamos i sar. (2000) utvrdili su da su biljke plavog patlidžana tretirane sojevima *B. subtilis* imale veći prinos za 25 % u odnosu na kontrolu, a da je razvoj simptoma „zelenog uvenuća“ bio umanjeno 20-80 %. Nasuprot tome, u našim istraživanjima, preparat na bazi soja Č13 bakterije *B. subtilis* ispoljio je nisku efikasnost u suzbijanju *V. dahliae* (35,4 %). Takođe, najnovija istraživanja ukazuju da preparati na bazi *B. subtilis* u kombinaciji sa svinjskim stajnjakom smanjuju intenzitet oboljenja „verticilioznog uvenuća“ na pamuku, naročito kada se primenjuju u fenofazi 2-4 stalna lista (Li i sar., 2012). U našim istraživanjima, najniži

procenat efikasnosti soja Č13 *B. subtilis* u uslovima *in vivo* utvrđen je u suzbijanju *P. aphanidermatum* (22,5 %) i *S. sclerotiorum* (5 %). Za razliku od naših istraživanja, Berger i sar. (1996) utvrdili su da soj Cot1 *B. subtilis* ispoljava dobar antagonistički efekat na *Pythium* sp. Utvrđeno je da ispitivani soj u uslovima povećane vlažnosti vazduha u zaštićenom prostoru obezbeđuje dobru zaštitu od *Pythium* sp., ali da efekat zaštite *Aster hybrida*, *Daphne blagayana* i *Photinia fraseri* zavisi kako od gustine bakterijske suspenzije, tako i od količine inokuluma patogena. Takođe, autori naglašavaju da se najbolji efekti postižu pri umerenom intenzitetu napadu patogena ( $\leq 10^2$  oospora po gramu zemljišta), kao i da su na nivou efikasnosti standardnog fungicida na bazi metalaksila.

Dobijeni rezultati koji se odnose na efikasnost *B. subtilis* u suzbijanju *S. sclerotiorum* takođe nisu u saglasnosti sa dostupnim literaturnim navodima. Istraživanjima Yang i sar. (2009) utvrđeno je da *B. subtilis* (soj NJ-18) daje zadovoljavajuće rezultate u suzbijanju *S. sclerotiorum* u usevu pirinča. Zadovoljavajući efekat ovog soja na razvoj patogena potvrđen je kako u laboratorijskim, tako i u poljskim uslovima. Takođe, Schmiedeknecht-a i sar. (2001) navode da soj FZB24 *B. subtilis* utiče značajno na smanjenje pojave *S. sclerotiorum* u usevu suncokreta. Intenzitet „bele truleži“ na biljkama suncokreta bio je smanjen 62 % u varijantama primene ovog biološkog preparata u odnosu na kontrolu.

Istraživanja nisu potvrdila literaturne navode o pozitivnom uticaju *B. subtilis* na parametre porasta biljaka. U našim ispitivanjima zabeležena su odstupanja u rezultatima efekata biofungicida dobijenih u uslovima *in vitro* i *in vivo*. Brojni autori navode da se ove razlike javljaju zbog sposobnosti mikroorganizama da stimulatивно deluju na rast i razvoj biljaka, čime utiču na njihovu otpornost (Omar i Abd-Alla, 1998; Yu i sar., 2011). Takođe, Shao i sar. (2013) su na osnovu rezultata istraživanja zaključili da postoje dva načina delovanja etarskog ulja čajnog drveta: direktno delovanje na ćeliju patogena i aktiviranjem odbrambenih mehanizama biljaka. Direktnom interakcijom gljive sa gasnom fazom etarskog ulja povećava se količina vodonik peroksida što narušava normalno funkcionisanje ćelije patogena i sprečava se aktivacija njenih odbrambenih enzima. S druge strane, u stresnim uslovima biljna ćelija stvara PR (Pathogenesis Related) proteine za koje je poznato da poseduju snažnu antifungalnu aktivnost. Dobijeni rezultati pokazali su da primenom ovog etarskog ulja značajno raste aktivnost  $\beta$ -1,3-glukanaze, jednog od najproučavanijih PR proteina za koji je dokazano da podstiče odbrambene reakcije biljaka i utiče na degradaciju ćelije patogena.

Spektar delovanja biofungicida nije bio zadovoljavajući u prikazanim eksperimentalnim uslovima, tako da dobijeni rezultati ukazuju na rizik primene ovih

preparata u sadašnjem konvencionalnom modelu proizvodnje paprike. Međutim, utvrđena visoka efikasnost soja Č13 *B. subtilis* u suzbijanju *F. oxysporum* (77,8 %), kao i ulja čajnog drveta u suzbijanju *R. solani* (90,5 %) mogla bi da predstavlja realnu osnovu za ciljanu primenu ovih preparata nakon detekcije i identifikacije patogena iz zemljišta, a pre nego što postanu problem u proizvodnji paprike.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata i njihovog razmatranja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Izolacijom patogena iz uzoraka obolelih biljaka paprike i iz zemljišta sa različitih lokaliteta u Srbiji i proučavanjem njihovih patogenih i morfoloških (makroskopskih i mikroskopskih) karakteristika, utvrđeno je da pripadaju vrstama: *V. dahliae*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum*. Identitet izolata potvrđen je na molekularnom nivou analizom sekvenci DNK fragmenata umnoženih univerzalnim ITS1/ITS4 parom prajmera.

- Izolat *V. dahliae*, u uslovima *in vitro* bio je veoma osetljiv na difenokozol ( $EC_{50} = 0,02$  mg/l) i prohloraz ( $EC_{50} = 0,03$  mg/l) i umereno osetljiv na tiofanat-metil ( $EC_{50} = 3,48$  mg/l). U uslovima staklenika, najveću efikasnost u suzbijanju *V. dahliae* na inokulisanim biljkama paprike ispoljio je preparat na bazi tiofanat-metila (83,1 % u odnosu na kontrolu). Međutim, između difenokonazola, fluopirama i prohloraza nije postojala statistički značajna razlika u pogledu intenziteta oboljenja. Najslabija efikasnost utvrđena je za preparat na bazi azoksistrobina (23,1 %) koja se nije razlikovala statistički značajno od kontrole. Takođe, utvrđena je visoka pozitivna korelacija između efikasnosti primenjenih fungicida i visine biljaka ( $r = 0,81$ ), kao i između efikasnosti i sveže mase biljaka paprike. Dužina nekrotiranog prizemnog dela stabla bila je u negativnoj korelaciji sa efikasnošću primenjenih fungicida.

- Za izolat *F. oxysporum*, prohloraz je bio najtoksičniji ( $EC_{50} = 0,07$  mg/l), dok je fluopiram ispoljio najmanju toksičnost ( $EC_{50} = 1075,01$  mg/l). U ogledu *in vivo* najefikasniji bili su preparati na bazi kaptana (95,6 %) i prohloraza (92,2 %), a najmanje efikasan preparat na bazi tiofanat-metila (54,4 %). Korelacija između efikasnosti primenjenih fungicida i visine biljaka bila je umerena, a između efikasnosti i sveže mase biljaka slaba.

- Za izolat *S. sclerotiorum*, utvrđena je najniža vrednost srednje efektivne koncentracije za fluopiram ( $EC_{50} = 0,003$  mg/l), dok je najmanje toksičan za ovaj izolat bio kaptan ( $EC_{50} = 8,94$  mg/l). U uslovima staklenika, najveću efikasnost u suzbijanju *S.*

*sclerotiorum* na inokulisanim biljkama paprike ispoljio je preparat na bazi kaptana (98 %), dok je najniža efikasnost postignuta primenom preparata na bazi prochloraza (45 %). Između efikasnosti fungicida i visine biljaka, kao i između efikasnosti i sveže mase biljaka utvrđena je statistički značajna korelacija.

- Izolat *R. solani* bio je najosetljiviji na iprodion ( $EC_{50} = 0,43$  mg/l), dok je najveća vrednost  $EC_{50}$  utvrđena za azoksistrobin ( $EC_{50} = 596,60$  mg/l). U uslovima *in vivo* najviša efikasnost u suzbijanju *R. solani* postignuta je primenom preparata na bazi iprodiona (95,8 %), a najmanja efikasnost utvrđena je u varijanti u kojoj je primenjivan preparat na bazi fluopirama (47,4 %). Korelacija između efikasnosti fungicida i visine biljaka bila je umerena, a između efikasnosti i sveže mase biljaka slaba.

- Izolat *P. aphanidermatum* ispoljio je najveću osetljivost na azoksistrobin, sa vrednošću srednje efektivne koncentracije 0,05 mg/l, a najnižu na fosetil-aluminijum ( $EC_{50} = 302,65$  mg/l). Od fungicida proučavanih u uslovima staklenika, najbolji efekat u suzbijanju *P. aphanidermatum* ispoljio je preparat na bazi fosetil-aluminijuma (97,5 %), dok je najniža vrednost efikasnosti utvrđena u varijantama primene preparata na bazi azoksistrobina (57,5 %).

- Ulje čajnog drveta ispoljilo je u ogedima *in vitro* najnižu toksičnost na izolat *S. sclerotiorum*, sa vrednošću  $EC_{50}$  od 70,28 mg/l. Najniža toksičnost ovog etarskog ulja utvrđena je za izolate *V. dahliae* ( $EC_{50} = 1507,65$  mg/l) i *F. oxysporum* ( $EC_{50} = 1205,78$  mg/l) sa veoma visokim vrednostima srednjih efektivnih koncentracija. U ogedima *in vitro*, preparat na bazi ulja čajnog drveta ispoljio je najveću efikasnost u suzbijanju *R. solani* (90,5 %), dok je najslabiji efekat zabeležen u suzbijanju *F. oxysporum*, sa procentom efikasnosti od 5,6 %.

- Najveća antagonistička aktivnost soja Č13 *B. subtilis* utvrđena je za izolat *V. dahliae*. Iako nije zaustavljen porast micelije ispitivanog izolata, uočena je zona delimične inhibicije porasta micelije u prečniku od 16 mm. Nizak stepen antagonističke aktivnosti soja Č13 utvrđen je i za izolat *F. oxysporum*, dok primenom pomenutog soja nije utvrđen antagonistički efekat za izolate *S. sclerotiorum*, *R. solani* i *P. aphanidermatum*. U ogedima izvedenim u uslovima staklenika, soj Č13 ispoljio je najbolji efekat u suzbijanju *F.*



*oxysporum*, a efikasnost je iznosila 77,8 %. Najniži procenat efikasnosti soja Č13 *B. subtilis* u uslovima *in vivo* utvrđen je u suzbijanju vrste *S. sclerotiorum* (5 %).

- Od konvencionalnih fungicida najširi spektar delovanja utvrđen je za tiofanat-metil. Međutim, nijedan od korišćenih fungicida ne predstavlja podjednako dobro rešenje za suzbijanje patogena iz zemljišta s obzirom na razliku u spektru delovanja.

- U prikazanim *in vitro* i uslovima staklenika spektar delovanja biofungicida nije bio zadovoljavajući, tako da dobijeni rezultati ukazuju na rizik primene ovih preparata u sadašnjem konvencionalnom modelu proizvodnje paprike. Ipak, utvrđena visoka efikasnost soja Č13 *B. subtilis* u suzbijanju *F. oxysporum* (77,8 %), kao i ulja čajnog drveta u suzbijanju *R. solani* (90,5 %) mogla bi da predstavlja realnu osnovu za ciljanu primenu ovih preparata u proizvodnji paprike nakon detekcije i identifikacije patogena iz zemljišta.

## 7. LITERATURA

- Abdelzaher, H., Shoukamy, M., and Yasser, M. (2004): Effect of Benomyl and Metalaxyl on Reproduction of the Plant Parasite (*Pythium deliense*) and the Mycoparasite (*P. oligandrum*). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 37 (4): 307-317.
- Adams, P.B., and Ayers, W.A. (1979): Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 896-899.
- Al-Rawahi, A.K., and Hancock, F.G. (1998): Rhizosphere competence of *Pythium oligandrum*. Phytopathology, 87: 951-959.
- Al-Sa'di, A.M., Drenth, A., Deadman, M.L., and Aitken, E.A.B. (2008): Genetic diversity, aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Pythium aphanidermatum* populations infecting cucumber in Oman. Plant Pathology, 57: 45-56.
- Alström, S. (2001): Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. Journal of Phytopathology, 149 (2): 57-64.
- Alvarez-Castellanos, P.P., Bishop, C.D., and Pascual-Villalobas, M.J. (2001): Antifungal activity of the essential oil of flower head of garlant chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochemistry, 57 (1): 99-102.
- Amini, J., and Fevzi Sidovich, D. (2010): The Effects of Fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Associated with Fusarium Wilt of Tomato. Journal of Plant Protection, 50 (2): 172-178.
- Anderson, N.A. (1982): The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology, 20 (1): 329-347.
- Anonymous, (2011): EU Pesticides database. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)
- Arslan, M., and Dervis, S. (2010): Antifungal activity of essential oils against three vegetative-compatibility groups of *Verticillium dahliae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26 (10): 1813-1821.
- Asaka, O., and Shoda, M. (1996): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4081-4085.
- Avenot, H.F., and Michailides, T.J. (2010): Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. Crop Protection, 29 (7): 643-651.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. *Food and chemical toxicology*, 46 (2): 446-475.
- Baličević, R., Parađiković, N., Čosić, J., Rozman, V., and Šamota, D. (2008): Suzbijanje zemljišnih parazita (*Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*) na salati biološkim pripravkom. Proceedings 43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture, Opatija, Croatia, Vol. 465, pp 468.
- Bandoni, R.J. (1971): Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia*, 63: 873-874.
- Bedi, K.S. (1962): Light, air and moisture in relation to the formation of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: In: Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B. Springer, India, Vol. 55, No. 5, pp. 213-223.
- Benson, D.M. (1985): Fungicides for control of Phytophthora root rot of azalea. *Plant Disease*, 69: 697-699.
- Benson, D.M. (1990): Landscape survival of fungicide-treated azaleas inoculated with *Phytophthora cinamoni*. *Plant Disease*, 74: 635-637.
- Ben-Yephet, Y., Melero-Vera, J.M., and DeVay, J.E. (1988): Interaction of Soil Solarization and Metham-Sodium in the Destruction of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Crop Protection*, 7: 327-331.
- Berger, F., Hong, Li., White, D., Frazer, R., and Liefert, C. (1996): Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of Phytophthora and Pythium damping-off by *Bacillus subtilis* cot 1 in Highhumidity fogging glasshouses. *Phytopathology*, 86: 428-433.
- Bhat, R.G., Smith, R.F., Koike, S.T., Wu, B.M., and Subbaro, K.V. (2003): Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and wilt epidemics of pepper. *Plant Disease*, 87: 789-797.
- Boller, T., and Metraux, J.P. (1988): Extracellular localization of chitinase in cucumber. *Physiological and molecular plant pathology*, 33 (1): 11-16.
- Boubaker, H., Saadi, B., Boudyach, E.H., and Benaoumar, A.A. (2008): Resistance of *Verticillium theobromae* to benzimidazole fungicides in Morocco. *Journal of Applied Sciences*, 8 (21): 3903-3909.
- Brannen, P.M., and Kenney, D.S. (1997): Kodiak – a successful biological control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19 (3): 169-171.
- Brewer, M.T., and Larkin, R.P. (2005): Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*, 24: 939-50.

- Bubici, G., Amenduni, M., Colella, C., D'Amico, M., and Cirulli, M. (2006): Efficacy of acibenzolar-S-methyl and two strobilurins, azoxystrobin and trifloxystrobin, for the control of corky root of tomato and *Verticillium* wilt of eggplant. *Crop Protection*, 25: 814-820.
- Buchenauer, H., and Erwin, D.C. (1971): Control of *Verticillium* wilt of cotton by spraying foliage with benomyl and thiabendazole solubilized with hydrochloric acid. *Phytopathology*, 61: 433-434.
- Budge, S.P., and Whipps, J.M. (2001): Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. *Phytopathology*, 91(2): 221-227.
- Bull, C.T., Weller, D.M., and Thomashow, L.S. (1991): Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *triciticola* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81: 954-959.
- CaiHua, L., KaiYun, W., ChunBo, G., YiMing, Z., and Fang, N. (2009): Sensitivities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* to four triazole fungicides in major strawberry-growing areas of Shandong Province. *Acta Phytophylacica Sinica*, 36 (1): 55-60.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., and Kaya, E. (2005): Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 245-256.
- Carling, D.E., Helm, D.J., and Leiner, R.H. (1990): In vitro sensitivity of *Rhizoctonia solani* and other multinucleate and binucleate *Rhizoctonia* to selected fungicides. *Plant Disease*, 74: 860-863.
- Carson, C.F., Mee, B.J., and Riley, T.V. (2002): Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6): 1914-20.
- Chatterton, S., Sutton, J.C., and Boland, G.J. (2004): Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. *Biological Control*, 30 (2): 360-373.
- Chellemi, D.O. (2006): Effect of urban plant debris and soil management practices on plant parasitic nematodes, *Phytophthora* blight and *Pythium* root rot of bell pepper. *Crop Protection*, 25 (10): 1109-1116.

- Chew, F.S. (1988): Searching for defensive chemistry in the *Cruciferae*, do glucosinolates always control interactions of *Cruciferae* with their potential herbivores and symbionts? In: (ed. K.C. Spencer). Chemical Mediation of Coevolution. Academic Press, San Diego, California, pp. 81-112.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., and Vlietinck, A.J. (2002): Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213-220.
- Clemons, G.P., and Sisler, H.D. (1971): Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1 (1): 32-43.
- Cohen, Y., and Samoucha, Y. (1990): Competition between oxadixyl-sensitive and-resistant field isolates of *Phytophthora infestans* on fungicide-treated potato crops. *Crop Protection*, 9 (1): 15-20.
- Conn, K.L., and Lazarovits, G. (1999): Impact of animal manures on *Verticillium* wilt, potato scab, and soil microbial populations. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 81-92.
- Conn, K.L., and Lazarovits, G. (2000): Soil factors influencing the efficacy of liquid swine manure added to soil to kill *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 400-406.
- Cook, P.J., Landschoot, P.J., and Schlossberg, M.J. (2009): Inhibition of *Pythium* spp. and suppression of *Pythium* blight of turfgrasses with phosphonate fungicides. *Plant Disease*, 93 (8): 809-814.
- Copping, L.G., and Menn, J.J. (2000): Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56 (8): 651-676.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., and Alabouvette, C. (2002): Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 467-476.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., and Wyllie, S.G., (2000): The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170-175.
- Csinos, A.S., and Stephenson, M.G. (1999): Evaluation of fungicides and tobacco cultivar resistance to *Rhizoctonia solani* incited target spot, damping off and sore shin. *Crop Protection*, 18: 373-377.
- Cuong, N.D., and Dohroo, N.P. (2006): Morphological, cultural and physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk rot of cauliflower. *Omonrice*, 14: 71-77.

- Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., i Ravlić, M. (2010): Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na porast fitopatogenih gljiva *in vitro*. Poljoprivreda, 16 (2): 25-28.
- D'Ercole, N., Nipoti, P., Di Pillo L., and Gavina, F. (2000): *In vitro* and *in vivo* Tests of *Trichoderma* spp. as a Biocontrol Agent of *Verticillium dahliae* Kleb. In: Proceeding 7th. Verticillium Symposium Eggplants American Phytopathological Society, Advances in verticillium Research and Disease Management, Saint Paul, Minnesota, pp. 260-263.
- Dababat, A.A., Sikora, R.A., and Haushild, R. (2005): Analysis of the mode of action of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* 162 toward *Meloidogyne incognita* on tomato plants. 33. Tagung des Arbeitskreises Nematologie, Groß Stromkendorf, Germany.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N., and Polissiou, M.G. (2003): The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection, 22: 39-44.
- Davidse, L.C. (1995): Phenylamide fungicides – biochemical action and resistance. In: Modern selective fungicides. Properties, applications, mechanisms of action (Lyr, H., ed.), New York, USA: Gustav Fischer Verlag.
- Davidse, L.C., and Ishii, H. (1995): Biochemical and molecular aspects of mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates i N-fenilformamidoximes and mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr, H. (ed.), Modern selective fungicides, 2nd revised and enlarged edition. Gustav Fisher Verlag: Stuttgart, 245-257.
- Davidse, L.C., Gerritsma, O.C.M., Ideler, J., Pie, K., and Velthuis, G.C.M. (1988): Antifungal modes of action of metalaxyl, cyprofuram, benalaxyl and oxadixyl in phenylamide-resistente strains of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* and *Phytophthora infestans*. Crop Protection, 7: 347-355.
- Davis, J.R., Huisman, O.C., Westermann, D. T., Everson, D.O., Sorensen, L.H., and Schneider, A.T. (2000): Alternative approaches for control of Verticillium wilt of potato with sudangrass. Advances in *Verticillium*: Research and Disease Managment, APS Press, St. Paul. 100-102.
- Davis, J.R., Huisman, O.C., Westermann, D.T., Hafez, S.L., Everson, D.O., Sorensen, L.H., and Schneider, D.O. (1996): Effects of Green Manures on *Verticillium* Wilt of Potato. Phytopathology, 86: 444-453.

- Dean, R.A., and Kuć, J. (1986): Induced systemic protection in cucumbers: the source of the “signal”. *Physiological and molecular plant pathology*, 28 (2): 227-233.
- Debode, J., Clewes, E., De Backer, G., and Hofte, M. (2005): Lignin is involved in the reduction of *Verticillium dahliae* var. *longisporum* inoculum in soil by crop residue incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 301-309.
- Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. (1995): *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Ins., Boca Raton, Florida, USA.
- Dorman, H.J.D., and Deans, S.G. (2000): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88 (2): 308-316.
- Duduk, N., Obradović, A., i Ivanović, M. (2010): Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na porast micelije *Colletotrichum acutatum*. *Pesticidi i fitomedicina*, 25: 151-156.
- Dueck, J. (1977): *Sclerotinia* in rapeseed. *Canada Agriculture*, 22: 7-9.
- Duffy, B.K., and Défago, G. (1997): Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87:1250-1257.
- Edlich, W., and Lyr, H. (1995): Mechanizm of action of dicarboximide fungicides. In: *Modern Selective Fungicides: properties, applications, mechanisms of action* (ed. Lyr, H.) 2<sup>nd</sup> revised and enlarged edition. Gustav Fisher Verlag, Jena-Stuttgart-NY, pp. 119-131.
- Ellis, M.L. (2009): Assessing the Diversity of *Pythium* species and Fungicide Efficacy in Agronomic Production Fields in Ohio.
- Engelkes, C.A., Nucló, R.L., and Fravel, D.R. (1997): Effect of carbon, nitrogen and C:N ratio on growth, sporulation and bio-control efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, 87: 500-505.
- EPPO (1997a): Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: Design and analysis of efficacy evaluation trials – PP 1/152(2), in *EPPO Standards: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products*, 2, EPPO, Paris, 37-51.
- EPPO (1997b): Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: Conduct and reporting of efficacy evaluation trials – PP 1/181(2), in *EPPO Standards: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products*, 2, EPPO, Paris, 52-58.

- Erwin, D.C., and Ribeiro, O.K. (2005): *Phytophthora diseases worldwide*. APS PRESS, St. Paul, Minnesota.
- Finney, D.J. (1971): *Probit Analysis – A statistical treatment of the sigmoid response curve*. University Press, 3<sup>rd</sup> edition, Cambridge, UK, pp 1-383.
- Fisher, N., and Meunier, B. (2008): Molecular basis of resistance to cytochrome bcl inhibitors. *FEMS Yeast Research*, 8: 183-192.
- Fravel, D.R., and Larkin, R.P. (2000): Effect of Sublethal Stresses on Microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Advances in Verticillium Research and Disease Management. Proc. Int. Verticillium Symp., 7th. American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota*, pp. 301-306.
- Gamliel, A., and Katan, J. (2012): *Soil Solarization: Theory and Practice*. APS Press, Saint Paul, USA.
- Gamliel, A., Austerweil, M., and Kritzman G. (2000): Non Chemical Approach to soilborne pest management - Organic amendments. *Crop Protection*, 19: 847-853.
- Garmendia, I., Goicoechea, N., and Aguirreolea, J. (2004): Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against *Verticillium* Wilt. *Biological Control*, 31: 296-305.
- Gaskill, J.O. (1968): Breeding for *Rhizoctonia* resistance in sugar beet. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists*, 15: 107-119.
- Goicoechea, N., Aguirreolea, J., Cenoz, S., and Garcia-Mina, J.M. (2000): *Verticillium dahliae* Modifies the Concentrations of Proline, Soluble Sugars, Starch, Soluble Protein and Abscisic Acid in Pepper Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 19-25.
- Griffith, J.M., Davis, A.J., and Grant, B.R. (1992): Target sites of fungicides to control of *Oomycetes*. In: *Target Sites of Fungicide Action*, (Köler, W., ed.). CRC Press, Florida, USA, pp 69-100.
- Grosch, R., Junge, H., Krebs, B., and Bochow, H. (1999): Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection*, 106 (6): 568-580.
- Guest, D., and Grant, B. (1991): The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 66: 159-187.
- Gullino, L., Minuto, A., Gilardi, G., and Garibaldi, A. (2002): Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of carnation, cyclamen and Paris daisy. *Crop Protection*, 21: 57-61.



- Gullino, M.L., Camponogara, A., Gasparini, G., Rizzo, V., Clini, C., and Garibaldi, A. (2003): Replacing methyl bromide for soil disinfestation. The Italian experience and implications for other countries. *Plant Disease*, 87: 1012-1021.
- Gupta, J., and Kishore, M.A. (2012): Organic solvents for enhanced efficacy of carbendazim against *Sclerotinia* rot of sunflower. *Indian Phytopathology*, 50 (2): 246-249.
- Hadar, Y., Mandelbaum, R., and Gorodecki, B. (1992): Biological control of soilborne plant pathogens by suppressive compost: In: *Biological control of plant disease* (eds. Tjamos, E.S., Papavizas, G.C., Cook, R.J.). Plenum, New York, USA, pp. 79-83.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., and Riley, T.V. (2000): *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 38 (5): 354-361.
- Hansen, Z.R., and Keinath, A.P. (2013): Increased pepper yields following incorporation of biofumigation cover crops and the effects on soilborne pathogen populations and pepper diseases. *Applied Soil Ecology*, 63: 67-77.
- Hariprasad, P., Divakara, S.T., and Niranjana, S.R. (2011): Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of *Fusarium* wilt in tomato. *Crop Protection*, 30: 1606-1612.
- Harrington, T.C., and Wingfield, B.D. (1995): A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia*, 280-288.
- Harveson, B. (2003): Rhizoctonia crown/root rot. UNL Extension Service.
- Hashem, M., Moharam, A. M., Zaied, A.A., and Saleh, F.E.M. (2010): Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection*, 29 (10): 1111-1117.
- Hawksworth, D.L., and Talboys, P.W. (1970b): *Verticillium dahliae*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, The Eastern Press Ltd., London, UK, 255.
- Hoitink, H.A., and Fahy, P.C. (1986): Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology*, 24 (1): 93-114.
- Horne, S.D. (1999): Previcur 607 SL Point 1: Identity. Report No.: C004913. AgrEvo. A company of Hoechst and Schering.
- Hu, M.J., Cox, K.D., Schnabel, G., and Luo, C.X. (2011a): *Monilinia* species causing brown rot of peach in China. *PLoS ONE*, 6(9): e24990.
- Hu, M.J., Luo, C.X., Grabke, A., and Schnabel, G. (2011b): Selection of a suitable medium to determine sensitivity of *Monilinia fructicola* mycelium to SDHI fungicides. *Journal of Phytopathology*, 159: 616-620.

- Huang, H.C. (1978): *Gliocladium catenulatum*: hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. Canadian Journal of Botany, 56 (18): 2243-2246.
- Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Zhang, X., and Kang, Z. (2008): Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. Journal of Plant Diseases and Protection, 115: 9-16.
- Iqbal, S.M., Ghafoor, A., Ahmad, Z., and Haqqani, A.M. (2003): Pathogenicity and Fungicidal Efficacy for *Sclerotinia* Rot of Brinjal. International Journal of Agriculture and Biology, 4: 618-620.
- Isman, M.B. (2000): Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19: 603-608.
- Ivanović, M. (2004): Mikoze i pseudomikoze biljaka. Nauka, Beograd, Srbija.
- Ivanović, M., i Ivanović, M. (2007): Ima li alternative metil bromidu? Biljni lekar, 35 (6): 609-615.
- Janjić, V. (2005) Fitofarmacija. Beograd - Banja Luka: Društvo za zaštitu bilja Srbije
- Janjić, V., i Elezović, I. (2010): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji (17. izdanje). Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
- Jordan, D.B., Livingston, R.S., Bisaha, J.J., Duncan, K.E., Pember, S.O., Piccollelli M.A., Schwartz, R.S., Sternberger, J.A., and Tang, X.S. (1999): Mode of action of famoxadone. Pesticide Science, 55: 105-118.
- Jordan, V.W.L. (1973): Control of *Verticillium* wilt transmission in strawberry runners with systemic benzimidazole-type fungicides. Annals of Applied Biology, 81 (1): 43-50.
- Jovičević, D., Gvozdenović, Đ., and Bugarski, D. (2006): Diseases pepper and tomato. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, 42 (2): 333-344.
- Kadoglidou, K., Lagopodi, A., Karamanoli, K., Vokou, D., Bardas, G.A., Menexes, G., and Constantinidou, H.I.A. (2011): Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahliae*. European journal of plant pathology, 130 (3): 297-309.
- Karamanoli, K., Menkissoglu-Spiroudi, U., Bosabalidis, A.M., Vokou, D., and Constantinidou, H.I.A. (2005): Bacterial colonization of the phyllosphere of nineteen plant species an antimicrobial activity of their leaf secondary metabolites against leaf associated bacteria. Chemoecology, 15: 59-67.

- Karamanoli, K., Reigosa, M.J., and Pedrol, N. (2002): Secondary metabolites as allelochemicals in plant defence against microorganisms of the phyllosphere. *Allelopathy: From molecules to ecosystems*, 277-288.
- Katan, J. (1980): Soil pasteurization of soils for disease control: status and prospects. *Plant Disease*, 64: 450-454.
- Katan, J. (1987): Soil solarization, In: *Innovative Approaches to Plant Disease Management*, (ed. Chet, I.). John Wiley and Sons, New York, USA, p. 77.
- Katan, J. (2000): Physical and cultural methods for the management of soil-borne pathogens. *Crop Protection*, 19: 725-731.
- Kishore, M.A., and Gupta, J.P. (1997): Organic solvents for enhanced efficacy of carbendazim against Sclerotinia rot of sunflower. *Indian Phytopathology*, 50: 246-249.
- Kishore, M.A., and Gupta, J.P. (2006): Organic solvents for enhanced efficacy of carbendazim against Sclerotinia rot of sunflower. *Indian Phytopathology*, 59 (1): 246-249.
- Klein, E., Katan, J., and Gamliel, A. (2011): Combining residues of herb crops with soil heating for control of soilborne pathogens in a controlled laboratory system. *Crop Protection*, 30: 368-374.
- Klokočar-Šmit, Z., Đurić, T., Indić, D., Peričević, D., Bočarov, A. i Nikolić, N. (2003): Efekat *Bacillus subtilis* ST/III (BEC) u zaštiti i bioregulaciji nekih povrtarskih vrsta. *Zbornik rezimea Šestog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor*, str. 68.
- Koike, S., Subbarao, K., Davis, R.M., and Turini, T. (2003): *Vegetable diseases caused by soilborne pathogens*. UCANR Publications.
- Koike, S.T., Xiao, C.L., Hubbard, K.F., Schulbach, K.F., and Subbarao, K.V. (2000): Effects of Broccoli Residue on the Cauliflower-*Verticillium dahliae* Host-Pathosystem. *Advances in Verticillium Research and Disease Management. Proc. Int. Verticillium Symp., 7th. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.* 317-321.
- Krebs, B., Hoding, B., Kubart, S., Workie, M.A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Grosch, R., Bochow, H., and Hevesi, M. (1998): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 105: 181-197.
- Kuck, K.H., Scheinpflug, H., and Pontzen, R. (1995): DMI fungicides. In: *Modern Selective Fungicides: properties, applications, mechanisms of action* (ed. Lyr, H.), 2<sup>nd</sup> revised and enlarged edition. Gustav Fisher Verlag, Jena-Stuttgart-NY, pp. 205-258.

- Kulka, M., and Von Schmeling, B. (1995): Carboxin fungicides and related compounds. In: Modern Selective Fungicides: properties, applications, mechanisms of action (ed. Lyr, H.), 2<sup>nd</sup> revised and enlarged edition. Gustav Fisher Verlag, Jena-Stuttgart-NY, pp. 133-147.
- Kurt, Ş., Dervis, S., and Sahinler, S. (2003): Sensitivity of *Verticillium dahliae* to prochloraz and prochloraz–manganese complex and control of Verticillium wilt of cotton in the field. *Crop Protection*, 22 (1): 51-55.
- Kutcher, H.R., and Wolf, T.M. (2006): Low-drift fungicide application technology for sclerotinia stem rot control in canola. *Crop Protection*, 25 (7): 640-646.
- Laing, S.A.K., and Deacon, J.W. (1991): Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and an unnamed *Pythium* species. *Mycological Research*, 95 (4): 469-479.
- Lakić, N., i Vukša, P. (1991): Model probit analize u toksikološkim eksperimentima sa gljivicama. *Pesticidi*, 6 (3-4): 185-190.
- Lazarovits, G., Conn, K., and Tenuta, M. (2000): Control of *Verticillium dahliae* with Soil Amendments: Efficacy and Mode of Action. *Advances in Verticillium Research and Disease Management. Proc. Int. Verticillium Symp., 7th. American Phytopathological Society, Minneapolis-St Paul Business Journal*. 274-291.
- Lazarovits, G., Conn, K.L., and Potter, J. (1999): Reduction of potato scab, Verticillium wilt, and nematodes by soymeal and meat and bone meal in two Ontario potato fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21 (4): 345-353.
- Leroux, P., and Gredt, M. (1972): Etude de l' action in vitro des fongicides, methode de l' incorporation ou milieu. *Laboratoire de Phytopharmacie-CNRA-Versailles*, 1-10.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. (2002): Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58: 876-888.
- Leroux, P. (2004): Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Eds. Elad, Y., Williamson, B. Tudzynski, P. Delen, N.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 195-222.
- Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Institut za kukuruz „Zemun Polje”, Društvo genetičara Srbije, Beograd.
- Li, R., Rimmer, R., Buchwaldt, L., Sharpe, A.G., Séguin-Swartz, G., and Hegedus, D.D. (2004): Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with Brassica napus: cloning and

- characterization of endo-and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics and Biology*, 41 (8): 754-765.
- Li, S., Zhang, N., Zhang, Z., Luo, J., Shen, B., Zhang, R., and Shen, Q. (2013): Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. *Biology and Fertility of Soils*, 1-9.
- Lin, D., Qu, L.J., Chen, Z.L., and Gu, H.Y. (2001): A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, *Journal of Applied Microbiology*, 91 (6): 1044-50.
- Liu, X., Yin, Y., Yan, L., Michailides, T.J., and Ma, Z. (2009): Sensitivity to iprodione and boscalid of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected from rapeseed in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95 (2): 106-112.
- Liu, Y.L., Mu, W., and Liu, F. (2007): Studies on the Control of Propamocarb against *Pythium aphanidermatum* and Damping-off on Cucumber Seedling. *Modern Agrochemicals*, 6 (1): 44.
- Locher, P., and Lorentz, G. (1991): Methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to dicarboximide fungicides. In: *FRAC Methods for Monitoring Fungicide Resistance*. EPPO Bulletin, 21: 341-345.
- Loper, J. (1987): Role of fluorescent siderophore production on biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology*, 78: 166-172
- Lopez-Escudero, F.J., and Blanco-Lopez, M.A. (2000): Control of *Verticillium* Wilt by Solarization in Established Olive Orchards in Andalucia (Southern Spain). *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. Proc. Int. Verticillium Symp., 7th. American Phytopathological Society, Minneapolis-St Paul Business Journal, 332-335.
- López-Escudero, F.J., and Blanco-López, M.A. (2001): Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Disease*, 85: 489-496.
- Lumsden, R.D. (1981): A nylon fabric technique for studying the ecology of *Pythium aphanidermatum* and other fungi in soil. *Phytopathology*, 71 (3): 282-285.
- Marinković, N. (1985): Otpornost paprike (*Capsicum* sp.) prema *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.
- Martinez, C., Levesque, A., Belanger, R., and Tweddell, R. (2005): Evaluation of fungicides for the control of carrot cavity spot. *Pest Management Science*, 61: 767-771.

- Matheron, M.E., and Porchas, M. (2004): Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil, and vinclozolin on growth of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. *Plant Disease*, 88 (6): 665-668.
- Mavrodi, O.V., Walter, N., Elateek, S., Taylor, C.G., and Okubara, P.A. (2012): Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*, *Biological Control*, 62 (2): 93-102.
- Mayton, H.S., Olivier, C., Vaughn, S.F., and Loria, R. (1996): Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology*, 86 (3): 267-271.
- McGee, D.C. (1988): *Maize diseases: A reference source for seed technologists*. The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, Minnesota.
- McQuilken, M., Zahniser, J.H., Novak, J., Starks, R.D., Olmos, A., and Bond G.R. (2003): The work project survey: Consumer perspectives on work. *Journal of Vocational Rehabilitation*, 18: 59-68.
- McSpadden Gardener, B.B. (2004): Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* species in agricultural systems. *Phytopathology*, 94: 1252-1258.
- Melero-Vara, J.M., López-Herrera, C.J., Prados-Ligero, A.M., Vela-Delgado, M.D., Navas-Becerra, J.A., and Basallote-Ureba, M.J. (2011): Effects of soil amendment with poultry manure on carnation Fusarium wilt in greenhouses in southwest Spain. *Crop Protection*, 30 (8): 970-976.
- Mercado-Blanco, J., Rodriguez-Jurado, D., Harvas, A., and Jimenez-Diaz, R.M. (2004): Suppression of Verticillium Wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30: 474-486.
- Meyer, M.C., Bueno, C.J., De Souza, N.L., and Yorinori, J.T. (2006): Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of *Rhizoctonia* foliar blight of soybean, and on *Rhizoctonia solani* AG1-IA in vitro development. *Crop Protection*, 25 (8): 848-854.
- Mijatović, M., Obradović, A., i Ivanović, M. (2007): *Zaštita povća od bolesti, štetočina i korova*. AgroMivas, Smederevska Palanka.
- Mišković, A. (2006): Da li će se kalemljenje paprike koristiti i kod nas? *Savremeni povrtar*, 1: 4-5.
- Mitchell, P. (1975): The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Letters*, 59: 137-139.

- Mitić, N. (2004): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji i Crnoj Gori. Petnaesto izmenjeno i dopunjeno izdanje. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
- Mol, L., and Van Riessen, H.W. (1995): Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. European journal of plant pathology, 101 (6): 673-678.
- Morikawa, M. (2006): Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. Journal of bioscience and bioengineering, 101 (1): 1-8.
- Mueller, D.S., Dorrance, A.E., Derksen, R.C., Ozkan, E., Kurle, J.E., Grau, C.R., and Pedersen, W.L. (2002). Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. Plant Disease, 86 (1): 26-31.
- Mueller, D.S., Hartman, G.L., and Pedersen, W.L., (1999): Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. Plant Disease, 83: 1113-1115.
- Nejad, P., and Johnson, P.A. (2000): Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control, 18: 208-215.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., and Viljoen, A. (2007): Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. Crop Protection, 26 (4): 697-705.
- Nene, Y.L., and Thapliyal, P.N. (1994): Fungicides in plant disease control. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford and IBH, New Delhi.
- Olaya, G., and Holm, A. (2001): Sensitivity of *Didymella bryoniae* isolates to azoxystrobin. Phytopathology, 91: S67.
- Omar, S.A., and Abd-Alla, M.H. (1998): Biocontrol of fungal root rot diseases of crop plants by the use of rhizobia and bradyrhizobia. Folia Microbiologica, 43 (4): 431-437.
- Otsyula, R.M., Buruchara, R.A., Mahuku, G. and Rubaihayo, P. (2003): Inheritance and transfer of root rots (*Pythium*) resistance to bean genotypes. African Crop Science Society, 6: 295-298.
- Papavizas, G.C., Lewis, J.A., Locke, J.C., and O'Neill, N.R. (1978): Organic solvent infusion technique for fungicide application to seeds. Phytopathol. Nwsl, 12: 179.
- Parađiković, N., Ćosić J., Baličević R., Vinković T., Vrandečić K., i Ravlić M. (2012): Utjecaj kemijskih i bioloških mjera na rast i razvoj presadnica paprike i suzbijanje fitopatogenih gljiva *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. Glasnik zaštite bilja, 35 (3): 50-56.

- Pasche, J.S., Wharam, C.M., and Gudmestad, N.C., (2004): Shift in sensitivity of *Alternaria solani* to QoI fungicides. *Plant Disease*, 88: 181-187.
- Patil, A., Laddha, A., Lunge, A., Paikrao, H., and Mahure, S. (2012): *In vitro* antagonistic properties of selected *Trichoderma* species against tomato root rot causing *Pythium* species. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 1 (4): 302-315.
- Pegg, G.F., and Brady, B.L. (2002): *Verticillium Wilts*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Pernezny, K., Roberts, D.P., Murphy, F.J., and Goldberg, P.N. (2003): *Compendium of Pepper Disease*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., 21-22.
- Phillips, A.J.L. (1990): The effects of soil solarization on sclerotial population of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 39: 38-43.
- Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Sorokulova, I.B., Verneuil, B., and Urdaci, M.C. (2002): Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. *Research in microbiology*, 153 (5): 269-276.
- Pivonia, S., de Cock, A.W.A.M., Levita, R., Etiel, E., and Cohen, R. (2012): Low temperatures enhance winter wilt of pepper plants caused by *Pythium* sp. *Phytoparasitica*, 40 (5): 525-531.
- Pomar, F., Novo, M., Bernal, M.A., Merino, F., and Barcelo, R.A. (2004): Changes in Stem Lignins (Monomer Composition and Crosslinking) and Peroxidase are Related With the Maintenance of Leaf Photosynthetic Integrity During *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytologist*, 163: 111-123.
- Powell, K.A., and Faull, J.L. (1989): Commercial approaches to the use of biological control agents. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth* (eds. Whipps, J.M., and Lumsden, R.D.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 259-275.
- Purdy, L.H. (1979): *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69: 875-880.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schippers, B., and Bakker, P.A.H.M. (1995): Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85: 1075-1081.
- Rajput, Z.I., Hu, S.H., Chen, W.J., Arijo, A.G., and Xiao, C.W. (2006): Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7 (11): 912-921.



- Ram, R., Manuja, S., Dhyani, D., and Mukherjee, D. (2004): Evaluations of fortified fungicide solutions in managing corm rot disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 23 (9): 783-788.
- Rekanović, E., Milijašević, S., Todorović, B., and Potočnik, I. (2007): Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium* wilt in pepper. *Phytoparasitica*, 35 (5): 436-441.
- Rekanović, E. (2006): Mogućnost biološkog i hemijskog suzbijanja prouzrokovala zelenog uvenuća u početnim fenofazama razvoja paprika. *Pesticidi i fitomedicina*, 21 (2): 149-160.
- Rivard, C.L., and Louws, F.J. (2008): Grafting to manage soilborne diseases in heirloom tomato production. *HortScience*, 43 (7): 2104-2111.
- Robb, J.L.S., Mohan, R., and Kolattukudy P.E. (1991): Chemical Characterization of Stress-Induced Vascular Coating in Tomato. *Plant physiology*, 97: 528-836.
- Robertson, J.L., Smith, K.L., Savin, N.E., and 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.
- Rodgers, P.B. (1989): Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide science*, 27 (2): 155-164.
- Rodriguez, D.J., Hernandez-Castillo, D., Angulo-Sanchez, J.L., Rodriguez-Garcia, J.A., Villarreal Quintanilla, J.A., and Lira-Salvador, R.H. (2007): Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, 25 (2): 111-116.
- Rodriguez, M.A., Cabrera, G., and Godeas, A. (2006): Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of applied microbiology*, 100 (3): 575-586.
- Rodriguez-Kabana, R. (1986): Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *Journal of Nematology*, 18 (2): 129.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W., and Kloepper, J.W. (2003): Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (8): 4927-4932.
- Saharan, G., and Mehta, N. (2008): *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer.

- Salman, M., and Abuamsha, R. (2012): Potential for integrated biological and chemical control of damping-off disease caused by *Pythium ultimum* in tomato. *Biological control*, 57 (5): 711-718.
- Samoucha, Y., and Cohen, Y. (1990): Toxicity of propamocarb to the late blight fungus on potato. *Phytoparasitica*, 18: 27-40.
- Sang, J.P., Minchinton, I.R., Johnstone, P.K., and Truscott, R.J.W. (1984): Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. *Canadian Journal of Plant Science*, 64(1): 77-93.
- Schmiedeknecht, G., Issoufou, I., Junge, H., and Bochow, H. (2001): Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. V. Biological control of diseases on maize and sunflowers. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 108 (5): 500-512.
- Schwinn, F., and Staub, T. (1995): *Oomycetes* fungicides. In: *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanisms of Action* (ed. Lyr, H.) Gustav Fischer Verlag, New York, USA, pp. 323-346.
- Shao, X., Cheng, S., Wang, H., Yu, D., and Mungai, C. (2013): The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology*, 1642-1649.
- Shetty, K.G., Subbarao, K., Martin, F.N., and Koike, S.T. (1999): Management of Verticillium Wilt in Strawberry Using Vegetable Crop Rotation: In: *Proceedings of Annual Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*, pp. 49-1.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., and Gisi, U. (2000): Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science*, 56 (10): 833-841.
- Sivan, A., Elad, Y., and Chet, I. (1984): Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology*, 74 (4): 498-501.
- Smith, D.L., Garrison, M.C., Hollowell, J.E., Isleib, T.G., and Shew, B.B. (2008): Evaluation of application timing and efficacy of the fungicides fluazinam and boscalid for control of Sclerotinia blight of peanut. *Crop Protection*, 27 (3): 823-833.
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. (1991): *Identification of Rhizoctonia species*. APS Press, St. Paul.
- Soesanto, L., and Termorshuizen, A.J. (2001): Effect of temperature on the formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*, 149: 685-691.

- Soltani, N., Conn, K.L., Abbasi, P.A., and Lazarovits, G. (2002): Reduction of potato scab and verticillium wilt with ammonium lignosulfonate soil amendment in four Ontario potato fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 332-339.
- Song, W., Zhou L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., and Liu, X. (2004): Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system, *Crop Protection*, 23: 243-247.
- Southwell, I.A., Hayes, A.J., Markham, J., and Leach, D.N. (2003): The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. *Acta Horticulturae*, 334: 256-265.
- Soylu, E.M., Yigitbas, H., Tok, F.M., Soyly, S., Kurt, S., Baysal, O., and Kaya, A.D. (2005): Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia annua* L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 112 (3): 229-239.
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., and Kurt, Ş. (2007): Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of applied microbiology*, 103 (4): 1021-1030.
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U.S., and Sharma, A.K. (2010): Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53: 24-31.
- Stanković, A. (1972): Fitofarmacija. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Grafičko preduzeće Budućnost, Zrenjanin.
- Stapleton, J.J., and DeVay, J.E. (1986): Soil solarization: a non-chemical approach for management of plant pathogens and pests. *Crop Protection*, 5: 90-198.
- Stein, J.M. (2002): The use of dimethomorph in the control of potato late blight (*Phytophthora infestans*): sensitivity survey, insensitivity generation, and field optimization. Ph.D. Thesis. Michigan State University, Department of Botany and Plant Pathology. USA.
- Stein, T. (2005): *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56: 845-851.
- Stepanović, M. (2012): Osetljivost izolata *Alternaria solani* (Sorauer) iz različitih krajeva Srbije na fungicide i rizik rezistentnosti. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, str. 1-126.

- Stević, M., Vukša, P., and Elezović, I. (2010): Resistance of *Venturia inaequalis* to demethylation inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97 (4): 65-72.
- Stump, W.L., Franc, G.D., Miller, S.D., and Wilson, R.G. (2002): Azoxystrobin and post emergence herbicide combinations for *Rhizoctonia* and weed management in sugarbeet. *Journal of sugar beet research*, 39 (1/2): 37-58.
- Talboys, P.W. (1984): Chemical control of *Verticillium* wilts. *Phytopathologia Mediterranea*, 23: 163-175.
- Tamietti G., and Valentino D. (2006): Soil solarization as an ecological method for the control of *Fusarium* wilt of melon in Italy. *Crop Protection*, 25: 389-397.
- Tamura, H., and Mizutani, A. (1999): Mode of action of strobilurin fungicides. *Journal of Pesticide Science*, 24: 189-196.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steker, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Taneja, M., and Grover, R.K. (1982): Efficacy of benzimidazole and related fungicides against *Rhizoctonia solani* and *R. bataticola*. *Annals of Applied Biology*, 100 (3): 425-432.
- Tanović, B., Milijašević S., and Obradović, A. (2007): *In vitro* effect of plant essential oils on growth of some soil-borne pathogens. *Proceedings of the Third Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Bursa, Turkey – ACTA HORTICULTURAE*, 729: 467-472.
- Tanović, B., Milijašević, S., Obradović, A., Todorović, B., Rekanović, E., i Milikić, S. (2004): *In vitro* efekti etarskih ulja iz začinskih i lekovitih biljaka koji se prenose zemljištem. *Pesticidi i fitomedicina*, 19: 233-240.
- Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., i Rekanović, E. (2005): Toksičnost etarskih ulja za *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro*. *Pesticidi i fitomedicina*, 20: 109-114.
- Tanović, B., Potočnik, I., Delibašić, G., Ristić, M., Kostić, M., and 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): 231-237.
- Tenuta, M. (2001): The role of nitrogen transformation products in the control of soil-borne plant pathogens and pests. Ph.D. Thesis. University of Western Ontario, London, Ont.

- Tenuta, M., and Lazarovits, G. (2002): Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92: 255-264.
- Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Vale, G., Tacconi, G., and Malnati, M. (2007): *In vitro* antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in applied microbiology*, 44 (6): 613-618.
- Thobunluepop, P., Udomsilp, J., Piyo, A., and Khaengkhan, P. (2009): Screening for the antifungal activity of essential oils from Bergamot oil (*Citrus hystrix* DC.) and Tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against economically rice pathogenic fungi: a driving force of organic rice cv. KDML 105 production. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2 (Special Issue): S374-S380.
- Tjamos, E.C., Antoniou, P.P., and Tjamos, S.E. (2000): Implementation of soil solarization in Greece: conclusions and suggestions. *Crop Protection*, 19: 843-846.
- Tjamos, E.C., Biris, D.A., and Paplomatas, E.J. (1991): Recovery of Olive Trees with *Verticillium* wilt after Individual Application of Solarization Established Olive Orchards. *Plant Disease*, 75: 557-562.
- Tomlin, C.S. (2003): *The pesticide manual*. 13<sup>th</sup> edition. BCPC, Farnham, Surrey, UK.
- Tsrer, T. (2010): Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on Potato. *Journal of Phytopathology*, 158: 649-658.
- Tu, J.C. (1989): Management of white mold of white beans in Ontario. *Plant Disease*, 73: 281-285.
- Utiamada, C.M., Oliveira, L.C., and Sato, L.N. (1999a): Eficieência de fungicidas no controle de mela e mancha alvo na cultura da soja. In: XXI Reuniao de Pesquisa de soja da regio central do Brasil. Embrapa Soja, Londrina, pp. 79-80 (abstract) (in Portuguese).
- Utiamada, C.M., Oliveira, L.C., Sato, L.N., and Camargo, T.V. (1999b): Eficiencia de fungicidas no controle de mela e mancha foliar de *Myrothecium* na cultura da soja. In: XXI Reuniao de Pesquisa de soja da regio central do Brasil. Embrapa Soja, Londrina, p. 80 (abstract) (in Portuguese).
- Utiamada, C.M., Sato, L.N., Oliveira, L.C., and Lopes, J. da C. (2000): Eficiencia de fungicidas em aplicac-aõ foliar no controle da mela (*Thanatephorus cucumeris/Rhizoctonia solani*), na cultura da soja. In:XXII Reuniao de Pesquisa de soja da regio central do Brasil. Embrapa Soja, Londrina, p. 80 (abstract) (in Portuguese).

- Vatchev, T., and Maneva, S. (2012): Chemical control of root rot complex and stem rot of greenhouse cucumber in straw-bale culture. *Crop Protection*, 42: 16-23.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J., and Marin, S. (2003): Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 89 (2-3): 145-154.
- Wang, J.X., Ma, H.X., Chen, Y., Zhu, X.F., Yu, W.Y., Tang, Z.H., and Zhou, M.G. (2009): Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed crops to boscalid in Jiangsu Province of China. *Crop Protection*, 28 (10): 882-886.
- Watson, R.T., Albritton, D.T., Anderson, S.O., and Lee-Bapty, S. (1992): Methyl bromide: its atmospheric science, technology and economics. Montreal Protocol Assessment Supplement, United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya, pp. 234.
- Weller, D.M., and Thomashow, L.S. (1994): Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere: In: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and Release of GMOs* (eds O'Gara, F., Dowling, D.N., and Boesten, B.). VCH, New York, USA, pp. 1-18.
- Wheeler, T.A., Howell, C.R., Cotton, J., and Porter, D. (2005): Identification of *Pythium* species on West Texas peanuts and sensitivity of isolates to mefenoxam and azoxystrobin in petri dish assays. *Peanut Science*, 32 (1): 9-13.
- Whipps, J. M., and Gerlagh, M. (1992): Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological research*, 96 (11): 897-907.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., and White, T.J.). Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.
- Willetts, H.J. and Wong, J.A.L. (1980): The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review*, 46: 101-165.
- Williams, J.R., and Stelfox, D. (1980): Influence of farming practices in Alberta on germination and apothecium production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2: 169-172.
- Wilson, C.L., Soalr, J.M., El Ghaouth, A., and Wisniewski M.E. (1997): Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81: 204-210.

- Windels, C.E. (1992): *Fusarium*. In: Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. (eds. Singleton, L.L., Mihail, J.D., Rush, C.M., and St Paul, M.N.): American Phytopathological Society, USA, pp. 115-128.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., and Thompson, C.B. (2008): Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105 (48): 18782-18787.
- Yang, D., Wang, B., Wang, J., Chen, Y., and Zhou, M. (2009): Activity and efficacy *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and sclerotinia stem rot of rape. Biological Control, 51: 61-65.
- Yohalem, D., and Passey, T. (2011): Amendment of soils with fresh and post-extraction lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula intermedia*) reduce inoculum of *Verticillium dahliae* and inhibit wilt in strawberry. Applied Soil Ecology, 49: 187-196.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., and Zhou, G. (2011): The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology, 47 (2): 138-145.
- Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A., and Albasini, A. (1996): Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. Journal of Phytopathology, 144: 491-494.
- Zhang, B., Li, C.S., Li, L., Xu, Z.T., and Li, F. (2008): Control Test of Fungicides on Pythium Root Rot of Garlic. Shandong Agricultural Sciences, 8: 023.
- Zhao, L.J., Yang, X.N., Li, X.Y., and Liu, F. (2009): Toxicity Comparison of 11 Fungicides to *Rhizoctonia solani* Kohn. Agrochemicals Research & Application, 5: 009.
- Ziogas, B.N., Baldwin, B.C., and Young, J.E. (1997): Alternative respiration: A biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. Pesticide Science, 50: 28-34.

## BIOGRAFIJA

Mihajlović Milica rođena je 09. aprila 1987. godine u Drvaru, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i Zemunsku gimnaziju završila je u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završila je 2009. godine odbranom diplomskog rad pod naslovom: „Karakterizacija virusa žutog mozaika cukinija (*Zucchini Yellow Mosaic Virus ZYMV*)”.

Doktorske studije na istom fakultetu, na grupi Fitomedicina, upisala je 2009/10. Od aprila 2010. godine angažovana je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun, kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od oktobra 2012. godine zaposlena je u istom Institutu, u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju u zvanju istraživač-pripravnik.

Od aprila 2010. godine bila je angažovana na realizaciji Projekata „Razvoj i unapređenje bioracionalnih metoda zaštite bilja od bolesti i štetočina”, TR20036, a od januara 2011. godine na Projektu TR31043 „Proučavanje biljnih patogena, artropoda, korova i pesticida u cilju razvoja metoda bioracionalne zaštite bilja i proizvodnje bezbedne hrane“. Oba projekta finansirana su od Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Do sada je objavila i saopštila ukupno 38 naučni rad, od čega osam objavljenih u međunarodnim časopisima, četiri u nacionalnim časopisima, 26 saopštenih na međunarodnim i domaćim skupovima.

Tokom 2014. godine. bila je na četvoromesečnom studijskom boravku u Poljskoj na Forest Research Institute (IBL) u okviru realizacije međunarodnog projekta COST FRAXBACK FP 1103 i u BIH učestvovala je u okviru EU COST Training School (COST Action FP1002) (2013. godine).

Govori, čita i piše engleski jezik.

Bila je član izvršnog odbora X International Rubus and Ribes Symposium, Zlatibor, Serbia, 2011. godine.

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.



## Izjava o autorstvu

Potpisana **Milica Mihajlović**

broj indeksa **35/09**

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Patogeni paprike iz zemljišta i mogućnost njihovog suzbijanja fungicidima“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 28. 03. 2014.

M. Mihajlović

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora **Milica Mihajlović**

Broj indeksa **35/09**

Studijski program **Poljoprivredne nauke Modul: Fitomedicina**

Naslov rada „**Patogeni paprike iz zemljišta i mogućnost njihovog suzbijanja fungicidima**“

Mentor **prof. dr Petar Vukša, redovni profesor**

Komentor **dr Emil Rekanović, naučni saradnik**

Potpisana **Milica Mihajlović**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 28.03.2014.

M. Mihajlović

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Patogeni paprike iz zemljišta i mogućnost njihovog suzbijanja fungicidima“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim predlozima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 28.03.2014.

M. Muxajicbut