

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Jelena M. Luković

**ANTIFUNGALNO DELOVANJE ETARSKIH
ULJA LEKOVITOG I AROMATIČNOG BILJA
NA VRSTE RODA *TRICHODERMA* -
PATOGENE JESTIVIH GLJIVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Jelena M. Luković

**ANTIFUNGALNO DELOVANJE ETARSKIH
ULJA LEKOVITOG I AROMATIČNOG BILJA
NA VRSTE RODA *TRICHODERMA* -
PATOGENE JESTIVIH GLJIVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Jelena M. Luković

**ANTIFUNGAL ACTIVITY OF MEDICINAL
AND AROMATIC PLANT ESSENTIAL OILS
AGAINST *TRICHODERMA* SPECIES - EDIBLE
MUSHROOM PATHOGENS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentori:

dr Ivana Vico, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Ivana Potočnik, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Članovi komisije:

dr Nataša Duđuk, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Rada Đurović-Pejčev, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Emil Rekanović, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Aleksandra Bulajić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

dr Milan Stević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u Laboratoriji za fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine u Zemunu.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Ivani Potočnik, naučnom savetniku, na svemu što me je naučila o giljivama, eksperimentalnom radu i pisanju naučnih radova. Hvala na nesebično prenetom znanju, ukazanom poverenju, stručnosti i savetima. Hvala na razumevanju, strpljenju i podršci tokom svih proteklih godina saradnje.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorki dr Ivani Vico, redovnom profesoru, na divnoj saradnji, pomoći, nesebično prenetom znanju, korisnim savetima i podršci tokom pisanja i izrade disertacije. Hvala na ukazanom poverenju, razumevanju i strpljenju.

Veliko hvala dr Radi Đurović-Pejčev, naučnom savetniku, na divnoj saradnji, podršci, korisnim savetima i pomoći pri izvođenju i tumačenju metoda vezanih za dobijanje i analizu etarskih ulja.

Zahvalnost dugujem i ostalim članovima komisije dr Nataši Duduk, redovnom profesoru, dr Emilu Rekanoviću, naučnom savetniku, dr Aleksandi Bulajić, redovnom profesoru i dr Milanu Steviću, redovnom profesoru, na divnoj saradnji, podršci i korisnim savetima i sugestijama.

Hvala svim kolegama i koleginicama iz Laboratorije za fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine na razumevanju, strpljenju i saradnji, a posebno hvala koleginicama dr Svetlani Milijašević-Marčić, dr Jovani Hrustić, dr Milici Mihajlović i dr Andrei Kosovac na podršci i pomoći pri izvođenju i tumačenju molekularnih metoda. Veliku zahvalnost na pomoći oko molekularnih metoda, kao i na ljubazno ustupljenim izolatima iz Mađarske i Hrvatske, dugujem i kolegama iz Mađarske, posebno Lórántu Hatvaniju (Dear Lori Hatvani, thank you for your help and cooperation!). Takođe, želim da izrazim zahvalnost Teodori Drajić, Valentini Vidić, Katarini Petrović i Mileni Jovanović za pomoć pri izvođenju eksperimentalnih delova disertacije. Posebno hvala Milici Hrustić, Maji Živanović, Luki Šeferu, Milici Milošević i Ivani Alavanji na podršci, razumevanju, kolegijalnosti i smehu.

Veliko hvala porodici Đurović iz Kosjerića na biljnom materijalu mirođije, Milu Drobňaković na biljnom materijalu bosiljka, kompaniji "Tuborg" na industrijskom sladu, kao i kompostari "Uča & co.", Vranovo, Smederevo, za obezbeđen supstrat za gajenje šampinjona korišćen u eksperimentima.

Najveće hvala dugujem svojoj porodici (mami, sestri, bratu i babi) i svim prijateljima na razumevanju, strpljenju, podršci i ljubavi. Hvala tetki, teći i bratu, koji su bili tu za mene od samog početku mog školovanja. Sari i Sonji hvala što su moj život učinile lepšim i boljim - voli vas tetka!

Ovaj rad posvećujem ocu i dedu.

Autor

ANTIFUNGALNO DELOVANJE ETARSKIH ULJA LEKOVITOG I AROMATIČNOG BILJA NA VRSTE RODA *TRICHODERMA* - PATOGENE JESTIVIH GLJIVA

Sažetak

Na osnovu morfoloških, ekoloških i molekularnih karakteristika ITS i *tef-1 α* regiona, identifikovani su prouzrokovaci zelene plesni jestivih gljiva (bukovače i šiitake) u Srbiji i Severnoj Makedoniji: *Trichoderma pleuroti*, *Trichoderma pleuroticola* i *Trichoderma harzianum* kompleks vrsta (THSC). U okviru *Trichoderma harzianum* kompleksa iz gajilišta jestivih gljiva (šampinjona, bukovače i šiitake) u Srbiji, identifikovane su vrste: *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma atrobrunneum*, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma simmonsii* i *Trichoderma* cf. *harzianum*. U istraživanja su uključeni i izolati vrsta *T. pleuroti* i *T. pleuroticola* sa bukovače iz Mađarske i Hrvatske, kao i izolati vrste *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* sa šampinjona iz Srbije.

U cilju pronalazjenja efikasnog bioagensa za zaštitu jestivih gljiva od zelene plesni, ispitano je antifungalno delovanje etarskih ulja prema različitim vrstama roda *Trichoderma*, prouzrokovacima zelene plesni šampinjona, bukovače i šiitake. Ispitan je kvantitativni i kvalitativni sastav i antifungalno delovanje 11 etarskih ulja ekstrahovanih iz lekovitog i aromatičnog bilja poreklom iz Srbije: divlje nane, pitome nane, majčine dušice, bosiljka, jele, bora, tuje, kleke, hajdučke trave, kantariona i mirođije. Antifungalno delovanje određeno je primenom različitih *in vitro* metoda (kontaktne i fumigantne; mikrodilucione i makrodilucione).

Etarska ulja mirođije i majčine dušice ispoljila su fungicidno delovanje prema svim ispitivanim patogenim vrstama roda *Trichoderma* primenom kontaktne mikrodilucione metode. Etarska ulja divlje i pitome nane ispoljila su fungicidni efekat samo prema prouzrokovacima zelene plesni bukovače i šiitake. Najbolje inhibitorno kontaktno delovanje prema svim ispitivanim vrstama roda *Trichoderma* ispoljilo je etarsko ulje mirođije, zatim ulja biljaka iz familije Lamiaceae (majčina dušica, divlja nana, pitoma nana i bosiljak). Dominantne komponente u sastavima etarskih ulja bile su: mirođija – karvon, limonen i α -felandren; majčina dušica – geraniol, karvakrol i timol; pitoma nana – mentol i menton; divlja nana – 1,8-cineol, linalol i mentil acetat i bosiljak – linalol i metil kavikol. Probit analizom utvrđen je visok nivo osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata prema kontaktnom delovanju etarskog ulja mirođije. Delimično inhibitorno delovanje ispoljila su etarska ulja hajdučke trave i četiri zimzelene biljke (jela, kleka, tuja i bor), dok je za etarsko ulje kantariona zabeleženo stimulatívno delovanje na porast patogenih gljiva. Dominantne komponente u sastavima etarskih ulja bile su: tuja – α -pinen i β -3-karen; kleka – α -pinen, mircen i sabinen; jela – p-menta-2,4(8)-dien, triciklen i kamfen; bor – α -pinen i β -pinen; hajdučka trava – β -pinen, 1,8-cineol, β -kariofilen i kamfor i kantarion – β -kariofilen, 2-metil oktan, (E)- β -farnesen i α -pinen.

Primenom makrodilucione fumigantne metode određen je efekat gasovite faze testiranih ulja na klijanje spora i porast micelije testiranih vrsta roda *Trichoderma*. Najbolje antifungalno delovanje primenom ove metode pokazala su etarska ulja biljaka iz familije Lamiaceae sa potpunom inhibicijom porasta micelije svih patogenih vrsta, kao i etarsko ulje mirođije sa potpunom ili delimičnom inhibicijom porasta micelije patogena.

Primenom *Checkerboard* metode ispitan je efekat kombinacija tri etarska ulja, a najbolje antifungalno delovanje je pokazala kombinacija mirođija-divlja nana, kod koje je zabeležen sinergistički efekat delovanja prema osam od devet testiranih vrsta roda *Trichoderma*.

Osetljivost izolata *Trichoderma* spp. prema fungicidima prochlorazu i metrafenonu ispitana je primenom *in vitro* makrodilucione metode. Svi testirani izolati *Trichoderma* spp. pokazali su visoku osetljivost prema oba fungicida. Određena je selektivna toksičnost (indeks selektivnosti) za fungicide prochloraz i metrafenon, kao i etarsko ulje mirođije na osnovu toksičnosti ovih jedinjenja za patogene gljive sa jedne i jestive gljive (domaćine) sa druge strane. Najbolju selektivnu toksičnost za bukovaču i šiitake pokazao je prochloraz, dok je metrafenon bio bolji za šampinjon.

Efikasnost etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi azadiraktina i fungicida prochloraza prema *T. aggressivum* f. *europaeum* ocenjena je u oglednom gajilištu šampinjona. Najveća efikasnost postignuta je primenom fungicida prochloraza i biofungicida na bazi azadiraktina u standardnim

dozama primene. Etarsko ulje mirođije u dozi primene od 2% ispoljilo je statistički značajno veću efikasnost u poređenju sa etarskim uljem mirođije primenjenim u dozi od 1%. Sva testirana antifungalna jedinjenja u oglednom gajilištu su delovala pozitivno na prinos šampinjona. Ispitivanjem prirode međusobnog dejstva ulja mirođije i fungicida prochloraza zabeležen je aditivni efekat kod efikasnosti u suzbijanju patogena i sinergistički u uticaju na prinos.

Na osnovu rezultata dobijenih u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima kao i prirode zajedničkog dejstva sa fungicidom, etarsko ulje mirođije se može preporučiti za formulisanje preparata koji bi se koristio kao deo uspešne i ekološki opravdane strategije suzbijanja prouzrokovala zelene plesni jestivih gljiva. Za etarska ulja majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka preporučuju se dalja *in vivo* proučavanja kako bi se mogla koristiti kao dodaci ili glavne komponente novih formulisanih biopreparata.

Ključne reči: zelena plesan jestivih gljiva, *Trichoderma* spp., bukovača, šiitake, šampinjon, etarska ulja, fungicidi, selektivna toksičnost

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 615.282.123:665.52]:635.82(043.3)

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF MEDICINAL AND AROMATIC PLANT ESSENTIAL OILS AGAINST *TRICHODERMA* SPECIES - EDIBLE MUSHROOM PATHOGENS

Abstract

Based on morphological, ecological and mycological characteristics of ITS and *tef-1 α* regions, the causal agents of green mould disease of edible mushrooms (oyster and shiitake) from farms in Serbia and North Macedonia: *Trichoderma pleuroti*, *Trichoderma pleuroticola* and *Trichoderma harzianum* species complex (THSC), were identified. Within the *Trichoderma harzianum* species complex from farms of edible mushrooms (button mushroom, oyster and shiitake) in Serbia, *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma atrobrunneum*, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma simmonsii* and *Trichoderma* cf. *harzianum* were identified. The isolates of *T. pleuroti* and *T. pleuroticola* species from Hungary and Croatia, as well as isolates of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* from Serbia were included in research.

In order to find an effective biological control agent, antifungal activity of the essential oils to several *Trichoderma* species, the causal agents of green mould disease of edible mushrooms, were tested. The qualitative and quantitative content and antifungal activity of 11 essential oils extracted from medicinal and aromatic plants from Serbia: spearmint, peppermint, thyme, basil, fir, pine, thuja, juniper, yarrow, St. John's wort and dill, were investigated. Antifungal activity of essential oils was determined using several *in vitro* methods (contact and fumigant; microdilution and macrodilution).

Using the contact microdilution method, essential oils of dill and thyme exhibited fungicidal activity against all tested *Trichoderma* species. Essential oils of spearmint and peppermint exhibited fungicidal activity only against *Trichoderma* species isolated from shiitake and oyster mushroom. The dill essential oil has shown the strongest inhibitory activity to all tested pathogenic *Trichoderma* species, followed by four oils of Lamiaceae plants (thyme, spearmint, peppermint and basil). The contact activity of dill essential oil was confirmed using the macrodilution method, and high sensitivity of *Trichoderma* spp. isolates was confirmed using regression analysis. The main components in the compositions of essential oils were: dill – carvone, limonene and α -phellandrene; thyme – geraniol, carvacrol and thymol; peppermint – menthol and menthone; spearmint – 1,8-cineole, linalool and menthyl acetate and basil – linalool and methyl chavicol. Essential oils of yarrow and four evergreen plants (fir, juniper, thuja and pine) were shown a partially inhibitory activity, while the St. John's wort oil was stimulated mycelial growth of all tested *Trichoderma* species. The main components in the compositions of essential oils were: thuja – α -pinene and β -3-carene; juniper – α -pinene, myrcene and sabinene; fir – p-mentha-2,4(8)-diene, tricyclene and camphene; pine – α -pinene and β -pinene; yarrow – β -pinene, 1,8-cineole, β -caryophyllene and camphor and St. John's wort – β -caryophyllene, 2-methyl octane, (E)- β -farnesene and α -pinene.

The effects of the volatile phase of essential oils on spores and mycelia were studied using macrodilution fumigant method. The strongest activity was demonstrated by essential oils of four plants from Lamiaceae family causing total inhibition of mycelial growth of all tested *Trichoderma* species, as well as dill essential oil which caused total or partial inhibition of mycelial growth.

Using the *Checkerboard* method, the synergistic activity of three essential oils combinations were tested, and the dill-spearmint essential oil combination has demonstrated the strongest activity against eight out of nine tested *Trichoderma* species.

Using the macrodilution method and probit analysis, the sensitivity of *Trichoderma* spp. isolates to the fungicides metrafenone and prochloraz were determined. All examined isolates were found to be highly sensitive to both fungicides tested. Considering the susceptibility of host fungi to the fungicides and dill essential oil, the selective toxicity was determined. The fungicide prochloraz was shown the best selective toxicity for oyster mushroom and shiitake, while the fungicide metrafenone was better for button mushroom.

The efficacy of dill essential oil, biofungicide based on azadirachtin and fungicide prochloraz was evaluated against *T. aggressivum* f. *europaeum* in experimental mushroom growing room. Prochloraz and biofungicide based on azadirachtin showed the highest efficacy against the pathogen.

The dill essential oil applied in a dose of 2% showed statistically significant higher efficacy than the dill essential oil applied in a dose of 1%. All tested antifungal compounds applied in experimental mushroom growing room showed positive effect on the button mushroom yield. The combination of prochloraz and dill essential oil showed additive reaction against pathogen, while the combination of prochloraz and dill essential oil showed synergistic reaction in effect on mushroom yield.

The results of *in vitro* and *in vivo* tests indicate that dill essential oil can be used as a biopreparation for the ecologically suitable control of green mould of edible mushrooms. Additionally, the results have shown that the essential oils of thyme, peppermint, spearmint and basil have the potential for further *in vivo* experiments in order to be used as additives or main components of new formulated biopreparations.

Keywords: green mould disease of edible mushrooms, *Trichoderma* spp., oyster mushroom, shiitake, button mushroom, essential oils, fungicides, selective toxicity

Scientific field: Biotechnical Science

Scientific subfield: Phytopathology

UDC: 615.282.123:665.52]:635.82(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Osnovne karakteristike jestivih gljiva	2
2.2. Prouzrokovači mikoza jestivih gljiva	5
2.3. Rod <i>Trichoderma</i>	6
2.3.1. Vrste roda <i>Trichoderma</i> - patogeni šampinjona	8
2.3.2. Vrste roda <i>Trichoderma</i> - patogeni bukovače	9
2.3.3. Vrste roda <i>Trichoderma</i> - patogeni šiitake	10
2.3.4. Interakcija vrsta roda <i>Trichoderma</i> i jestivih gljiva	10
2.4. Primena etarskih ulja u biološkoj zaštiti gajenih kultura od bolesti	11
2.4.1. Dosadašnja istraživanja u zaštiti jestivih gljiva	11
2.5. Etarska ulja lekovitog i aromatičnog bilja	12
2.5.1. Opšte karakteristike lekovitih i aromatičnih biljaka	12
2.5.2. Opšte karakteristike, zastupljenost i lokalizacija etarskih ulja	15
2.5.3. Metode dobijanja, čuvanje i hemijski sastav etarskih ulja	16
2.5.4. Biološka aktivnost etarskih ulja	17
2.6. Zaštita jestivih gljiva od prouzrokovača zelene plesni	18
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	19
4. MATERIJAL I METODE	20
4.1. Poreklo izolata korišćenih u istraživanju	20
4.2. Provera patogenosti izolata	20
4.3. Molekularna identifikacija izolata	20
4.3.1. Ekstrakcija DNA	20
4.3.2. Lančana reakcija polimeraze	21
4.3.3. Vizuelizacija produkata PCR reakcije	22
4.3.4. Sekvenciranje PCR produkata i filogenetske analize	22
4.4. Ispitivanje morfoloških karakteristika dobijenih izolata	22
4.5. Ispitivanje ekoloških karakteristika izolata	23
4.6. Ispitivanje virulentnosti izolata <i>Trichoderma</i> spp.	23
4.7. Ispitivanje antifungalnog delovanja etarskih ulja i fungicida prema <i>Trichoderma</i> spp.	23
4.7.1. Prikupljanje lekovitog i aromatičnog bilja i dobijanje etarskih ulja	23
4.7.2. Analiza etarskih ulja	24
4.7.3. <i>In vitro</i> metode za određivanje antifungalnog delovanja etarskih ulja	24
4.7.4. <i>Checkerboard</i> metoda za utvrđivanje sinergističke aktivnosti etarskih ulja	26
4.7.5. <i>In vitro</i> makrodilucionna metoda za određivanje toksičnosti fungicida	27
4.7.6. <i>In vivo</i> test za procenu efikasnosti antifungalnih jedinjenja i uticaja na prinos šampinjona	28

4.7.7. Ispitivanje aditivnog, sinergističkog ili antagonističkog dejstva antifungalnih jedinjenja.	30
4.8. Statistička analiza.....	30
5. REZULTATI	31
5.1. Simptomi bolesti, izolacija i odabir izolata.....	31
5.2. Patogenost odabranih izolata.....	31
5.3. Molekularna identifikacija i filogenetske analize izolata.....	33
5.4. Morfološke karakteristike izolata <i>Trichoderma</i> spp.	37
5.4.1. Brzina porasta kolonije izolata <i>Trichoderma</i> spp.	39
5.5. Ekološke karakteristike izolata <i>Trichoderma</i> spp.	40
5.6. Virulentnost izolata <i>Trichoderma</i> spp.....	42
5.7. Hemijski sastav etarskih ulja.....	44
5.7.1. Etarska ulja majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka.....	44
5.7.2. Etarska ulja tuje, kleke, jele i bora	45
5.7.3. Etarska ulja kantariona i hajdučke trave	47
5.7.4. Etarsko ulje mirođije	47
5.8. Antifungalno delovanje etarskih ulja <i>in vitro</i>	48
5.8.1. Antifungalno delovanje etarskih ulja majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka.	48
5.8.2. Antifungalno delovanje etarskih ulja jele, kleke, tuje i bora.....	54
5.8.3. Antifungalno delovanje etarskih ulja kantariona i hajdučke trave.....	56
5.8.4. Antifungalno delovanje etarskog ulja mirođije.....	59
5.8.5. Uporedna analiza antifungalnog delovanja etarskih ulja u <i>in vitro</i> testovima	67
5.9. Antifungalno delovanje kombinacija etarskih ulja <i>in vitro</i>	72
5.9.1. Antifungalno delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i majčine dušice	73
5.9.2. Antifungalno delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i divlje nane	74
5.9.3. Antifungalno delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i pitome nane	75
5.9.4. Uporedna analiza antifungalnog delovanja kombinacija etarskih ulja	76
5.10. Osetljivost izolata <i>Trichoderma</i> spp. prema fungicidima	76
5.11. Selektivna toksičnost antifungalnih jedinjenja za jestive gljive	78
5.11.1. Indeksi selektivnosti za šampinjon.....	79
5.11.2. Indeksi selektivnosti za bukovaču.....	80
5.11.3. Indeksi selektivnosti za šiitake.....	80
5.12. <i>In vivo</i> delovanje antifungalnih jedinjenja u oglednom gajilištu šampinjona.....	81
5.12.1. Efikasnost etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi azadiraktina i fungicida prochloraza u suzbijanju <i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	82
5.12.2. Uticaj antifungalnih jedinjenja na prinos šampinjona.....	83
5.12.3. Interakcija etarskog ulja mirođije i fungicida prochloraza u primeni <i>in vivo</i>	85
6. DISKUSIJA	86
6.1. <i>Trichoderma</i> spp. – prouzrokovači zelene plesni jestivih gljiva.....	86
6.1.1. Molekularne karakteristike.....	87

6.1.2. Morfološke i ekološke karakteristike	88
6.2. Virulentnost izolata <i>Trichoderma</i> spp.....	90
6.3. Kvantitativni i kvalitativni sastav etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja.....	91
6.4. Antifungalno delovanje etarskih ulja prema <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	95
6.5. Antifungalno delovanje etarskih ulja prema <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vivo</i>	99
6.6. Osetljivost izolata <i>Trichoderma</i> spp. prema fungicidima	100
6.7. Selektivna toksičnost antifungalnih jedinjenja za jestive gljive	101
7. ZAKLJUČAK.....	103
8. LITERATURA	106
PRILOZI.....	125
BIOGRAFIJA.....	140
Izjava o autorstvu.....	141
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	142
Izjava o korišćenju	143

1. UVOD

Šampinjon [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach], šiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] i bukovača [*Pleurotus ostreatus* (Jasq.) P. Kummer] su tri najviše gajene vrste jestivih gljiva (pečuraka) na svetu. Mnoge štetočine i bolesti mogu smanjiti prinos i kvalitet gajenih gljiva, među kojima mikoze izazivaju najveće štete (**Grogan**, 2008; **Potočnik et al.**, 2015; **Gea et al.**, 2021). Vrste roda *Trichoderma*, zahvaljujući izraženom mikoparazitizmu, nanose ogromne gubitke u gajilištima pečuraka širom sveta i prouzrokuju bolest poznatu kao zelena plesan. Gubici u prinosu jestivih gljiva usled pojave zelene plesni mogu biti od 60 do 100% (**Seaby**, 1996; **Kredics et al.**, 2010). Bolest se manifestuje pojavom simptoma pegavosti i truleži na karpoforama jestivih gljiva, a znaci prisustva patogena se uočavaju i na/u supstratu kog kolonizuje. Micelija vrsta roda *Trichoderma* je gusta, u početku beličaste boje, a nakon sporulacije postaje tamnozeleno, po čemu je bolest i dobila ime (**Kosanović et al.**, 2013). Različite vrste roda *Trichoderma* su identifikovane kao agresivni patogeni i glavni prouzrokovani zelene plesni jestivih gljiva: *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Samuels and W. Gams, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* Samuels and W. Gams i *Trichoderma harzianum* kompleks vrsta (THSC) prouzrokuju zelenu plesan šampinjona, *Trichoderma pleuroti* S.H. Yu and M.S. Park, *Trichoderma pleuroticola* S.H. Yu and M.S. Park i *Trichoderma harzianum* kompleks bukovače, a *Trichoderma harzianum* kompleks šiitake (**Hatvani et al.**, 2007; **Komon-Zelazowska et al.**, 2007; **Wang et al.**, 2016).

Zaštita jestivih gljiva od bolesti uključuje niz preventivnih mera u gajilištu: striktnu higijenu, tretmane dezinficijensima i primenu biofungicida i fungicida, ali je uprkos svim tim merama malo podataka o uspešnom suzbijanju zelene plesni. Mali broj fungicida je preporučen za primenu u zaštiti jestivih pečuraka u svetu, a među njima se kao najefikasniji navodi prochloraz (**Kosanović et al.**, 2013). Nedavno je u zaštiti jestivih gljiva od bolesti u nekim zemljama Evropske unije uveden u primenu fungicid metrafenon i to za suzbijanje paučinaste plesni (prouzrokovatelj: *Cladobotryum* spp.) i suve truleži (prouzrokovatelj: *Lecanicillium* spp) (**Carrasco et al.**, 2017). Uvođenje novih fungicida u zaštitu jestivih gljiva od bolesti je ograničeno, jer su mala ulaganja materijalnih sredstava agrohemijskih kompanija u razvoj fungicida koji se primenjuju u malim usevima (**Chrysai-Tokousbalides et al.**, 2007). Međutim, i pored svih otežavajućih faktora (razvoj rezistentnosti, mali broj preparata, selektivna toksičnost, toksičnost za neciljne organizme i životnu sredinu), hemijske mere su i dalje najčešći i najefikasniji način zaštite.

Poslednjih godina pažnja se sve više usmerava na otkrivanje alternativnih mera zaštite u vidu primene biofungicida. Biofungicidi, odnosno fungicidi prirodnog porekla mogu biti biohemijski – formulisani biljni ekstrakti i ulja, zatim sredstva na bazi korisnih mikroorganizama sa antagonističkim dejstvom na štetne organizme ili aktivatori otpornosti domaćina. Komercijalno su dostupni preparati na bazi različitih *Bacillus* vrsta koje izazivaju značajnu inhibiciju porasta *T. aggressivum* (**Milijašević-Marčić et al.**, 2016), a u upotrebi je i preparat na bazi etarskog ulja čajnog drveta (**Kosanović et al.**, 2013). Kako se uspešnija i ekološki opravdana strategija zaštite jestivih gljiva odnosno suzbijanja prouzrokovatelja zelene plesni zasniva na povećanoj upotrebi bioloških agenasa i smanjenoj upotrebi hemijskih sredstava, u okviru ove doktorske disertacije, ispitivano je antifungalno delovanje etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja na vrste roda *Trichoderma* koje su identifikovane kao patogeni jestivih gljiva u Srbiji i regionu.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Osnovne karakteristike jestivih gljiva

Sakupljanje gljiva iz prirode zbog jestivih i lekovitih svojstava seže u daleku prošlost ljudskog roda. Prvo pominjanje pečuraka za ljudsku upotrebu potiče iz 400. godine pre nove ere, kada je Hipokrat opisivao njihova lekovita svojstva. Do danas je opisano između 80 i 120 hiljada vrsta gljiva sa krupnim karpoforama koje se sastoje iz drške i šešira (makromiceta), mada se njihov broj u prirodi procenjuje na oko 1,5 miliona vrsta (Kirk et al., 2001). Od preko 38 000 identifikovanih vrsta gljiva u svetu, oko 2000 je u različitom stepenu jestivo i većina poseduje lekovita svojstva. Oko 35 vrsta gljiva je kultivisano, dok je samo oko 20 vrsta industrijski značajno. Počeci gajenja pečuraka vezuju se za Kinu. Prve gajene gljive bile su: *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél (Judino uvo), *Flammulina velutipes* (Curt. Ex Fr.) Sing. (panjevčica), *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (šiitake), *Pleurotus* spp. (bukovača) itd. (Chang, 1999). Sredinom 20. veka primenjena je intenzivnija tehnologija gajenja sedam vrsta pečuraka, čija proizvodnja je činila 90% ukupne svetske proizvodnje: šampinjon (*Agaricus bisporus*) sa 32%, šiitake sa 26%, bukovača 14%, Judino uvo 8%, slamnatica (*Volvariella volvacea* (Bull.) Singer.) 5%, panjevčica 3% i žuto uvo (*Tremella* spp.) 2%. Bukovača i šampinjon su bile jedine pečurke koje su se do 1994. godine gajile na svim kontinentima, a od 1997. godine se gaji i jestiva gljiva šiitake (Royse et al., 1999). Šiitake je poslednjih godina postala najviše gajena jestiva gljiva sa 22% ukupne svetske proizvodnje, a zatim šampinjon, bukovača, slamnatica i panjevčica čineći ukupno 85% svetske proizvodnje (Royse et al., 2017). U Srbiji se godišnje proizvede oko 9 hiljada tona šampinjona i manje bukovače i šiitake. Na prvom mestu u svetu po proizvodnji jestivih gljiva je ubedljivo Kina koja proizvede oko 40 milona tona godišnje, dok je u Evropi vodeća Holandija sa proizvodnjom od oko 260 hiljada tona jestivih gljiva godišnje (FAO, 2020).

Šampinjon [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach]. Šampinjon pripada carstvu Fungi, razdelu Basidiomycota, klasi Agaricomycetes, podklasi Agaricomycetidae, redu Agaricales, familiji Agaricaceae i rodu *Agaricus* (Mycobankdatabase, 2022). Veoma je ukusna, hranljiva i lekovita jestiva gljiva. Skoro 90% sveže težine karpofora šampinjona (89,7%) čini voda. Karpofore su bogate proteinima (4,9% sveže težine), ugljenim hidratima (3,6% sveže težine), vitaminima (B1, B2, B5, B6, C, D, H i nikotinskom kiselinom), amino-kiselinama (izoleucin, leucin, lizin, asparagin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, histidin, alanin, arginin, aspartatska kiselina, cistein, cistin, glicin, glutamin, glutaminska kiselina, ornitin, prolin, tirozin), dok su siromašna mastima (svega 0,2% sveže težine) (Maksimović, 1995). Najzastupljenije masne kiseline su linoleinska (53,45-68,78%), palmitinska, oleinska i stearinska (Aktumsek et al., 1998).

Karpofor ili nadzemni deo (pečurka) šampinjona sastoji se od šešira i drške. Supstrat za gajenje prorastaju hife, koje formiraju miceliju gljive. Micelija šampinjona se razvija u podlozi, veoma je razgranata i na njoj se obrazuju primordije od kojih će se daljim diferenciranjem formirati plodonosna tela tipa karpofora. Sasvim mlade karpofore su loptastog oblika, zatvorene i tek se kasnije razgraničavaju na centralno postavljene drške i šešire. Drška je sagrađena od paralelno postavljenih, a šešir od rastresitih hifa. Sa donje strane šešira se formira lamelarni himenofor, koji je u početku bele, zatim ružičaste i na kraju crne boje, zbog prisustva velikog broja tamnih bazidiospora. Sazrevanjem karpofora opna puca, a njeni ostaci se zadržavaju po obodu šešira u vidu resa i na drškama u vidu prstena (*anulus*). Pucanjem opne omogućeno je oslobađanje bazidiospora. Bazidiospore su dvojedarne, eliptične, crne, glatkih ćelijskih zidova i dimenzija $6 - 9 \times 4 - 6 \mu\text{m}$. Na bazidijama se obrazuju samo po dve bazidiospore, po čemu je vrsta i dobila ime (*bisporus*). Šampinjon se može razmnožavati na dva načina: vegetativno i generativno (Maksimović, 1995).

Tehnologija gajenja šampinjona, kao i drugih jestivih gljiva, predstavlja biotehnološki proces reciklaže lignoceluloznog organskog otpada. Smatra se retkim, možda čak i jedinim aktuelnim procesom koji spaja proizvodnju hrane bogate proteinima i smanjenje zagađenja životne sredine (Beetz

and Kustidia, 2004). Šampinjoni se mogu gajiti na intenzivan (industrijski) i ekstenzivan način, u zavisnosti od vrste objekata i njihove opremljenosti. Jedan ciklus (turnus) proizvodnje traje 75 – 90 dana u zavisnosti od uslova gajenja, računajući proizvodnju komposta - supstrata, zasejavanje micelije, postavljanje pokrivke, uzgoj i berbu (Maksimović, 1995).

Celokupnom ciklusu prethodi proizvodnja micelije gajene gljive kao “semenskog materijala” u trajanju od 2 – 3 nedelje. Čista kultura šampinjona iz vegetativnog razvoja se razvija na sterilnom zrnu žitarica (pšenica, ječam, proso i dr.) kao nosaču, koje se masovno proizvodi, što u potpunosti opravdava poistovećivanje micelije sa semenom biljaka (Maksimović, 1995).

Supstrat za gajenje šampinjona ili kompost se pravi od poljoprivrednog otpada, slame i konjskog ili pilećeg stajnjaka. Priprema supstrata se odvija u dve faze: prva faza je faza aerobne fermentacije, kojom mikroorganizmi iz životinjskog stajnjaka razlaganjem biljnog materijala obezbeđuju dostupan ugljenik za šampinjon, a druga faza je faza pasterizacije – kontrolisanog zagrevanja supstrata, kojom se uništavaju štetni mikroorganizmi i pospešuje razvoj korisnih termofilnih mikroorganizama koji dodatno razlažu biljni materijal do raspoloživog oblika za šampinjon. Dodatnim procesom kondicioniranja supstrat se dovodi u najoptimalnije stanje za gajenje šampinjona. Nakon toga sledi zasejavanje supstrata micelijom šampinjona, koja će ga u potpunosti prorasti za 2 – 3 nedelje (Van Griensven and Van Roestel, 2004).

Na površinu potpuno proraslog supstrata micelijom šampinjona nanosi se pokrivka sačinjena od treseta, peska i kreča. Uloga pokrivke je zaštita površine supstrata od isušivanja i stvaranje povoljnih uslova za intenzivno i brzo obrazovanje primordija, odnosno karpofora. Kako bi se na površini obrazovale karpofore, micelij šampinjona je potrebno još oko sedam dana da u potpunosti proraste pokrivku. Karpofore se nakon toga obrazuju u talasima svake dve nedelje. Šampinjoni se u toku proizvodnje beru 4 – 6 puta (Maksimović, 1995).

U poslednje vreme se zbog nakupljanja štetočina i inokuluma prouzrokovaca bolesti ciklus gajenja skraćuje i završava nakon treće ili čak druge berbe. Vreme između berbi (talasa) je obično oko nedelju dana, a celokupna berba traje oko 40 dana. Nakon berbe se vrši sortiranje i čuvanje šampinjona prema potrebama tržišta.

Na uspešnu proizvodnju i razvoj šampinjona utiču mnogobrojni faktori. Optimalna temperatura za rast šampinjona u fazi razvoja micelije je od 22 do 25°C, a u fazi plodonošenja od 14 do 20°C. Za intenzivnu proizvodnju šampinjona je neophodno obezbediti povišenu vlažnost supstrata (68-72%), pokrivke (60-65%) i vazduha u gajilištu (85-95%) (Maksimović, 1995).

Bukovača [*Pleurotus ostreatus* (Jasq.) P. Kummer]. Bukovača pripada carstvu Fungi, razdelu Basidiomycota, klasi Agaricomycetes, podklasi Agaricomycetidae, redu Agaricales, familiji Pleurotaceae i rodu *Pleurotus* (Mycobankdatabase, 2022). U ishrani se mogu koristiti različite vrste roda *Pleurotus*: *Pleurotus eryngii* (DC.) Quel., *Pleurotus pulmonarius* O. Hilber and O.K. Mill., *Pleurotus djamor* (Ruph. ex. Fr.) Boedjin, *Pleurotus sajor-caju* (FR.) Singer, *Pleurotus cystidiosus* O.K. Mill., *Pleurotus citrinopieatus* Singer, *Pleurotus cornucopia* (Paulet) Rolland i *P. osteratus* (Martinez et al., 2005; Knop et al., 2015; Zhang et al., 2016; Balletini et al., 2016). Bogate su proteinima, vlaknima, vitaminima (B1, B2, B12, C, folatima) i mineralima (Ca, K, Md, Na, P, Cu, Fe, Mn i drugim) (Mattila et al., 2001; Caglarirmak, 2007). Proizvode mnogo važnih biomolekula (lektin, enzime, organske kiseline, polisaharide i glikoproteine) koji učestvuju u raznim biološkim procesima. Pojedine vrste roda, uz pomoć degradirajućih enzima, mogu značajno smanjiti neke zagađivače sredine (Vyas and Molitoris, 1995; Novotny et al., 1999, 2001).

Karpofore, kao i micelija raznih vrsta bukovače luče supstance koje mogu imati antiinflamatornu, imunostimulatornu, imunodemulatornu, ribonukleaznu i antitumornu aktivnost (Patel et al., 2012). Predstavljaju izvor enzima i metabolita koji se široko koriste u industriji i medicini. Nanba (1993) je krajem devedesetih godina prošlog veka pokazao njihovu antitumornu aktivnost. Antitumorno dejstvo ima sastojak pleuron (polisaharid beta-1,3/1,6–glukan), dok lovastatin (mevinolin) snižava nivo holesterola u krvi. Bukovača je izuzetno lekovita i kao takva se koristi za ublažavanje i rešavanje brojnih zdravstvenih problema ljudi (Bugarski i sar., 1995; Quimio, 2004).

Šešir bukovače je asimetričan, pljosnat i lepezastog oblika. Oblik dosta podseća na izgled školjke, po čemu je i dobila latinski naziv *ostreatus* i engleski *oyster*. Drška je kratka, široka i ekscentrično postavljena u odnosu na šešir. Boja je promenljiva i može biti tamnosiva, svetlosiva, tamnoplava ili krem i vremenom postaje sve bleđa. Lamelle su bele boje i postavljene sa donje strane šešira. Spore su bele ili sivo-ljubičaste, cilindrične, uglavnom se stvaraju u velikim količinama, što može dovesti do alergijskih reakcija kod uzgajivača (Eger, 1978). Životni ciklus se sastoji od vegetativne i reproduktivne faze (Cho, 2004; Tisdale, 2004).

Zabeleženo je da su prvi put u Evropi uzgajane u Nemačkoj tokom Prvog svetskog rata, dok se danas uzgajaju širom sveta (Dinesh et al., 2013). Mogu se gajiti na širokom spektru biljnih poljoprivrednih ostataka i celuloznog industrijskog otpada (Pani, 1997).

Gajenje bukovače je, za razliku od drugih jestivih gljiva, jednostavniji i jeftiniji proces. Supstrat koji se koristi za gajenje bukovače sastoji se samo od biljnog materijala, jer bukovača luči lignocelulozne enzime koje šampinjon ne stvara. Biljni materijal podleže samo pasterizaciji i za njen razvoj je potrebno manje vremena nego za razvoj šampinjona. Supstrat se priprema od iseckane slame (sa eventualnim dodatkom drugih celuloznih suplemenata) i pasterizuje 1 – 2 h pri temperaturi od 60°C (Royse, 2007).

Nakon pasterizacije i hlađenja supstrata, zasejava (inokulacija) se micelijom bukovače i smešta u plastične vreće. Priprema “semenskog materijala” bukovače odvija se po istom principu kao priprema “semenskog materijala” šampinjona, razvitkom čiste kulture bukovače na sterilnom zrnju žitarica. Period inkubacije micelije u supstratu traje 12 - 14 dana pri 25°C, a karpofore se formiraju na ivicama perforacija plastičnih vreća (Royse, 2007). Uz održavanje optimalne temperature i vlažnosti, berba se može odvijati 3 – 4 nedelje (Sanchez, 2010).

Na uspešan razvoj bukovače utiču mnogobrojni faktori. Vlažnost vazduha se reguliše u zavisnosti od faze razvoja gljive i kreće se između 80 i 95% (Koso, 1991), dok je preporučena temperatura između 10 i 21°C (Stamets, 1993).

Šiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. Jedna od tri najviše gajene jestive gljive na svetu, uz šampinjon i bukovaču, je i šiitake. Naziv vrste je japanskog porekla i sastoji se od reči “šii”, koja označava vrstu drveta (*Castanopsis cuspidata* Schottky) na kojoj se gljiva uspešno razvija i reči “take”, koja znači gljiva (Wasser, 2005). Imajući u vidu da je Japan najveći proizvođač šiitake u svetu, ovaj naziv je postao opšteprihvaćen. Šiitake pripada carstvu Fungi, razdelu Basidiomycota, klasi Agaricomycetes, podklasi Agaricomycetidae, redu Agaricales, familiji Omphalotaceae i rodu *Lentinula* (Mycobankdatabase, 2022). Razvija se na mrtvom drvetu.

Karpofore sadrže oko 90% vode i bogate su ugljenim hidratima (58-60% suve težine), proteinima (20-23% suve težine) i vlaknima (9-10% suve težine). Takođe su izvor vitamina (kompleks vitamina B (B1, B2, B3, B5, B6, B11 i B12), C, D, folata) i minerala (Ca, K, Mg, P, Na, Cu, Fe, Mn i drugih) (Chang and Miles, 1984; Mattila et al., 2001; Caglarirmak, 2007).

Osim u ishrani, šiitake imaju veliku primenu i u medicini. Iz karpofora šiitake izolovana su brojna jedinjenja koja imaju lekovita svojstva. Najznačajniji su polisaharidi lentinan i protein lentin, koji ispoljavaju antitumorni, antibakterijski, antiviralni, antifungalni, imunomodulatorni, imunostimulatorni i mnoge druge efekte (Wasser, 2005). Treba napomenuti da se na bazi lentinana sintetišu pojedini lekovi koji se koriste u lečenju pacijenata obolelih od kancera.

Šešir šiitake je poluloptastog oblika, koji ponekad može biti i ravniji. Šešir je smeđe do crne boje, a kasnije boja posvetljuje. Ivice šešira su blago zavrtnute i sa starenjem se okreću na gore. Karpofore su karakterističnog mirisa i ukusa, što najviše zavisi od podloge na kojoj se gaje. Najprijetnije su na supstratu od mešavine piljevina. Lamelle su sa donje strane, zrakasto raspoređene oko centra drške. Na njima nastaju bele do bledosmeđe spore. Drška je sagrađena od mnoštva čvrsto spletenih i isprepletenih hifa. Može biti bele, svetlosive ili smeđe boje (Maksimović, 2002).

Šiitake se tradicionalno uzgajala na drvenim trupcima (Chang and Miles, 1989; Stamets, 1993), dok je danas takav pristup zamenjen bržim i jednostavnijim načinom kultivacije u plastičnim vrećama napunjenim piljevinom (Sanchez, 2010). Glavne prednosti gajenja u plastičnim vrećama su kraće vreme proizvodnog ciklusa i veći prinosi (Sanchez, 2004, 2010).

Kao hranljiva podloga koriste se usitnjeni ostaci drveta tzv. piljevina, dok se za pripremanje supstrata mogu koristiti različiti recepti. Najzastupljenija kombinacija je piljevina hrasta i topole sa dodatkom slame i drugih dodataka. Dobro izmešani sastojci supstrata se pasterizuju na 60 - 70°C u trajanju od 1 – 2 h, a zatim se hlade. Nakon hlađenja sledi zasejavanje supstrata već pripremljenom micelijom šitake i punjenje plastičnih vreća. Supstrat se inkubira u trajanju oko tri nedelje, pri optimalnoj temperaturi od 23 – 25°C i vlažnosti vazduha 60 – 70%. U periodu plodonošenja potrebna je niža temperatura (oko 18°C) i povišena vlažnost vazduha (do 95%). Berba se obavlja u talasima, kojih u proizvodnom ciklusu može biti pet do šest (Maksimović, 2002).

2.2. Prouzrokovaci mikoza jestivih gljiva

U proizvodnji jestivih gljiva zebeležen je razvoj različitih prouzrokovaca bolesti (gljiva, bakterija i virusa) i štetočina, koji su u gajilištima sa umerenom temperaturom, visokom vlagom i pristupačnim hranljivim materijama u kompostu, pronašli idealne uslove za svoj opstanak (Staunton et al., 1999; Potočnik et al., 2015). Patogene gljive kao što su: *Mycogone pernicioso* (Magnus) Delacroix, *Lecanicillium (Verticillium) fungicola* (Preuss) Hassebrauk, i vrste rodova *Cladobotryum* i *Trichoderma*, izazivaju najznačajnije mikoze jestivih pečuraka: mokru i suhu trulež, paučinastu i zelenu plesan (Potočnik et al., 2015).

Prouzrokovac mokre truleži šampinjona je *Mycogone pernicioso* (Magnus) Delacroix. Patogen obrazuje dve vrste konidija: uzane, elipsaste, glatkih ćelijskih zidova fjalospore (na dugačkim hifama) i dvoćelijske, krupne, ornamentisane, sa specijalnim konidiogenim ćelijama aleuriospore (na bočnim hifama) (Umar and Van Griensven, 1999; Sharma and Kumar, 2000). Simptomi koji su karakteristični za ovu bolest su deformisane, tumorozne karpofore (uvećane, zadebljale i kvrgave) sa tamnosmeđim kapljicama ekstracelularne tečnosti na površini. Ova tečnost je bogata aleuriosporama koje privlače šampinjonske muve, prenosiocice infekcije (Umar et al., 2000). Pored šampinjona još su dve vrste bukovače *Pleurotus nebrodensis* (Inzenga) Quel. i *P. eryngii* osetljive na ovog patogena. Na njima se mogu uočiti deformacije karpofora, za koje se ranije smatralo da su viroze (Sisto et al., 1997).

Prouzrokovac suve truleži šampinjona i bukovače je *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Hassebrauk (stari naziv *Verticillium fungicola*). U okviru vrste izdvojena su dva varijeteta: *L. fungicola* var. *fungicola* i *L. fungicola* var. *aleophilum* (Gams and Van Zaayen, 1982). Simptomi bolesti su različiti i zavise od stepena razvoja karpofora jestive gljive u toku infekcije i od količine spora u inicijalnom inokulumu. Najupečatljiviji simptom suve truleži je pojava bezoblične mase umesto pravilno diferenciranih karpofora. Pojavljuje se usled rane i jake infekcije u fazi začetka primordija. Infekcije u kasnijoj fazi razvoja daju različite promene poput uzdužnog cepanja drške i smeđih pega na karpoforama. Može se desiti da se pre berbe simptomi ne uoče, već da se pojave u vidu pega nakon branja. Takve karpofore predstavljaju dodatni izvor infekcije u gajilištima (North and Wuest, 1993). Nedavno je potvrđeno da se *L. fungicola* kao prouzrokovac suve truleži može javiti i na šitakama (Sharma et al., 2016).

Paučinastu plesan šampinjona mogu izazvati tri vrste roda *Cladobotryum*: *C. dendroides* (Bulliard: Fries) W. Gams and Hoozemans, *C. mycophilum* (Oudemans) W. Gams and Hoozemans i *C. variatum* Nees: Fries (Eicker and Van Greuning, 1991). Sve tri vrste izazivaju pojavu sivo-belih kolonija nalik paučini na površini pokrivke. Masa konidija stvorena na tim kolonijama, pri dodiru sa površinom karpofora šampinjona, izaziva pojavu smeđih pega, čime smanjuju kvalitet i vrednost proizvoda (Adie et al., 2006). Vrste roda *Cladobotryum* su najpoznatije po parazitiranju šampinjona, ali se mogu javiti i na mnogim drugim gajenim i divljim pečurkama. Utvrđeno je da vrsta *C. mycophilum* može jednako izazvati paučinastu plesan na šampinjonima, vrstama bukovače *P. ostreatus*, *P. eryngii* i šitakama (Back et al., 2012; Gea et al., 2011, 2012, 2019a). Nedavno je utvrđeno da je i vrsta *C. dendroides* prouzrokovac paučinaste plesni na šitakama (Sharma et al., 2016; Gea et al., 2018).

Vrste roda *Trichoderma* izazivaju bolest zelene plesni jestivih gljiva, koja nanosi ogromne gubitke u prinosu širom sveta. U kompostu i na pokrivci se razvija tamnozeleno kolonija patogena,

čije spore kasnije izazvaju pojavu smeđih pega i lezija na karpoforama (**Muthumeenakshi et al.**, 1998). Kolonije neretko prekrivaju karpofore šampinjona izazivajući njihovo truljenje (**Seaby**, 1996). U gajilištima šampinjona najštetnije vrste su: *Trichoderma atroviride* P. Karst, *T. aggressivum* f. *europaeum* Samuels and W. Gams, *T. aggressivum* f. *aggressivum* Samuels and W. Gams i vrste iz *T. harzianum* kompleksa, dok su u gajilištima bukovače dominantne: *T. pleuroti* S.H. Yu and M.S. Park i *T. pleurotica* S.H. Yu and M.S. Park, kao i vrste iz *T. harzianum* kompleksa (**Hatvani et al.**, 2007; **Komon-Zelazowska et al.**, 2007; **Kosanović et al.**, 2013; **Innocenti et al.**, 2019). Vrste iz *T. harzianum* kompleksa dominiraju i u gajilištima šitake (**Wang et al.**, 2016). Pored ovih vrsta u gajilištima jestivih gljiva često se sreću i mnoge druge manje značajne vrste roda *Trichoderma*, koje izazivaju manje ekonomske štete.

2.3. Rod *Trichoderma*

Identifikacija i klasifikacija. Rod *Trichoderma* je prvi put spomenut davne 1794. godine (**Persoon**, 1794). Obuhvata većinom saprotrofne vrste koje uglavnom žive u zemljištu. Teleomorfni stadijum ovog roda pripada razdelu Ascomycota, klasi Pyrenomycetes, redu Hypocreales, familiji Hypocreaceae i rodu *Hypocrea*. Zbog morfološke sličnosti, do 1969. godine se smatralo da postoji samo jedna vrsta u okviru ovog roda – *Trichoderma viride* Pers., dok je danas uz pomoć molekularnih analiza identifikovano preko 400 vrsta (**Index Fungorum**, 2023).

Sredinom 20. veka, **Rifai** (1969) je opisao devet “zbirnih” vrsta roda *Trichoderma*: *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain, *T. harzianum*, *T. koningii* Oudem, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai i *T. viride*, čija je podela bila zasnovana prema morfološkim karakteristikama, odnosno prema načinu grananja konidiofora, karakteristikama i rasporedu fjalospora i morfologiji konidija. Svaka “zbirna” vrsta obuhvatala je dve ili više do kraja nerazjašnjenih vrsta. Dvadesetak godina kasnije predložena je nova klasifikacija, zasnovana na morfološkim karakteristikama takođe, gde je rod podeljen u pet sekcija: *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* i *Hypocreanum* (**Bisset**, 1984, 1991a, b, c, 1992; **Gams and Bissett**, 1998).

Otežana morfološka identifikacija vrsta roda *Trichoderma* je usloвила razvoj metoda za brzu i specifičnu detekciju i identifikaciju izolata (**Kubicek et al.**, 2003), pa je poslednjih godina molekularna identifikacija postala standard u klasifikaciji roda. Prve tehnike u istraživanjima su bile RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) i RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), a kasnije i analiza genskih sekvenci (**Lieckfeldt et al.**, 1998). Razvojem molekularnih metoda baziranih na sekvenciranju i filogenetskim istraživanjima (**Kindermann et al.**, 1998; **Kullnig-Gradinger et al.**, 2002) došlo se do novih saznanja u identifikaciji vrsta roda *Trichoderma*. Početkom dvehiljaditih godina identifikovano je prvih 100 vrsta (**Druzhinina et al.**, 2006), a samo nekoliko godina nakon toga se broj povećao na 300 (**Druzhinina et al.**, 2011).

Prva istraživanja vezana za molekularnu identifikaciju vrsta roda *Trichoderma* bila su zasnovana na analizama sekvenci internalnog transkripcionog spejsera (ITS). Prajeri za amplifikaciju ITS regiona pronađeni su još devedesetih godina prošlog veka (**White et al.**, 1990). Za identifikaciju i karakterizaciju vrsta roda *Trichoderma* molekularnim i filogenetskim analizama, kao najvažnije navode se sekvence ITS1 i ITS2 regiona, kao i *tef-1α* i *rpb2* genskih regiona (**Jaklitsch**, 2006, 2011; **Błaszczuk et al.**, 2013). U cilju poboljšanja razvrstavanja unutar roda i zbog toga što ITS1/ITS2 regioni omogućuju slabije filogenetsko razdvajanje, pored ova dva regiona koriste se i regioni koji kodiraju *tef-1α* gen, *rpb2* gen, endohitinaze, aktin i kalmodulin (**Druzhinina et al.**, 2010; **Chaverri et al.**, 2015). Prema istraživanjima, introni u *tef-1α* genu obezbeđuju najbolje filogenetsko razdvajanje unutar roda (**Jaklitsch**, 2006, 2011), pa je njihova upotreba pri identifikaciji veoma srodnih vrsta roda *Trichoderma* od velikog značaja. Najpouzdanija identifikacija vrsta dobija se analizom kombinovanih molekularnih markera (**Druzhinina et al.**, 2010; **Chaverri et al.**, 2015; **Allaga et al.**, 2021).

Za brzu identifikaciju vrsta konstruisana su dva jednostavna bioinformatička algoritma: *TrichOKey* (analiza na osnovu ITS1/ITS2 sekvenci) i *TrichoBLAST* (analiza na osnovu ITS1/ITS2,

tef-1α i *rpb2* sekvenci) (**Druzhinina et al.**, 2005; **Kopchinskiy et al.**, 2005), a upotrebom BLAST programa moguće je determinisati sve poznate vrste roda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Danas se sve poznate vrste roda *Trichoderma* mogu identifikovati PCR tehnikom, DNA sekvenciranjem i primenom bioinformatičkih algoritama. Zahvaljujući pomenutim molekularnim metodama, broj vrsta ovog roda je u stalnom porastu i danas obuhvata preko 400 vrsta (**Index Fungorum**, 2023). Genske sekvence svih vrsta nalaze se deponovane u banci gena GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Opšte odlike vrsta roda *Trichoderma*. Vrste roda *Trichoderma* su većinom saprotrofne gljive, koje naseljavaju različite ekosisteme u različitim klimatskim zonama (**Kredics et al.**, 2014). Mogu se naći na drvetu i kori drvenastih biljaka u većini slučajeva (83%), zatim na supstratu i karpoforama pečuraka (13%), na zeljastim biljkama (2%) i u zemljištu (2%) (**Atanasova et al.**, 2013). Jedna od najbitnijih karakteristika po kojoj se ističu je sinteza sekundarnih metabolita, koji se masovno proizvode i primenjuju u različitim biotehnološkim procesima. Uloga sekundarnih metabolita, pre svega, ima veliki značaj u interakciji sa različitim organizmima (**Sivasithamparam and Ghisalbert**, 1998). Do danas je opisano preko 180 sekundarnih metabolita koje stvaraju vrste roda *Trichoderma* (**Sood et al.**, 2020). Takođe, produkuju i veliki broj enzima (hitinaze, proteaze, β -1,3-glukanaze), koji razlažu ćelijski zid micelije drugih organizama. Zahvaljujući antagonističkim svojstvima, pojedine vrste se mogu primenjivati u biološkoj zaštiti bilja od različitih fitopatogenih organizama, gde mogu biti direktni inhibitori njihovog rasta (hiperparazitizam, antibioza i kompeticija) ili indirektni (podstičući rast i razvoj biljaka na razne načine) (**Sood et al.**, 2020).

Brojna antifungalna jedinjenja su izolovana iz različitih vrsta roda *Trichoderma*: alameticin, viridin, gliovirin, gliotoksin, ergosterol, peptavirin, koninginin, stigmasterol, trihodermin, trihokonin, harzianolid, harzianopiridon, 6-fenil-piron (6-PP) i mnoga druga (**Reino et al.**, 2008; **Ali Khan et al.**, 2020). Jedna od prvih antifungalnih supstanci izolovana je iz vrste *T. viride* (6-pentil- α -piron, jedinjenje karakterističnog mirisa kokosa), koja je korišćena kao inhibitor porasta fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani* (**Dennis and Webster**, 1971; **Collins and Halim**, 1972). U zaštiti bilja komercijalno su dostupne sledeće vrste u sastavu biofungicida: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. koningii* i *T. virens*, koje se uspešno koriste u suzbijanju mnogobrojnih fitopatogenih vrsta različitih rodova (*Armillaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Monilinia*, *Phoma*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Venturia*, *Verticillium* i drugi) (**Lumbsden et al.**, 1993; **Monte**, 2001). Upotreba ovakvih preparata zasnovana je na tretiranju semena ili dodavanju ovih vrsta u zemljište gde se zajedno razvijaju sa korenom biljke, sintetišu sekundarne metabolite i parazitiraju druge patogene mikroorganizme (**Howell et al.**, 2000).

Sekundarni metaboliti pojedinih vrsta mogu se koristiti i u humanoj medicini. Primer je dermadin (izolovan iz *T. koningii* i *T. viride*), koji se koristi kao inhibitor rasta bakterija *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (**Tamura et al.**, 1975).

Kolonije koje obrazuju vrste roda *Trichoderma* su prvobitno vazdušaste, vunaste do paučinaste, beličaste do žućkaste boje, a nakon sporulacije postaju smaragdno do tamnozeleno. Uglavnom brzo rastu i ponekad mogu imati aromatičan miris koji podseća na kokos, zahvaljujući antifungalnoj supstanci 6-pentil- α -piron. Na čvrstoj hranljivoj podlozi se razvijaju u koncentričnim krugovima. Obrazuju uspravne, bezbojne i piramidalne konidiofore. Konidije su jednoćelijske, ovalne ili elipsoidne, lepljive, zelene boje i prosečnih dimenzija $3 - 5 \times 2 - 4 \mu\text{m}$. Micelija može obrazovati i jednoćelijske hlamidospore loptastog oblika (**Seaby**, 1996; **Kosanović et al.**, 2013).

Vrste roda *Trichoderma* mogu biti korisne kao agensi biološke zaštite, ali i štetne kao agresivni patogeni gajenih pečuraka. Poslednjih decenija je uočeno da brojne vrste roda *Trichoderma* izazivaju pojavu zelene plesni, bolesti jestivih pečuraka koje se u industrijskom obimu gaje u svetu, poput šampinjona, bukovače i šitake (**Hatvani et al.**, 2007). Zelena plesan jestivih gljiva se manifestuje pojavom simptoma pegavosti i truleži karpofora pečuraka i kolonizovanjem supstrata za njihov uzgoj. Micelija je u početku beličaste boje, a nakon sporulacije postaje tamnozeleno, po čemu je bolest i dobila ime (**Kosanović et al.**, 2013).

2.3.1. Vrste roda *Trichoderma* - patogeni šampinjona

Prve značajne epifitocijske pojave zelene plesni šampinjona uočene su devedesetih godina 20. veka u Evropi (Velika Britanija i Irska) (Seaby, 1987; Doyle, 1991), Americi i Kanadi (Rinker, 1993; Romaine et al., 1996), kada je pojava bolesti izazvala gubitke od 30 do 100% prinosa. Nakon toga, bolest se brzo proširila u druge zemlje (Geels, 1997; Hermosa et al., 1999; Mamoun et al., 2000). Iz svih zaraženih gajilišta izolovana je vrsta *T. harzianum*. Međutim, na osnovu morfologije, odgajivačkih karakteristika i patogenosti, utvrđeno je da su bolest izazvala tri biotipa poreklom iz Britanije (Th1, Th2 i Th3) i jedan poreklom iz Severne Amerike (Th4) (Seaby, 1987), koji su kasnije identifikovani kao nove vrste i forme. Biotip Th2 sa Britanskih ostrva identifikovan je kao *T. aggressivum* f. *europaeum* Samuels and W. Gams, a biotip Th4 iz Severne Amerike kao *T. aggressivum* f. *aggressivum* Samuels and W. Gams (Samuels et al., 2002). Tokom poslednje dekade, agresivna forma *T. aggressivum* f. *europaeum* se pojavila i u gajilištu Srbije (Kosanović et al., 2013). U gajilištima šampinjona se mogu naći i neke druge manje agresivne vrste roda *Trichoderma*: *T. longibrachiatum*, *T. ghanense*, *T. atroviride*, *T. koningii* i *T. virens* (Hatvani et al., 2007; Kosanović et al., 2013). U Srbiji je na šampinjonu potvrđeno prisustvo sledećih vrsta iz roda *Trichoderma*: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. koningii* i *T. virens* (Kosanović et al., 2013).

Simptomi koje izazivaju ove vrste se javljaju u vreme prorastanja micelije šampinjona kroz supstrat u vidu guste, u početku bele mase micelije koja nakon sporulacije postaje tamnozeleno do smaragdno, a zatim i u vidu pega i nekroza boje rđe na šesirima i drškama karpofora šampinjona, nakon dospevanja i klijanja spora na njima (Kredics et al., 2010; Kosanović et al., 2013). Povećano prisustvo grinja iz roda *Pygmephorus*, poznatih pod nazivom crveni pauk, mogu ukazivati na prisustvo bolesti zelene plesni u gajilištu šampinjona, jer se one hrane sporama roda *Trichoderma* (Samuels et al., 2002). Najznačajniji prouzrokovali zelene plesni u gajilištima šampinjona su vrste iz kompleksa *T. harzianum* i dve forme vrste *T. aggressivum* (*europaeum* i *aggressivum*) (Samuels et al., 2002; Hatvani et al., 2007; Kosanović et al., 2013).

***Trichoderma harzianum* (Rifai).** Vrsta *T. harzianum* obrazuje kolonije koje se brzo razvijaju i formiraju vazdušastu miceliju u početku svetlije žuto-zelene boje koja se za kratak period promeni nakon sporulacije u tamnozeleno boju. Konidiofore su uspravne, bezbojne i grade piramidalne strukture. Fijalide su postavljene pod uglom od 90 stepeni, dimenzija $3,5 - 7,5 \times 2,5 - 3,8 \mu\text{m}$ i do $10 \mu\text{m}$ duge. Konidije su jednočelijske, ovalne, elipsoidne, zelene i dimenzija $(2,5) - 3,5 \times (2,6) - 3 \mu\text{m}$. Optimalna temperatura za razvoj ove vrste je $25 - 30^\circ\text{C}$ (Kosanović, 2013). Isti temperaturni uslovi važe i za agresivne forme vrste *T. aggressivum*, za koje je poznato da su filogenetski veoma slične sa *T. harzianum* i smatra se da su nastale iz dva nezavisna izvora u Evropi i Severnoj Americi prilagođavajući se uslovima sredine u gajilištima šampinjona (Hermosa et al., 2000). Vrsta *T. harzianum* je široko rasprostranjena i najprisutniji prouzrokovalac zelene plesni u gajilištima jestivih gljiva. Često se sreće u gajilištima šampinjona i bukovače (Park et al., 2006; Hatvani et al., 2007; Kosanović et al., 2013), a posebno u gajilištima šitake (Lee et al., 2008; Kim et al., 2012; Wang et al., 2016), gde predstavlja najznačajnijeg prouzrokovalca zelene plesni. Takođe, *T. harzianum* se koristi kao baza komercijalno dostupnih biofungicida širom sveta i ima važnu ulogu u biološkom suzbijanju fitopatogenih gljiva (Troian et al., 2014).

Ova vrsta je definisana kao kompleks ("zbirna vrsta"), odnosno kao skup taksonomski veoma bliskih vrsta – "*T. harzianum* species complex" (THSC). Brojna filogenetska istraživanja usmerena su na identifikaciju vrsta u okviru ovog kompleksa (Chaverri et al., 2015; Oskeira et al., 2015; Allaga et al., 2021). U početku se smatralo da se u okviru ove vrste nalazi sedam podvrsta, ali je tokom 2015. godine urađena reidentifikacija po kojoj se u okviru *T. harzianum* kompleksa nalazi 14 vrsta: *T. harzianum*; *Trichoderma guizhouense* Q.R. Li, E.H.C McKenzie and Yong Wang; *Trichoderma inhamatum* Veerkamp and W. Gam; *Trichoderma lentiforme* (Rehm) P. Chaverri, Samuels and F.B. Rochae; *Trichoderma lixii* (Pat.) P. Chaverri, *Trichoderma afarasin* P. Chaverri and F.B. Rocha; *Trichoderma afroharzianum* P. Chaverri and F.B. Rocha; *Trichoderma*

atrobrunneum F.B. Rocha, P. Chaverri and W. Jaklitsch; *Trichoderma camerunense* P. Chaverri and Samuels; *Trichoderma endophyticum* F.B. Rocha, Samuels and P. Chaverri; *Trichoderma neotropicale* P. Chaverri and F.B. Rocha; *Trichoderma pyramidale* W. Jaklitsch and P. Chaverri; *Trichoderma rifaii* F.B. Rocha, P. Chaverri and Samuels i *Trichoderma simmonsii*. P. Chaverri, F.B. Rocha, Samuels, Degenkolb and W. Jaklitsch (**Chaverri et al.**, 2015).

Najčešće izolovane vrste iz *T. harzianum* kompleksa u gajilištima pečuraka, udružene sa *T. harzianum*, su *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense* i *T. simmonsii* (**Oskeira et al.**, 2015; **Innocenti et al.**, 2019; **Grujić et al.**, 2019). Konačan broj vrsta u okviru *T. harzianum* kompleksa nije utvrđen, pa su tako **Allaga et al.** (2021) iz gajilišta šitake u Mađarskoj izolovali vrstu *Trichoderma pollinicola* F. Liu and L. Cai. **Grujić et al.** (2019) su u Srbiji potvrdili prisustvo vrste *T. guizhouense*.

***Trichoderma aggressivum* (Samuels and W. Gams).** Dve agresivne forme nove vrste *T. aggressivum* su dominantne u gajilištima šampinjona Evrope - *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Samuels and W. Gams) i Severne Amerike - *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum* (Samuels and W. Gams). Filogenetski su dosta slične prethodno opisanoj *T. harzianum* vrsti. Vrsta *T. aggressivum* f. *aggressivum* obrazuje fikalide dimenzija (4,0-) 5,7 – 7,8 (-21) × (1,3-) 2,7 – 3,5 (-4,3) μm i hlamidospore prečnika 5,3 – 8,7 μm, dok *T. aggressivum* f. *europaeum* obrazuje fikalide dimenzija (4,0-) 4,3 – 5,9 (-6,1) × (2,3-) 2,9 – 3,7 (-5,0) μm i hlamidospore prečnika 7,7 – 11, 3 μm. Ove dve forme se morfološki međusobno mogu razlikovati jedino po tome što su statistički (interval poverenja 95%) fikalide *T. aggressivum* f. *aggressivum* (7,5 – 7,8 μm) duže od fikalida *T. aggressivum* f. *europaeum* (6,5 – 7, 0 μm) (**Samuels et al.**, 2002). Pored toga, **Seaby** (1996) je zabeležio razlike u morfologiji kolonija, a takođe su primećene i razlike u brzini porasta kolonije.

U Srbiji je potvrđeno prisustvo *T. aggressivum* f. *europaeum* (**Kosanović et al.**, 2013) i pretpostavlja se da je unešena kompostom uvezenim iz Mađarske. Prirodno stanište vrste *T. aggressivum* još uvek nije poznato, a u moguće prenosiocice se ubrajaju vozila za transport supstrata, osoblje u gajilištu, insekti, nematode i grinje (**Kredics et al.**, 2010). Smatra se da je širenje evropske forme ove vrste u Velikoj Britaniji započeto preko zajedničkih kupaca, prevoženjem komposta od jednog proizvođača do drugog, a pretpostavka je da je i u našu zemlju tako uneta.

Savoie et al. (2001) navode da je *T. aggressivum* agresivnija u odnosu na *T. harzianum* zahvaljujući boljoj adaptaciji i većoj toleranciji na druge mikroorganizme u kompostu, što joj omogućuje kolonizaciju veće površine komposta pre direktne interakcije sa *A. bisporus*.

2.3.2. Vrste roda *Trichoderma* - patogeni bukovače

Zelena plesan bukovače je prvobitno uočena u Severnoj Americi, koju je izazvala vrsta *T. viride* (**Sharma and Vijay**, 1996), ali su prvi značajni gubici zabeleženi u Severnoj Koreji (**Yu**, 2002), gde je većina izolata pripadala dvema kasnije identifikovanim novim vrstama: *Trichoderma pleuroti* S.H. Yu and M.S. Park i *Trichoderma pleuroticola* S.H. Yu and M.S. Park (**Park et al.**, 2006). Početkom 21. veka, značajni gubici kao posledica bolesti zelene plesni zabeleženi su i u gajilištima bukovače širom Evrope (**Kredics et al.**, 2006; **Hatvani et al.**, 2007, 2012; **Gea**, 2009; **Blaszczyk et al.**, 2013), gde je većina izolata pripadala prethodno navedenim novoidentifikovanim vrstama. Pored ove dve najdominantnije vrste, **Hatvani et al.** (2007) su iz supstrata šampinjona i bukovače izolovali i druge manje zastupljene vrste: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. ghanense*, *T. asperellum* i *T. atroviride*. U Srbiji je na bukovači potvrđeno prisustvo vrsta iz kompleksa *T. harzianum*: *T. afroharzianum*, *T. guizhouense* i *T. simmonsii* (**Allaga et al.**, 2021).

***Trichoderma pleuroti* (S.H. Yu and M.S. Park).** Vrsta *T. pleuroti* poseduje morfološke karakteristike tipične za rod *Gliocladium*. Na PDA podlozi nakon 72 h obrazuje kolonije poluprečnika 52 – 60 mm, sivkasto-zelene boje, koje vremenom postaju tamnije. Konidiofore su dimenzija 3 - 4 × 4 – 13 μm. Konidije su elipsoidnog oblika, bledozelene boje, glatkih zidova i dimenzija 3,6 × 2,1 μm, a pored njih može obrazovati i manji broj hlamidospora. Ova vrsta je izolovana samo iz gajilišta bukovače i do sada nije pronađena van njega. Zbog toga se pretpostavlja da ona može biti endofit biljaka koje se koriste za pripremu supstrata – pšenice, pirinča, pamuka (**Komon-Zelazowska et al.**,

2007). Nedavno je otkriveno jedinjenje tripleurin koje ova vrsta sintetise i koje je između ostalog odgovorno za inhibiciju rasta micelije bukovače (Marik et al., 2017).

***Trichoderma pleuroticola* (S.H. Yu and M.S. Park).** Vrsta *T. pleuroticola* poseduje morfološke karakteristike tipične za sekciju *Pachybasium*. Na PDA podlozi obrazuje kolonije poluprečnika 60 – 65 mm nakon 72 h, u početku zelenkasto-sive, a kasnije tamnozeleno boje. Konidiofore su dimenzija 3,0 – 4,2 × 4,2 – 9,5 µm i formiraju male pustule koje se spajaju u širokim koncentričnim zonama. Konidije su okruglaste do široko elipsoidne, svetlozelene boje i dimenzija 3,7 × 2,8 µm, a pored njih obrazuje i hlamidospore dimenzija 4 – 10 µm (Komon-Zelazowska et al., 2007). Za razliku od prethodne vrste koja je pronađena samo u gajilištu bukovače, ova vrsta se može naći i van gajilišta i izolovati iz zemljišta, biljnih ostataka, drveta u raspadanju ili divlje bukovače (Komon-Zelazowska et al., 2007; Hatvani et al., 2008; Kredics et al., 2009). Obe vrste su filogenetski dosta slične vrsti *T. aggressivum* (Park et al., 2006; Komon-Zelazowska et al., 2007). Mogu biti izolovane iz supstrata bukovače u toku inkubacije kada ne postoje vidljivi simptomi i u toku plodonošenja kada su jasno uočljive zelene kolonije na površini supstrata. Spore patogena lako se mogu prenositi unutar gajilišta, a pronađene su i u telima insekata iz familija Phoridae i Sciaridae (Innocenti and Montanari, 2014). Takođe, smatra se da se ove mikopatogene vrste održavaju i šire preko supstrata. U gajilištu se mogu naći obe vrste zajedno ili može dominirati samo jedna od njih, pa je na primer zabeleženo da je u Italiji dominantnija *T. pleuroticola*, a da se u Mađarskoj češće javlja *T. pleuroti* (Komon-Zelazowska et al., 2007).

2.3.3. Vrste roda *Trichoderma* - patogeni šiitake

Zelena plesan, izazvana različitim vrstama roda *Trichoderma*, može napasti i uništiti supstrat za rast micelije šiitake i tako smanjiti prinos i ove jestive gljive. Vrste koje su identifikovane u gajilištima šiitake su *Trichoderma polysporum* Rifai i *T. harzianum* (Komatsu, 1976; Tokimoto and Komatsu, 1979), zatim *Trichoderma oblongisporum* Bisset, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* i *T. pleuroticola* (Jiang et al., 1995; Wang et al., 2016). Iz zaraženog komposta šiitake u Kini, čak 68% izolata identifikovano je kao vrsta *T. harzianum*, što ukazuje da je ova vrsta najznačajniji prouzrokovatelj zelene plesni šiitake u odnosu na ostale izolovane vrste (Lee et al., 2008; Wang et al., 2016). Allaga et al. (2021) su identifikovali *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense*, *T. simmonsii* i *T. pollinicola* kao dominantne vrste u okviru *T. harzianum* kompleksa među izolatima iz gajilišta šiitake. U Srbiji je na šiitaki potvrđeno prisustvo vrsta iz kompleksa *T. harzianum*: *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense* i *T. simmonsii* (Allaga et al., 2021).

2.3.4. Interakcija vrsta roda *Trichoderma* i jestivih gljiva

Brojna istraživanja su sprovedena kako bi se utvrdilo na koji način vrste roda *Trichoderma* dospevaju do jestivih gljiva i kakav međusobni odnos uspostavljaju. Nije u potpunosti razjašnjeno na koje se sve načine prenose ovi mikopatogeni i kako se prvobitna interakcija odvija, ali dosadašnja istraživanja ukazuju da se uglavnom prenose zaraženim supstratom i da prisustvo micelije domaćina uslovljava njihov rast i razvoj (Romaine et al., 2005; Kredics et al., 2010).

Vrste roda *Trichoderma* su uglavnom kompetitori drugih mikroorganizama i micelije šampinjona sve do trenutka dok ne iskoriste sve raspoložive hranljive materije, kada započinju sa parazitiranjem i liziranjem hifa šampinjona (Savoie et al., 2001; Williams et al., 2003). Uspešnu kompetitivnost za prostor i hranljive materije ostvaruju sintetisanjem vanćelijskih enzima, toksičnih metabolita i isparljivih organskih jedinjenja. Zabeleženo je da *A. bisporus* inicira prorastanje komposta vrstama roda *Trichoderma* i da se one ne razvijaju ili se dosta slabije razvijaju ukoliko u kompostu nema micelije šampinjona (Romaine et al., 2005). Upravo se agresivnost vrste *T. aggressivum* u odnosu na *T. harzianum* pripisuje boljoj i većoj kolonizaciji supstrata pre direktne veze sa šampinjonom (Savoie et al., 2001).

Sintezom litičkih enzima, antifungalnih komponenti i sekundarnih metabolita prouzrokovajući zelene plesni uspešno degradiraju i ćelijske zidove micelije šitake (Wang et al., 2016).

Vrste *T. pleuroti* i *T. pleurotica* se razlikuju po morfološkim, ekološkim i metaboličkim karakteristikama, ali i u pogledu delovanja na bukovaču. Obe vrste inhibiraju razvoj bukovače i prouzrokuju velike štete u proizvodnji. Pojedini autori ukazuju da je domaćin osetljiviji prema *T. pleurotica* (Komon-Zelazowska et al., 2007; Sobieralski et al., 2012), navodeći da prilikom prodiranja u miceliju bukovače *T. pleuroti* izaziva odgovarajuću antagonističku reakciju, dok *T. pleurotica* ne izaziva nikakvu vidljivu reakciju domaćina. Međutim, *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima, Innocenti et al. (2019) su zabeležili veću agresivnost vrste *T. pleurotica*. Kljavost i rast spora prouzrokovaca zelene plesni je najbolja kada je temperatura supstrata povišena (oko 30°C). Kada se spore patogena nađu u blizini bukovače, adsorbuju se za ćelijski zid micelije domaćina, pri čemu se prepoznavanje vrši uz pomoć lektina. Nakon toga spore patogena klijaju i brzo se šire kroz supstrat domaćina (Qui et al., 2017).

2.4. Primena etarskih ulja u biološkoj zaštiti gajenih kultura od bolesti

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, može se reći da je potvrđena efikasnost različitih etarskih ulja u sprečavanju razvoja patogena u *in vitro* ispitivanjima. Najveći broj ispitivanja odnosi se na uskladišteno voće i povrće, gde je zabeleženo značajno smanjenje razvoja skladišnih patogena potapanjem, premazivanjem ili prskanjem plodova rastvorima etarskih ulja (Hadizadeh et al., 2009; Nabigol and Morshedi, 2011; Abdel-Kader, 2011). Pored toga, potencijalni oblici primene etarskih ulja u biološkoj zaštiti voća i povrća od patogena, zabeleženi su u procesu fumigacije voća (Liu et al., 2002), inkorporiranju u pakovanja sa modifikovanom atmosferom (Nakatsu et al., 2000), zatim u tretmanima zemljišta pre setve (Nguefack et al., 2008), prskanjem listova biljaka u polju (El-Mougy, 2009) i drugim. Kao fumiganti mogu se primenjivati u vidu granularnih formulacija ili u vidu spreja. U Izraelu su patentirane kapsule, koje omogućavaju postepeno oslobađanje etarskih ulja (Koul et al., 2008).

Komercijalna primena etarskih ulja zahteva odobren patent i obezbeđenu dovoljnu količinu standardizovanog etarskog ulja. Potrebno je obezbediti veće količine etarskog ulja vodeći računa o njegovoj postojanosti, koju je teže obezbediti imajući u vidu promenljivost sastava ulja kao posledicu različitih geoklimatskih i genetičkih faktora. Pri formulisanju je potrebno voditi računa da se dodavanjem različitih nosača ne umanjuje antimikrobni potencijal, a takođe je bitno odraditi i organoleptičke testove, jer tretmani ne smeju uticati na kvalitet tretiranih sirovina. U pojedinim zemljama su dostupni biopreparati na bazi etarskih ulja koji se koriste kao insekticidi, fungicidi ili herbicidi: SporanTM (EcoSMART Tehnologies, California, USA) na bazi etarskog ulja ruzmarina (fungicid), MartinTM (EcoSMART Tehnologies, California, USA) na bazi karanfilića i eugenola (herbicid i fungicid) (Koul et al., 2008); Timorex EC 66 i Timorex Gold (Stockton – Agrimor, Petach Tikva, Israel) na bazi ulja čajnog drveta (fungicid, baktericid i insekticid) (Carson et al., 2006; Reuveni et al., 2006; Kosanović et al., 2013; Mihajlović et al., 2013), Ozoneem Trishul (Biogenesis d.o.o., Bačka Topola, Srbija) i drugi preparati na bazi nim ulja i njegove aktivne komponente azadiraktina (insekticid i fungicid) (Campos et al., 2016) i mnogi drugi.

2.4.1. Dosadašnja istraživanja u zaštiti jestivih gljiva

Fungitoksično dejstvo preparata na bazi biljnih ekstrakata, etarskih ulja i njihovih komponenti nije jako, ali se mogu koristiti kao dopuna hemijskim sredstvima, smanjujući tako upotrebu klasičnih hemijskih preparata na što manju meru (Potočnik et al., 2015). Imajući u vidu mali broj dostupnih fungicida i razvoj rezistentnosti prema postojećim preparatima u gajilištima jestivih gljiva, poslednjih decenija sprovedena su brojna ispitivanja bazirana na proučavanju antifungalne aktivnosti etarskih ulja prema prouzrokovateljima bolesti jestivih gljiva. Toksičnost različitih etarskih ulja prema *L. fungicola*, *M. perniciosus* i vrstama roda *Cladobotryum* u *in vitro* uslovima zabeležena je u brojnim radovima (Glamočlija et al., 2006; Tanović et al., 2006, 2009; Soković and Van Griensven, 2006;

Soković et al., 2009; Luković et al., 2018). Najjače dejstvo prema ovim mikopatogenim gljivama ispoljila su ulja cimeta, karanfilića, timijana i čajnog drveta (Tanović et al., 2006; Luković et al., 2018). Etarska ulja origana, majčine dušice i nane ispoljila su jako dejstvo prema vrstama roda *Trichoderma*: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. harzianum*, *T. atroviride* i *T. viride* (Soković and Van Grienvan, 2006; Đurović-Peješev et al., 2014; Luković et al., 2020) u *in vitro* uslovima. Zadovoljavajuću efikasnost prema *T. harzianum* u gajilištu bukovače (Angelini et al., 2008) i u gajilištu šampinjona (Kosanović et al., 2013) ispoljilo je etarsko ulje čajnog drveta, dok je etarsko ulje majčine dušice ispoljilo zadovoljavajuću efikasnost u gajilištu šampinjona prema *C. mycophilum* (Gea et al., 2019b) i prema *M. perniciosus* (Regnier and Combrinck, 2010).

2.5. Etarska ulja lekovitog i aromatičnog bilja

Biljke su godinama služile kao izvor biološki aktivnih supstanci. Uzimajući u obzir da mogu proizvoditi na stotine metabolita, postoji veliko interesovanje za njihovo fitohemijsko ispitivanje (Rios and Recio, 2005). Specifični, najčešće tečni i mirisni produkti biljnog tkiva, nazivaju se etarska ulja, dok se biljke u kojima su glavni sastojci etarska ulja nazivaju aromatičnim biljkama. Aromatične biljke su dosta rasprostranjene u prirodi, a veliki broj njih se gaji radi proizvodnje sirovina (aromatičnih droga), začina i etarskih ulja. Ponekad je teško odrediti da li su biljke važnije kao lek, hrana, začim ili industrijska sirovina, a samim tim i preciznu definiciju lekovitog bilja (Kišgeci i sar., 2009). Količina ulja u lekovitim i aromatičnim biljkama varira u širim granicama i najčešće je u opsegu od 0,05 do 20%. Hemijski sastav etarskih ulja takođe varira i uglavnom su to složene smeše različitih monoterpena, seskviterpena i fenilpropanskih jedinjenja (Kovačević, 2004).

Sirovine i etarska ulja lekovitog i aromatičnog bilja upotrebljavaju se pre svega u hemijsko-farmaceutskoj industriji, zatim u proizvodnji kozmetičkih preparata i parfimerijskih proizvoda, u prehrambenoj industriji kao začini i aditivi poslastica i napitaka, u duvanskoj industriji itd. (Sarić, 1989; Kišgeci i sar., 2009). Od preko 250 000 cvetnica, samo je 6% ispitivano na potencijalnu biološku aktivnost, dok je 15% analizirano fitohemijski, što ukazuje da je ova oblast nedovoljno istražena i da joj treba posvetiti više pažnje (Heinrich et al., 2014).

2.5.1. Opšte karakteristike lekovitih i aromatičnih biljaka

Pitoma nana (*Mentha piperita* L.) pripada porodici Lamiaceae. Poznata je i pod drugim narodnim nazivima: crna nana, metvica, paprena nana, metva i drugim. To je višegodišnja zeljasta biljka, visine i do 80 cm sa razgranatim i poleglim ili uspravnim stablom, najčešće zelene do ljubičaste boje. Listovi su joj jajasto kopljasti, naizmenično postavljeni, nazubljeni, zelene do crvenkaste boje i jakog mirisa. Jak miris potiče od velike količine etarskog ulja. Cvetovi su grupisani na drškama, svetlo ljubičaste boje i dvopolni. Plod je orašica sa četiri semena, ali se biljka razmnožava pretežno vegetativnim putem. Uzgaja se u vrtovima, dok se divlja vrsta može naći uglavnom na vlažnim staništima. Biljka pitome nane se koristi kao lekovita i kao začinska biljka. Ima široku primenu u narodnoj medicini, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Bogata je gvožđem, selenom, cinkom, organskim kiselinama, karotinom, beatinom i etarskim uljem, koje je glavna aktivna materija (Gursky, 1999). Kao dominantne komponente etarskog ulja pitome nane navode se monoterpeni, dok ukupan broj komponenti varira od 26 (Soković et al., 2009) do 48 (Nikolić i sar., 2013). Nikolić i sar. (2013) navode da su mentol (35,57%) i menton (22,5%) najdominantnije komponente, dok Soković et al. (2009) beleže pored mentola (37,4%) i mentona (12,7%), značajno prisustvo i mentilacetata (17,4%). Pored mentola, mentona i mentilacetata, u dominantne komponente može se ubrojiti i mentofuran (Pino et al., 2002). Prisustvo etarskog ulja u zdravoj biljci pitome nane varira, najviše je zastupljeno u vršnim i mladim listovima, dok se najkvalitetnije ulje dobija u vreme cvetanja (Tucakov, 1990).

Divlja nana (*Mentha spicata* L.) pripada porodici Lamiaceae. Morfološki je dosta slična pitomoj vrsti. Uglavnom je prisutna kao samonikla biljka na vlažnijim staništima. Smatra se jako lekovitim i čest je sastojak raznih lekovitih čajeva i preparata. Prijatnog je mirisa i bogata etarskim

uljem (**Gursky**, 1999). Zbog lekovitih svojstava i sve veće potražnje u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji više nije samo samonikla biljka, već se komercijalno uzgaja širom sveta. **Soković et al.** (2009) beleže prisustvo ukupno 27 komponenti u sastavu etarskog ulja, od kojih su najdominantnije karvon (49,5%), menton (21,9%), limonen (5,8%) i 1,8-cineol (3%). Iako morfološki slična pitomoj nani, značajno se razlikuje od nje po hemijskom sastavu. Razlika je zasnovana na tome što se oksidacija monoterpena odvija na različitim mestima na *p*-mentan prstenu. Pitoma nana stvara isključivo monoterpenoide na C3 atomu (menton i mentol), dok divlja nana stvara proizvode isključivo na C6 atomu (karvon) (**Popović**, 2005). Zabeležena je i razlika u prinosu etarskih ulja ove dve vrste, i to u korist pitome nane (**Mahboubi**, 2021).

Majčina dušica (*Thymus serpyllum* L.) pripada familiji Lamiaceae. Poznata je i pod drugim narodnim imenima: timijan livadski, bakina dušica, divlji bosiljak, vrisak i drugim. Višegodišnja je zeljasta biljka sa jednogodišnjim stablom i drvenastim donjim delom (trajna biljka), slična je grmu poleglom po zemlji iz kog izrastaju oko 30 cm duga zelena stabla. Dok je biljka mlada, stabljike mogu biti i crvenkaste boje. Listovi su sitni, elipsasti, na vrhu blago zašiljeni, zeleno-sive boje i sa kratkim drškama. Cvetovi su ružičaste do lila boje, grupisani na vrhovima stabljika, jakog i prijatnog mirisa. Majčina dušica uglavnom raste na osunčanim livadama, brežuljcima i padinama, ali se može uzgajati i u vrtovima kao *Thymus vulgaris*. Može se koristiti kao začinska i lekovita biljka. Bogata je gvožđem, kalcijumom, taninima, flavonoidima, organskim kiselinama i etarskim uljem. Etarsko ulje je izrazito aromatično, žuto sa crvenkastom nijansom, ljutog ukusa i jakog mirisa (timol) (**Gursky**, 1999). Lekoviti sastojci se isključivo nalaze u listovima i cvetovima, pre svega etarsko ulje. Najzastupljenije komponente su fenoli (timol, karvakrol, borneol i drugi), koji su najodgovorniji za jako antifungalno dejstvo biljke. Smatra se da timol i karvakrol deluju na enzime ćelijskog zida i na taj način ispoljavaju inhibitorno antifungalno dejstvo (**Soković et al.**, 2009). Analizom etarskog ulja majčine dušice iz Srbije, identifikovano je ukupno 65 komponenti podeljenih u pet grupa. Izdvojeni su germakren-D (16%), trans-nerolidol (24,2%) i timol (7%) (**Petrović i sar.**, 2014).

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) pripada familiji Lamiaceae. Poznat je i pod narodnim nazivima: bosiosk, bosilje, mislođin, bazilika, masliđan i drugim. Jednogodišnja je zeljasta biljka, razgranatog stabla i visine oko 40 cm. Listovi su jajoliko kopljasti, zašiljeni na krajevima i postavljeni na dugim drškama. Cvetovi su sitni i beli, mogu biti crvenkasti ili žućkasti, grupisani u klasove na vrhovima stabljika. Biljka ima jak i prijatan miris. Uzgaja se u baštama i vrtovima na osunčanim i humusom bogatim zemljištima. Može se koristiti kao lekovita i začinska biljka. Bogata je taninima, glikozidima, saponinima, mineralnim materijama, šećerima, askorbinskom kiselinom i etarskim uljem (0,4-0,8%). Etarsko ulje sadrži eugenol, cineol, metil-kavikol (estragol), kamfor, timol i druge komponente, koje se mogu koristiti kao antimikrobna jedinjenja (**Gursky**, 1999). Najveći prinos ulja dobija se tokom i nakon cvetanja, dok je najmanji pre cvetanja biljke (**Toncer et al.**, 2017). Glavne komponente etarskog ulja iz Srbije su linalol (51,52-74,73%) i metil-kavikol (2,49-18,79%) (**Jelačić i sar.**, 2011), a pored njih mogu biti zastupljeni: 1,8-cineol, geraniol, eugenol, kamfor, kamfen, α -pinen i drugi (**Stanojević et al.**, 2017).

Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) pripada familiji Hyperaceae. Poznat je i pod narodnim nazivima: gospino zelje, gospin cvet, krvavac, bljuzgavac, ivanjčica i drugim. Višegodišnja je zeljasta biljka sa uspravnim i u gornjem delu razgranatim stablom, visine od 20 do 70 cm. Listovi su jajasti, naspramni, glatki i celi po obodu. Cvetovi su grupisani i smešteni na vrhovima stabala i grančica, zlatnožute boje. Biljka ima karakterističan miris i opor, gorak i aromatičan ukus. Raste na suvim brežuljcima, poljima i livadama, na ivicama šuma i kamenitim područjima. Bogat je gvožđem, taninima (9-11%), antocijanima, karotinom, holinom, vitaminom C, hiperacinom, etarskim uljem (0,1-0,2%). U tragovima su prisutni i alkaloidi. Uglavnom se koristi kao lekovita biljka (**Gursky**, 1999). Najdominantnije komponente su 2-metil oktan, α -pinen i β -kariofilen (**Pavlović et al.**, 2006; **Đorđević**, 2015). **Maggi et al.** (2010) beleže da su β -kariofilena i germakren D prisutni u sastavu sa preko 19%.

Hajdučka trava (*Achillea millefolium* L.) pripada familiji Asteraceae. Poznata je i pod narodnim nazivima: hajdučica, sporiš, obični stolisnik, ramonika, kostret, vražja kopriava, petrovska cveće i drugim. Višegodišnja je zeljasta biljka sa puzećim rizomom. Stabljika je uspravna i samo u

gornjem delu razgranata, visine od 20 do 80 cm, svetlozelene do crveno-smeđe boje. Listovi su perasto deljeni na veliki broj sićušnih i linearnih režnjeva, po čemu je biljka i dobila jedan od narodnih naziva - stolisnik, ali i latinski naziv – *millefolium*. Cvetovi su grupisani u glavičaste cvasti i postavljeni na vrhovima stabljika, žuto-bele boje ili žuto-ružičaste boje. Mlade biljke su prekrivene dlakama, koje kasnije skoro sve opadnu (Mišan i sar., 2013). Biljka raste na osunčanim obroncima i pašnjacima, a može se naći i po rubovima oranica. Sadrži dosta etarskog ulja, vitamine K i C, alakloide, flavonoide, masne kiseline, fosfate, kalijumove soli i sumpor (Gursky, 1999). Uglavnom se koristi kao lekovita biljka, ali se kao mlada može koristiti u ishrani, pre svega mladi listovi kao aromatičan dodatak jelima, sirevima i salatama. Etarsko ulje hajdučke trave bogato je kamforom (od 9,7 do 21%) (Rahimmaleka et al., 2009; Haziri et al., 2010; Alinezhad et al., 2011). Uz kamfor Haziri et al. (2010) navode 1,8-cineol (22%), Rahimmaleka et al. (2009) borneol (47,23%) i Alinezhad et al. (2011) kamazulen (48,9%) kao najdominantnije komponente.

Evropska ili obična jela (*Abies alba* Mill.) pripada familiji Pinaceae. To je zimzelena četinar, visine do 50 (60) m i sa prečnikom stabla od 1,5 (2) m. Stablo je uspravno i sive boje kore kod mlađih biljaka, dok je kod starijih kora smeđa i hrapavija. Lišće je igličasto i ravno, dužine 1,8 – 3 cm i širine oko 2 mm. Boja lišća je sjajno tamnozeleno sa gornje strane, dok sa donje strane ima dva beličasto-zelena pojasa stoma. Folijski pupoljci su jajasti, bez smole ili blago smolasti. Potpuno razvijeno seme se širi vetrom. Na posebno hladnim i vlažnim staništima, jela može živeti i do 600 godina (Pignatti, 1982; Ellenberg, 2009). Prirodno stanište jele su planine centralne i jugoistočne Evrope (od severnih Pirineja i Normandije, preko istočnih Alpa, Italije i Srbije do Karpata). Drvo jele spada u najtraženije i komercijalno najvažnije u centralnoj i jugoistočnoj Evropi (Bowes, 2010). Etarsko ulje jele se može koristiti u aromaterapiji, kozmetici i farmaciji. Posедуje blagotvorni uticaj na respiratorni sistem i umirujuće dejstvo na mišiće, a široku primenu ima i kao osveživač vazduha. Dominantne komponente ulja jele su uglavnom monoterpeni, kao što su β -pinen (32,8%), α -pinen (17,3%), kamfen (16,7%), bornil-acetat (9%) i limonen (6,1%) (Yang et al., 2009), zatim limonen (68,3%), kamfen (20,6%) i α -pinen (19%) (Duquesnoy et al., 2007).

Bor ili beli bor (*Pinus sylvestris* L.) pripada familiji Pinaceae. To je četinarsko zimzeleno drvo visoko do 40 m i prečnika stabla do 1,2 m. Oblik krošnje varira, od onih sa prizemnim granama do visokih kupastih krošnji (Pravdin, 1964). Kora mlade biljke je tanka i crveno-smeđe boje. Starenjem biljke kora postaje sivo-smeđa, ispucala i deblja, dok vršne grane zadržavaju crveno-smeđu boju. Igljice se nalaze u paru, spljoštene su i uvijene, duge 4 – 7 mm i široke 2 mm. Na stablu ostaju dve do tri godine. Beli bor cveta od aprila do juna obrazujući muške i ženske cvetove. Prirodno je široko rasprostranjen na većem delu Evrope i severne Azije. Može se uzgajati i kao ukrasna biljka. Igljice bora sakupljene u rano proleće su bogate vitaminom C, a mogu se koristiti i u medicini za lečenje respiratornog sistema (Grlić, 1990; Šilić, 1990). Etarsko ulje belog bora bogato je monoterpenima i kao najdominantnije komponente izdvajaju se α -pinen i β -pinen (Tognolini et al., 2006; Shpak et al., 2007). Pored α -pinena (19,44%) i β -pinena (17,27%), β -filandren može biti zastupljen u većem procentu (29,14%) (Koukos et al., 2001).

Rod *Juniperus* pripada familiji Cupressaceae. To je zimzeleno aromatično žbunje ili drveće rasprostranjeno uglavnom u hladnim i umerenim krajevima severne hemisfere. Od 75 vrsta ovog roda, vrsta *Juniperus communis* L. (obična kleka) je najpoznatija i sa najvećim opsegom rasprostranjenosti. Kleka je nisko četinarsko drvo ili žbun, koje zavisno od forme može dostići visinu do 10 m ili ostati nisko i rasti u širinu. Ima zelene listove nalik iglicama u čvorovima. Dvodoma je biljka sa muškim i ženskim šišarkama. Plodovi su bobičaste šišarke prečnika 4 – 12 mm i zelene boje na početku, dok kasnije postaju ljubičasto-crne sa plavim voskom oko sebe (Adams, 2004). Biljka je bogata aromatičnim uljima, katehinom, invertovanim šećerima, organskim kiselinama, alkaloidima, voskom i drugim jedinjenjima. Ima visok terapijski potencijal za lečenje ljudi i životinja, posebno bobice koje su najbogatije etarskim uljima (0,5% sveže ili 2,5% suve). Pored bobica, ulje može biti zastupljeno i u lišću i korenu biljke (Martin et al., 2006; Senegul et al., 2008). U etarskom ulju dominiraju monoterpeni. Kao najdominantnije komponente izdvajaju se α -pinen, mircen i sabinen (Milojević et al., 2010; Matović et al., 2011). Pored α -pinena (51,4%), mircena (8,3%), sabinena (5,8%), u dominantne se ubrajaju još i limonen (5,1%) i β -pinen (5,0%) (Hoferl et al., 2014).

Tuja (*Thuja orientalis* L.) je četinarski zimzelni žbun ili drvo iz porodice čempresa (Cupressaceae), visine 1,2 – 1,8 m i širine 0,9 – 1,5 m. U formi drveta može dosegnuti i do 12 m. Ima globularnu ili ovalnu krošnju sa granama usmerenim vertikalno i međusobno skoro paralelnim. Kora je delimično ispucala crveno-smeđe boje i ljušti se u uzdužnim trakama. Listovi su ljuspasti, dužine 7 – 8 mm na glavnim granama i 1 – 3 mm na bočnim granama. Lice i naličje lista su zelene boje i sa jakim mirisom smole pri trljanju. Ženski cvetovi su ovalni mesnati plavo-zeleni pri nastanku, dok kasnije postaju smeđi (Duke and Ayensu, 1985). Vrsta *T. orientalis* je poreklom iz Azije i u Evropu je unešena sredinom 18. veka, dok je vrsta *Thuja occidentalis* preneti iz Severne Amerike. Poznato je šest vrsta ovog roda. U našoj zemlji su dominantne dve: *T. orientalis* i *T. occidentalis*, i uglavnom se gaje kao ukrasne biljke. Može se koristiti i kao lekovita biljka, ali i protiv različitih štetočina: insekata, nematoda i puževa (Srivastava et al., 2012). Tuja je bogata karboksihidratima, alkaloidima, glikozidima, flavonoidima, saponinima i drugim jedinjenjima, dok su etarska ulja bogata tujonom, izotujonom, fenonom i kamforom (Dut Jasuja et al., 2015). Sastav ulja je varijabilan i pod uticajem geoklimatskih uslova. Najdominantnije komponente su α -pinen, β -3-karen, α -kedrol i α -tujon (Tsiri et al., 2009; Benelli et al., 2012).

Mirođija (*Anethum graveolens* L.) pripada familiji Apiaceae. To je jednogodišnja aromatična biljka sa uspravnim stablom visine 50 – 150 cm. Listovi su perasto deljeni i različitog oblika u zavisnosti od položaja na biljci. Prizemni listovi su krupniji i na drškama, dok su na vrhu sitniji i skoro sedeći. Cvetovi su žučkasti i sakupljeni u štitove (30 do 50 cvetića) na vrhu stabljike, plod je šizokarp (Warrier et al., 1994). Poznata je i pod drugim narodnim nazivima: kopar, kopra, dil, mirođija, anita i drugim. Biljka je poreklom sa Mediterana i Istočne Azije, a danas se gaji širom sveta. Koristi se pretežno kao začinska biljka, a pored toga i kao lekovita (Jianu et al., 2012; Chahal et al., 2017). Može se koristiti i kao insekticid (Babri et al., 2012). Biljka mirođije bogata je alkaloidima, karbohidratima, terpenoidima, flavonoidima, saponinima, taninima, steroidima, glukozidima i drugim jedinjenjima (Pathak et al., 2014). Etarsko ulje može biti ekstrahovano iz lista, cveta ili semena biljke. Listovi i seme biljke imaju potpuno različitu aromu zahvaljujući hemijskom sastavu etarskog ulja. U etarskom ulju listova dominiraju komponente poput α -felandrena (62,7%) i dil-etra (16,4%), dok su u ulju iz semena dominantni karvon (75,2%) i limonen (21,6%) (Radulescu et al., 2010). Said-Al-Ahl et al. (2015) navode da su α -felandren (46,33%), limonen (13,72%), β -felandren (11,01%) i p-cimen (17,88%) najdominantnije komponente vegetativnog dela mirođije, a da su karvon (62,48%), limonen (14,61%) i dil-apiol (19,21%) najdominantniji u ulju semena biljke. Sadržaj etarskog ulja mirođije iz Srbije kretao se od 3,32 do 3,66% u zavisnosti od lokaliteta. Utvrđeno je ukupno 15 komponenti u sastavu etarskog ulja, od kojih su se izdvojili karvon (51,7-54,5%) i limonen (40,6-43,1%) (Aćimović i sar., 2014). Razlika u prinosu etarskog ulja mirođije zimskog biljnog materijala (0,56%) i letnjeg biljnog materijala (0,65%) je mala (Vokk et al., 2011).

2.5.2. Opšte karakteristike, zastupljenost i lokalizacija etarskih ulja

Etarska ulja predstavljaju specifične, najčešće tečne i bistre, lako pokretljive i isparljive, bezbojne ili žučkaste proizvode biljnog tkiva. Ponekad se mogu naći u polučvrstom ili čvrstom agregatnom stanju, u zavisnosti od temperature. Hlađenjem neka ulja očvrstnu ili se iz njih izlučuju čvrsti sastojci, a nakon dugog stajanja se često usmole, zgusnu i potamne. Praktično su nerastvorljiva u vodi, ali se dobro rastvaraju u etanolu, masnim uljima i mnogim drugim organskim rastvaračima (hlороform, etar i drugi) (Kovačević, 2004). Predstavljaju smešu različitih jedinjenja: ugljovodonika, alkohola, ketona, aldehida, organskih kiselina, fenola i drugih (Simon, 1990). Najdominantnija jedinjenja su uglavnom terpeni (monoterpeni, diterpeni i seskviterpeni), kao i njihovi oksidovani produkti (Kovačević, 2004).

Etarska ulja su zastupljena u celom biljnom carstvu, ali treba istaći da su najzastupljenija u biljnim vrstama iz familija: Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rutaceae i Zingiberaceae. Produkcija etarskih ulja se odvija u svim biljnim delovima, pre svega u listovima i cvetovima biljaka, a mogu se naći i u korenu, rizomu, kori drveta, plodovima i semenima. Golosemenice ih sadrže u listovima i iglicama četine. Sinteza i sekrecija etarskih ulja u biljkama se

odvija u specijalizovanim strukturama (tzv. sekretornim žlezdama), koje mogu biti egzogene (žlezdane dlake i osmofore) i endogene (uljne ćelije, sekretorne šupljine, sekretorni kanali) (**Kostić i sar.**, 2012). Sekretorne žlezde su najzastupljenije kod biljaka iz familija Lamiaceae i Asteraceae, gde se ulje nagomilava ispod kutikule, dok su sekretorni kanali zastupljeniji kod biljaka iz familija Myrtaceae i Apiaceae (**Gorunović i Lukić**, 2001). Varijabilnost je prisutna u sastavu etarskog ulja u biljnom materijalu, kako u jednoj istoj biljci tako i u različitim primercima jedne vrste (**Kalembe and Kunicka**, 2003). Potvrđeno je da su komponente etarskog ulja promenljive čak i kod biljaka koje su rasle na istom području (na rastojanju od samo par metara i najverovatnije poreklom od istih roditelja) (**Dajić-Stevanović et al.**, 2009). Dnevna i sezonska variranja u prinosu i kvalitetu ulja su takođe eksperimentalno potvrđena (**Vokk et al.**, 2011). Na osnovu dosadašnjih ispitivanja, smatra se da je kvalitativni sastav etarskih ulja pod genetičkom kontrolom, dok su variranja u kvantitativnom sadržaju komponenti pod uticajem spoljašnjih faktora (**Valmaa et al.**, 2007; **Bakkali et al.**, 2008).

2.5.3. Metode dobijanja, čuvanje i hemijski sastav etarskih ulja

Za dobijanje, odnosno ekstrahovanje etarskog ulja iz biljnog materijala, mogu se koristiti različiti postupci: destilacija vodom, destilacija vodenom parom, kohabacija, ekstrakcija ugljovodoničnim rastvaračima, superkritična CO₂ ekstrakcija ili hladno ceđenje. Destilacijski postupci pomoću vode i vodene pare (hidrodestilacija) se najčešće koriste za industrijsko dobijanje etarskih ulja. Proces destilacije vodenom parom izvodi se tako što se biljni materijal odvoji na rešetku ne dolazeći tako u dodir sa vodom već samo sa vodenom parom. Vodena para nosi molekule etarskog ulja i prolazi kroz hladnu cev, prilikom čega dolazi do kondenzacije vode i etarskog ulja. Zbog nerastvorljivosti u vodi formiraju se dva sloja, gde je sloj ulja obično na površini, dok je ispod njega voda koja se naziva cvetna vodica ili hidrolat. Proces dobijanja etarskog ulja kuvanjem potopljenog materijala u vodi do ključanja je proces destilacije vodom. Ovaj proces je nešto duži od destilacije vodenom parom i pogodan je za ulja koja sadrže estre, jer ih na ovaj način razbija na odgovarajuće alkohole i karboksilnu kiselinu (**Snah and Seth**, 2010).

Pravilno čuvanje etarskog ulja je dosta značajno kako bi ulje zadržalo prvobitni sastav i ostalo nepromenjeno. Načine čuvanja propisuje Međunarodna organizacija za standardizaciju (**ISO, International Organization for Standardization**, 2014). Uzimajući u obzir da su etarska ulja isparljiva, potrebno je čuvati ih u hermetički zatvorenim, do vrha punim, tamnim i staklenim ili metalnim bočicama, kako bi što duže ostala nepromenjena. Na tamnim i hladnim mestima mogu ostati nepromenjena godinama, ali se ta dužina znatno skraćuje otvaranjem bočice, jer se svakim novim otvaranjem gubi deo isparljivih molekula. Ulja bogata estrima se vremenom mogu ukiseliti, dok su ulja sa većim procentom alkohola u sastavu hemijski najstabilnija jedinjenja i najdugotrajnija (**Marković**, 2011).

Etarska ulja predstavljaju složene mešavine sastavljene najčešće od 20 do 60 komponenti u različitom kvantitativnom odnosu. Često se u sastavu jednog ulja izdvoje dve do tri komponente kao glavne, zastupljene u većem procentu (od 20 do čak 95%) u odnosu na sve ostale komponente koje su prisutne u znatno manjim procentima. U glavne komponente etarskih ulja ubrajaju se terpeni/terpenoidi, aromatična i alifatična jedinjenja male molekulske mase. Terpeni predstavljaju derivate izoprena (2-metil-1,3-butadiena) i u zavisnosti od broja izoprenskih jedinica koje se kondenzuju podeljeni su na: hemiterpene (C₅), monoterpene (C₁₀), seskviterpene (C₁₅), diterpene (C₂₀), triterpene (C₃₀), tetraterpene (C₄₀) i politerpene. Monoterpeni, seskvitrpeni i diterpeni su najdominantniji u sastavima etarskih ulja. Svi terpeni se sintetišu prema biosintetskom izoprenskom pravilu preko mavalonskog puta (iz mavalonske kiseline) iz nekoliko prostih acikličnih jedinjenja (**Bakkali et al.**, 2008). Pored terpena/terpenoida, u sastave etarskih ulja ulaze i aciklična jedinjenja (alkoholi, aldehidi, ketoni) i aromatični derivati (aldehidi, fenoli i njihovi estri, kao i kumarini). Neki od najčešće zastupljenih terpena su: limonen, pinen, kamfen, kariofilen, kedren i drugi; najčešće zastupljeni estri su: geranil acetat, linalil acetat, eugenil acetat, bornil acetat, lavandulil acetat i drugi; najčešće zastupljeni aldehidi su: citral, citronealal, neral i drugi; ketoni: karvon, kamfor, jasmon,

fenhon, menton, tujon, pulegon i fenoli: timol, karvakrol, metil-eugenol, metil-kavikol, safrol i apiol (**Gorunović i Lukić**, 2001).

Odvajanje pojedinačnih sastojaka (komponenti), njihova identifikacija i karakterizacija upotrebom hemijskih metoda predstavlja analizu etarskih ulja. Analiza etarskih ulja se može izvesti primenom klasičnih hemijskih metoda (frakciona destilacija, derivatizacija i degradacione reakcije) ili primenom instrumentalnih metoda (hromatografija, spektrometrija i druge). Instrumentalne metode su danas u potpunosti zamenile klasične metode. Uz pomoć gasne hromatografije (GC) i masene spektrometrije (MS) se najpouzdanije može utvrditi hemijski sastav i kvalitet etarskog ulja. Kombinacija ove dve metode (GC-MS) je najbolji način za identifikaciju komponenti smeše (kvalitativnu analizu) i kvantitativnu analizu, ali se i pored toga preporučuje prefrakcionisanje ulja nekom od klasičnih metoda (npr. frakciona destilacija), kolonskom hromatografijom na niskim temperaturama ili samom hromatografijom (**Nikolin i Šober**, 2003).

2.5.4. Biološka aktivnost etarskih ulja

Upotreba etarskih ulja zasnovana je na njihovoj biološkoj aktivnosti. U prirodi je ta aktivnost povezana sa atraktantnim delovanjem na insekte, čime se obezbeđuje prenošenje polena i oprašivanje biljaka ili repelentno delovanje, čime se biljke mogu zaštititi od napada herbivornih insekata i životinja. Pored toga, pojedina ulja mogu sprečiti klijanje semena sopstvenih biljaka (obezbeđujući životni prostor svake individue) ili klijanje semena drugih biljaka. Gotovo sva ulja, sa većim ili manjim intezitetom, sprečavaju razvoj brojnih mikroorganizama i na taj način smanjuju širenje infekcije u biljkama u kojima one nastaju (**Kovačević**, 2004). Biološka aktivnost etarskih ulja se može povezati i sa delovanjem na zdravlje i razne druge potrebe čoveka. Lako isparljiva jedinjenja (monoterpeni) koriste se za relaksaciju primenom aromaterapija, a lekovite biljke se od davnina koriste u narodnoj medicini upravo zbog blagotvornog dejstva njihovih isparljivih komponenti (**Marin**, 2003). Dosadašnjim ispitivanjima je utvrđeno da etarska ulja poseduju antimikrobnu (**Kuete**, 2010), antiviralnu (**Dunkić et al.**, 2011), antioksidativnu (**Babili et al.**, 2011), insekticidnu (**Liu et al.**, 2013) i druge aktivnosti.

Antifungalna aktivnost. Sposobnost etarskih ulja da inhibiraju rast i razvoj bakterija i gljiva predstavlja antimikrobnu aktivnost. Delovanje može biti mikrobistatičko (inhibicija rasta) ili mikrobicidno (ubijanje mikroorganizama). Početak istraživanja antimikrobne aktivnosti bio je baziran na antibakterijskom potencijalu, dok su antifungalna istraživanja započeta nešto kasnije. Kada je u pitanju antifungalna aktivnost, poznato je da visoke koncentracije dovode do inhibicije rasta gljiva, a da niže koncentracije mogu čak i stimulisati njihov porast (**Soković**, 2001). Mnogobrojna istraživanja potvrđuju antifungalnu aktivnost etarskih ulja na gljive prouzrokovaoče bolesti biljaka i jestivih gljiva (**Tanović et al.**, 2006, 2009; **Soković and Van Griensven**, 2006; **Angelini et al.**, 2008; **Soković et al.**, 2009; **Soliman and Badea**, 2012; **Luković et al.**, 2018, 2019a, b, 2020), na vrste koje prouzrokuju kvarenje hrane (**Ben Hsouna et al.**, 2014) i na one koje prouzrokuju bolesti kod čoveka (**Pinto et al.**, 2013).

Mehanizam antifungalnog delovanja etarskih ulja je različit i zavisi od vrste ulja i primenjene koncentracije. Efikasnost nekog ulja i njegovih komponenti izražena kroz inhibiciju ciljanog mikroorganizma može zavisiti od toga da li su hidrofilni ili lipofilni, ali i od ćelijskih struktura samog mikroorganizma (**Kalemba and Kunicka**, 2003). Efekti ulja na mikroorganizam tj. gljivu se mogu pratiti na morfo-fiziološkom nivou ili na nivou ćelije. Morfološke promene su izostanak sporulacije, gubitak pigmenata, aberantne konidiofore, povećana ili smanjena brojnost konidija, povećano ili smanjeno grananje i veličina hifa, uglavnom nastale kao posledica promena u ćelijskom zidu (**Rasooli and Abyaneh**, 2004). Najbitniji mehanizmi delovanja etarskih ulja vezani su za nivo ćelije: poremećaj funkcije ćelijskih membrana (**Hammer et al.**, 2004), inhibicija stvaranja ćelijskog zida (**Yutani et al.**, 2011), disfunkcija mitohondrija (**Chen et al.**, 2013) i inhibicija protonskih pumpi (**Nazzaro et al.**, 2017). Najveći deo eksperimenata vezanih za određivanje antifungalne aktivnosti

etarskih ulja odrađen je u *in vitro* uslovima, primenom različitih metoda: difuzione, dilucione (makro i mikro) ili bioautografske metode (Soković, 2001).

Interakcija etarskih ulja i njihovih komponenti. Efikasno delovanje etarskih ulja je uglavnom posledica međusobnih interakcija njihovih pojedinačnih komponenti. Interakcija sekundarnih metabolita poput tanina, terpenoida, alkaloida i flavonoida mogu dovesti do sinergističkog, aditivnog, indiferentnog ili antagonističkog delovanja (Karatzas et al., 2001; Delaquais et al., 2002). Nosioци antimikrobne aktivnosti etarskih ulja u kojima dominiraju terpeniski alkoholi su uglavnom aldehidi i fenoli (npr. citril, eugenol, timol, karvakrol i drugi) (Bassole et al., 2010). Etarska ulja u kojima su dominantne komponente ketoni i estri poseduju značajno slabiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na ulja u kojima dominiraju terpeniski ugljovodonici (Da Barros et al., 2009). Kombinovanje etarskih ulja koja ispoljavaju sinergistički efekat mogu dovesti do smanjenja koncentracije kako bi se postigao željeni cilj, što u industriji hrane ima posebno veliki značaj (upotreba kao konzervanasa, čiji visok sadržaj nije poželjan). Smanjivanjem koncentracije ulja i pravljenjem različitih mešavina razblažuju se i smanjuju neke rizične i manje bitne komponente, dok se u prvi plan stavljaju one sa značajnim biološkim dejstvom (Pei et al., 2009). Povećana efikasnost etarskih ulja moguća je uz pomoć kombinovanja sa drugim hemijskim jedinjenjima (solima, kalijum sorbatom, natrijum benzoatom) ili blagim povećanjem temperature (Karatzas et al., 2000; El-Mougy et al., 2009), kao i u kombinaciji sa raznim mikroorganizmima antagonistima, poput bakterija, gljiva i kvasaca (Abdel-Kader et al., 2011; Stević, 2013).

2.6. Zaštita jestivih gljiva od prouzrokovala zelene plesni

Zaštita jestivih gljiva od prouzrokovala zelene plesni obuhvata niz preventivnih mera i primenu fungicida i biofungicida, ali uprkos tim merama malo je podataka o uspešnom suzbijanju prouzrokovala ove bolesti. Problem predstavlja ograničena primena fungicida, jer je prochloraz, fungicid iz grupe imidazola (DMI), jedini koji se zvanično preporučuje prema Protokolu EPPO organizacije (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) za upotrebu u zaštiti jestivih gljiva u Evropi. Nedavno je uveden i metrafenon iz grupe benzofenona za suzbijanje *Cladobotryum* spp. i *L. fungicola* (Carrasco et al., 2017; Anonymous, 2020) u nekoliko zemalja Evropske unije. Međutim, uvođenje novih fungicida u zaštitu jestivih gljiva od bolesti je veoma teško, jer agrohemijske kompanije retko ulažu sredstva u razvoj fungicida koji se primenjuju u malim usevima (Chrysai-Tokousbalides et al., 2007). Prochloraz je, osim u Evropi, jedini registrovani fungicid i u Aziji, Australiji i Africi, dok se u Americi mogu koristiti hlortalonil i tiabendazol (Potočnik et al., 2015; Anonymous, 2020). U gajilištima šampinjona u Srbiji korišćeni su fungicidi mankozeb, benomil, karbendazim, tiofanat-metil i prochloraz. Prema iskustvima uzgajivača i brojnim ispitivanjima svojevremeno su se pokazali efikasnim i pored toga što nisu registrovani za zaštitu pečuraka od bolesti u Srbiji (Potočnik, 2009). Većina ovih fungicida je povučena sa tržišta, pa se danas u prometu za zaštitu pečuraka u Srbiji jedino može naći metrafenon (registrovan u Srbiji za druge namene). Pored malog broja dostupnih fungicida, još veći problem predstavlja razvoj rezistentnosti koja je zabeležena prema njima (Grogan et al., 2000; Gea et al., 2005; Grogan, 2006). Zbog navedenih razloga i zaštite životne sredine i neciljnih organizama, pažnja se sve više usmerava ka pronalaženju alternativnih mera zaštite i primenu biofungicida. U biofungicide spadaju formulisani biljni ekstrakti i etarska ulja, mikroorganizmi sa kompetitivnim ili antagonističkim dejstvom na štetne organizme i izazivači otpornosti kod biljaka i gljiva. Komercijalno su dostupni preparati na bazi različitih *Bacillus* vrsta koje izazivaju značajnu inhibiciju porasta *T. aggressivum*, *T. harzianum* i *T. pleuroti* (Savoie et al., 2001; Nagy et al., 2012; Milijašević-Marčić et al., 2016; Potočnik et al., 2021) i preparati na bazi etarskog ulja čajnog drveta (Reuveni et al., 2006; Angelini et al., 2008; Kosanović et al., 2013).

Preventivne mere se mogu primenjivati pre početka gajenja, tokom gajenja i nakon završetka ciklusa gajenja, obuhvatajući niz postupaka kojima se održava striktna higijena u gajilištu i okolini.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu složenost zaštite jestivih gljiva od bolesti i nužnost pronalaženja bioracionalnih sredstava suzbijanja prouzrokovaca bolesti, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije trebalo bi da utvrde da li je primena ispitivanih antifungalnih jedinjenja biljnog porekla moguća i opravdana u suzbijanju vrsta roda *Trichoderma*, prouzrokovaca zelene plesni jestivih gljiva. U skladu sa navedenim, osnovne ciljeve ove disertacije predstavljaju:

- identifikacija i karakterizacija vrsta roda *Trichoderma*, prouzrokovaca zelene plesni bukovače u Srbiji i Severnoj Makedoniji i šiitake u Srbiji;
- dobijanje etarskih ulja procesom hidrodestilacije odabranog lekovitog i aromatičnog bilja poreklom iz Srbije i utvrđivanje njihovog hemijskog sastava;
- ispitivanje antifungalnog delovanja pojedinačnih etarskih ulja primenom različitih metoda (kontaktne i fumigantne; mikrodilucione i makrodilucione) u laboratorijskim uslovima (*in vitro*) prema vrstama roda *Trichoderma*, prouzrokovacima zelene plesni šampinjona, bukovače i šiitake, poreklom iz Srbije, Mađarske, Hrvatske i Severne Makedonije;
- ispitivanje antifungalnog delovanja odabranih kombinacija etarskih ulja u laboratorijskim uslovima (*in vitro*) prema vrstama roda *Trichoderma*, prouzrokovacima zelene plesni šampinjona, bukovače i šiitake;
- ispitivanje osetljivosti izolata vrsta roda *Trichoderma* prema fungicidima prohlorazu i metrafenonu u laboratorijskim uslovima (*in vitro*);
- određivanje selektivne toksičnosti fungicida i etarskog ulja mirođije za jestive gljive;
- ispitivanje efikasnosti odabranog etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi aktivne supstance azadiraktin, komponente etarskog ulja nim drveta, i fungicida prohloraza u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* u oglednom gajilištu šampinjona (*in vivo*);
- ispitivanje uticaja na prinos šampinjona odabranog etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi aktivne supstance azadiraktin, komponente etarskog ulja nim drveta, i fungicida prohloraza u oglednom gajilištu šampinjona (*in vivo*);
- ispitivanje prirode međusobnog dejstva (aditivno, sinergističko ili antagonističko) fungicida prohloraza i etarskog ulja mirođije i mogućnosti njihove zajedničke primene kako bi se razvila uspešnija i ekološki prihvatljivija strategija suzbijanja prouzrokovaca zelene plesni šampinjona (*T. aggressivum* f. *europaeum*).

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Poreklo izolata korišćenih u istraživanju

Izolati dobijeni u toku rada. Uzorci zaraženih karpofora šiitake prikupljeni su 2008. godine iz gajilišta u Srbiji (Ugrinovci) i supstrata zasejanog i proraslog micelijom bukovače 2018. godine u gajilištima u Srbiji (Kragujevac) i Severnoj Makedoniji (Kavadarci). Iz karpofora šiitake i supstrata zasejanog bukovačom na kojima je prisutan razvoj zelene plesni uzeti su fragmenti veličine 2 x 2 x 5 mm, dezinfikovani u 1% rastvoru natrijum-hipohlorita (NaOCl) u trajanju od 1 minuta i postavljeni na PDA podlogu (PDA – *Potato Dextrose Agar*: krompir – 200 g, dekstroza – 20 g, agar 17 g i destilovana voda – 1 l (Booth, 1971; Dhingra and Sinclair, 1995). Nakon sedam dana inkubacije razvijene kolonije gljiva su presejane u čistu kulturu. Čiste kulture su čuvane na 5°C u mikoteci Laboratorije za fitopatologiju u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun.

Ostali izolati korišćeni u istraživanju. U istraživanja su uključeni i izolati: šest izolata sa šampinjona iz gajilišta u Srbiji (tri izolata vrste *T. aggressivum* f. *europaeum* i tri izolata vrste *T. harzianum*) (Kosanović et al., 2013), iz kolekcije Laboratorije za fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun i po dva izolata vrsta *T. pleuroti* i *T. pleuroticola* sa bukovače iz Mađarske (Hatvani et al., 2007; Komoń-Zelazowska et al., 2007; Urbán, 2012) i Hrvatske (Hatvani et al., 2012), iz kolekcije Laboratorije za mikrobiologiju Fakulteta za nauku i informatiku Univerziteta u Segedinu, Mađarska.

4.2. Provera patogenosti izolata

Patogenost izolata dobijenih iz karpofora šiitake i supstrata zasejanog bukovačom je ispitana inokulacijom gornje strane šešira ubranih karpofora bukovače i šiitake suspenzijom spora izolata (po 20 µl koncentracije 10⁶ konidija/ml) po metodi **Bonnen and Hopkins** (1997). Suspenzija spora je dobijena ispiranjem konidija destilovanom vodom (10 ml) sa površine čiste kulture (inkubirane četiri dana na PDA pri temperaturi 20°C, u Petri kutiji Ø=90 mm) uz dodatak emulgatora Tween 20 (v/v 0,1%) (J.T. Baker[®], Mallincrodt Baker BV, Deventer, Holland). Suspenzija konidija je proceđena kroz dvostruki sloj gaze i njena koncentracija je određena hemocitometrom (Phase hemocytometer, Spencer, Bright-line[®], USA). Test je izveden u tri ponavljanja za svaki izolat. Negativna kontrola je inokulisana sterilnom vodom. Inokulisani i kontrolni šeširi karpofora bukovače i šiitake su inkubirani na vlažnom filter papiru u Petri kutijama (Ø=200 mm) pri sobnoj temperaturi (22 ± 2°C). Patogenost je ocenjivana nakon pet dana inkubacije praćenjem pojave simptoma. Izolati su smatrani patogenim ukoliko su izazvali vidljive simptome na mestu inokulacije karpofora. Iz simptomatičnih karpofora obavljena je reizolacija na PDA podlogu.

4.3. Molekularna identifikacija izolata

Za molekularnu identifikaciju odabrano je 12 izolata (devet izolata sa bukovače iz Severne Makedonije i Srbije i tri izolata sa šiitake iz Srbije). Izolati *T. harzianum* kompleksa (*T. harzianum* species complex, THSC) prethodno identifikovani na osnovu ITS regiona (Luković et al., 2021), kao i tri izolata iz kolekcije Instituta za pesticide identifikovanih kao *T. harzianum* (Kosanović et al., 2013), dalje su identifikovani i na osnovu *tef-1α* genskog regiona.

4.3.1. Ekstrakcija DNA

Za ekstrakciju DNA (*deoxyribonucleic acid* – dezoksiribonukleinska kiselina) korišćen je komercijalni kit *Dneasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvima proizvođača. Ukupne DNA ekstrahovane su iz micelije čistih kultura patogenih gljiva odgajenih tri dana na PDA

pri temperaturi od 25°C. Po 100 mg micelije svakog izolata je direktno prebacivano u mikrotube zapremine 1,5 ml, gde je nakon 30 min na -80°C sterilnim tučkovima vršena homogenizacija. U svaku tubicu dodato je po 400 µl AP1 pufera. Sadržaj tubice potom je kratko promešan na Vortex-u, a mešavina je inkubirana u termobloku na 65°C u trajanju od 10 min. Tokom inkubiranja na svakih 2 do 3 min tubice su protresane. Zatim je u svaku mikrotubu dodavano po 130 µl P3 pufera, nakon čega je sadržaj promešan na Vortex-u i inkubiran 5 min u zamrzivaču. Po završenom postupku, sadržaj je prebačen pipetom iz mikrotuba u *QIAshredder Mini Spin Column* koja se nalazi u kolektorskoj tubi i centrifugiran 2 min na 14000 rpm. Lizat koji je propušten kroz filter prebačen je u tubice zapremine 1,5 ml vodeći pri tome računa da se ne poremeti talog na dnu kolektorske tubice. U svaku tubicu dodato je po 900 µl pufera AW1 uz lagano mešanje pipetom. Prvi deo od 650 µl ove suspenzije prebačen je u *DNeasy Mini Spin* kolone sa filterom koje se nalaze u kolektorskoj tubi i centrifugiran 1 min na 8000 rpm. Tečna faza koja je prošla kroz filter je odstranjena, a zatim je dodata preostala količina suspenzije iz tubice i ponovljen isti proces centrifugiranja i odbacivanja tečne faze. Nakon ovog procesa u *DNeasy Mini Spin* kolone dodato je 500 µl AW2 pufera i centrifugirane su 1 min na 8000 rpm, potom je postupak ponovljen i tubice su centrifugirane 2 min na 14000 rpm. *DNeasy Mini Spin* kolona sa filterom je zatim prebačena u mikrotubu sa poklopcem (zapremine 1,5 ml) i direktno na filter je sipano 50 µl AE pufera za rastvaranje DNA. Uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, a potom su tubice centrifugirane 1 min na 8000 rpm. Tečnost koja je prošla ponovo je inkubirana na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min i centrifugirana 1 min na 8000 rpm. Dobijena tečnost na dnu tubice predstavljala je ukupnu ekstrahovanu DNA, koja je čuvana u zamrzivaču do dalje upotrebe.

4.3.2. Lančana reakcija polimeraze

Metoda lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) primenjena je za umnožavanje ITS (*internal transcribed spacer*) i *tef-1α* (*translation elongation factor 1-alpha*) regiona DNA u cilju molekularne identifikacije i karakterizacije izolovanih gljiva. Za umnožavanje ITS regiona korišćen je par univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 (White et al., 1990), a za amplifikaciju *tef-1α* genskog regiona par prajmera EF1-728F/TEF1LLErev (Carbone and Kohn, 1999; Jaklitsch et al., 2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Pregled prajmera primenjenih za umnožavanje specifičnih regiona

Ciljana sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta	Referenca
ITS rDNK	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	~600 bp	White et al., 1990
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		White et al., 1990
Elongacioni faktor <i>tef-1α</i>	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	~1200 bp	Carbone and Kohn, 1999
	TEF1LLErev	AAC TTG CAG GCA ATG TGG		Jaklitsch et al., 2005

U radnoj zapremini od 25 µl reakciona smeša sastavljena je od: 12,5 µl X PCR Master mix-a (Fermentas, Lithuania), 9,5 µl RNase-free vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf), po 1 µl svakog prajmera i po 1 µl izolovane ukupne DNA. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša u kojoj je umesto DNA uzorka dodavana RNase-free voda. PCR reakcija izvedena je u Eppendorf Master Cycler-u (Eppendorf, Germany).

Umnožavanje ITS regiona izvedeno je pri sledećim uslovima: ciklus inicijalne denaturacije 2 min na 94°C, zatim 35 ciklusa sastavljenih od denaturacije 30 s na 94°C, hibridizacije 40 s na 48°C i elongacije prajmera 40 s na 72°C i na kraju ciklus finalne elongacije 2 min na 72°C.

Amplifikacija *tef-1α* genskog regiona obavljena je pri sledećim uslovima: inicijalna

denaturacija 1 min na 94°C, zatim 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 1 min na 94°C, hibridizacije 1 min na 59°C i elongacije prajmera 50 s na 74°C, praćeno finalnom elongacijom 7 min na 74°C.

4.3.3. Vizuelizacija produkata PCR reakcije

Vizuelizacija amplifikovanih produkata PCR reakcija obavljena je elektroforetskim razdvajanjem u agaroznom gelu u $1 \times$ TBE puferu (90 mM Tris, 90 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA) pri naponu od 100 V, bojenjem u 0,1% rastvoru etidijum bromida i posmatranjem pod UV svetlom. Za vizuelizaciju produkata dobijenih primenom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 i para prajmera EF1-728F/TEF1LLErev pripreman je 1% agarozni gel. Gel je dobijen rastvaranjem 0,4 g agaroze u 40 ml $1 \times$ TBE pufera i zagrevanjem do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon rastvaranja agaroze u puferu i hlađenja do temperature od približno 60°C, gel je razliven u kalup za horizontalnu elektroforezu (BluePower 500, Serva), u koji su prethodno postavljeni separatori i češljevi. Gel je zatim ostavljen na sobnoj temperaturi oko 30 min kako bi se ohladio i polimerizovao, nakon čega su uklonjeni češljevi i kalup je uronjen u kadicu za horizontalnu elektroforezu sa $1 \times$ TBE puferom. Uzorci za elektroforezu pripremani su mešanjem 5 μ l produkta PCR reakcije i 1 μ l boje 6x Loading dye (Fermentas, Lithuania) i nalivani u bunarčice po odgovarajućem redosledu. Za određivanje veličine umnoženog produkta korišćen je 1 kb DNA marker (Fermentas, Lithuania). Amplifikovani fragmenti posmatrani su u mračnoj komori pomoću UV svetla na transluminatoru (Vilber Lourmat, France) nakon bojenja u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 10 minuta.

4.3.4. Sekvenciranje PCR produkata i filogenetske analize

Uslužno prečišćavanje i sekvenciranje u oba smera umnoženih fragmenata urađeno je u MacroGen Europe (<http://dna.macrogen-europe.com>, Holandija) korišćenjem istih prajmera za *tef-1 α* i ITS regione kao i za amplifikaciju. Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., nakon čega su sekvence deponovane u GenBank bazu podataka u okviru *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), gde su im dodeljeni pristupni brojevi (*GenBank Accession Number*).

Filogenetska analiza vrsta *T. harzianum* kompleksa identifikovanih i molekularno okarakterisanih na osnovu *tef-1 α* genskog regiona obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla. Upoređivanje je vršeno sa 21 sekvencom vrsta roda *Trichoderma* dostupnih u GenBank bazi podataka (Prilog 1; Tabela P1-1). Filogenetsko stablo rekonstruisano je u programu MEGA 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) korišćenjem *Maximum Likelihood* metode (ML) i primenom Kimura dvoparametarskog modela sa Gama distribucijom (K2+G) predloženim kao najoptimalnijim (Kimura, 1980; Tamura et al., 2011). Kao *out* grupe za rutovanje stabla korišćene su sekvence vrsta *T. aggressivum* f. *europaeum* (KP008991), *T. estonicum* (FJ860638) i *T. ceramicum* (FJ860628).

4.4. Ispitivanje morfoloških karakteristika dobijenih izolata

Morfološke karakteristike odabranih izolata iz karpofora šiitake i supstrata zasejanog bukovačom, makroskopske (izgled, oblik i boja kolonije, pigmentacija u podlozi, sporulacija i prisustvo zoniranosti, brzina porasta) i mikroskopske (oblik, boja i veličina konidija), proučavane su na kulturama gajenim dva do šest dana na PDA podlozi u mraku pri 22°C (Chaverri et al., 2003). Mereno je 50 konidija po izolatu i određena je srednja vrednost dimenzija konidija, kao i odnos dužina/širina konidija (Olympus CX41RF mikroskop, Moticam 10+ digitalna kamera i Motic Images Plus 3.0 softver).

Brzina porasta kolonije izolata izražena u mm/dan i mm/h određena je za sve izolate uključene u istraživanja (12 dobijenih u ovim istraživanjima, 6 iz kolekcije Instituta za pesticide i 4 iz kolekcije Univerziteta u Segedinu) merenjem poluprečnika kolonije od ivice isečka micelije nakon inkubacije od 72 h pri temperaturi od 22°C. Isečki micelije prečnika 6 mm postavljeni su na PDA na 1 cm od

ivice Petri kutije. Brzina porasta micelije izračunata je preko formule (**Kosanović et al.**, 2013; **Luković et al.**, 2021):

Brzina porasta (mm/h ili mm/dan)=Poluprečnik kolonije (mm)/Period inkubacije (h ili dan).

4.5. Ispitivanje ekoloških karakteristika izolata

Uticaj temperature na porast kolonije analiziran je gajenjem proučavanih izolata iz karpofora šiitake i supstrata zasejanog bukovačom (12 izolata dobijenih u ovim istraživanjima i 4 izolata iz kolekcije Univerziteta u Segedinu) na PDA pri temperaturama od 17, 20, 22, 25, 30 i 35°C. Isečci micelije prečnika 6 mm, sa ivica kolonija sa PDA, izolata *Trichoderma* spp. starih četiri dana su korišćeni kao inokulum. Postavljeno je četiri ponavljanja po izolatu. Nakon tri dana inkubacije u mraku, mereno je po 6 poluprečnika kolonije po izolatu, koji su zatim preračunati u prečnike i statistički analizirani.

4.6. Ispitivanje virulentnosti izolata *Trichoderma* spp.

Virulentnost testiranih izolata *Trichoderma* spp. (12 izolata dobijenih u ovim istraživanjima i 4 iz kolekcije Univerziteta u Segedinu) ispitana je inokulacijom gornje strane šešira ubranih karpofora jestivih gljiva (bukovače, šiitake i šampinjona) nanošenjem 20 µl suspenzije spora izolata (10^6 konidija/ml) po metodi **Bonnen and Hopkins** (1997). Suspenzija spora dobijena je na prethodno opisan način (potpoglavlje 4.3.). Test je izveden u tri ponavljanja za svaki izolat. Za negativnu kontrolu je korišćena sterilna voda. Inokulisani i kontrolni šeširi karpofora jestivih gljiva su inkubirani na vlažnom filter papiru u Petri kutijama ($\varnothing=200$ mm) pri sobnoj temperaturi ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Virulentnost osam izolata iz grupe *T. harzianum* kompleksa ispitivana je prema sve tri jestive gljive (šampinjon, bukovača i šiitake) koje im mogu biti domaćini.

Nakon četiri dana su ocenjivani simptomi po skali **Collopy et al.** (2001): 0 - bez simptoma; 1 - bleđi prsten oko inokulisane zone; 2 - svetlosmeđi prsten oko inokulisane zone; 3 - tamnosmeđi prsten na mestu inokulacije; 4 - tamnosmeđi prsten, pojava sporulacije i pojava nekrotičnih lezija oko mesta inokulacije i 5 - simptomi se šire i izvan mesta inokulacije, izražena je pojava nekrotičnih lezija i obilna sporulacija.

4.7. Ispitivanje antifungalnog delovanja etarskih ulja i fungicida prema *Trichoderma* spp.

U ogledima je testirano antifungalno delovanje ukupno 11 etarskih ulja dobijenih procesom hidrodestilacije iz aromatičnog i lekovitog bilja poreklom iz Srbije: divlja nana, pitoma nana, majčina dušica, bosiljak, tuja, jela, bor, kleka, kantarion, hajdučka trava i mirođija prema *Trichoderma* spp. Takođe, testirano je antifungalno delovanje dva fungicida: prochloraza (DMI - inhibitori demetilacije sterola - grupa imidazola, preparat Mirage[®] 45 EC (450 g/L prochloraz), Adama Makhsteshim Ltd., Izrael) i metrafenona (inhibitor mitoze i ćelijske deobe - grupa benzofenona, preparat Vivando[®] SC (500 g/l metrafenon), BASF SE, Nemačka), kao i antifungalno delovanje jednog biofungicida - azadiraktin A+B (bioinsekticid ekstrahovan iz ulja masline Neem drveta (*Azadirachta indica*), preparat Ozoneem Trishul[®] EC [1% azadiraktin (A+B) ekstrahovan iz ulja masline nim drveta], Biogenesis, Srbija) prema *Trichoderma* spp.

4.7.1. Prikupljanje lekovitog i aromatičnog bilja i dobijanje etarskih ulja

Jedanaest vrsta aromatičnog i lekovitog bilja prikupljeno je u periodu od 2016. do 2020. godine na različitim lokalitetima u Srbiji (Tabela 2). Biljni materijal je prikupljen za potrebe dobijanja etarskih ulja procesom hidrodestilacije u trajanju od 2,5 h u aparaturi po Klevendžeru.

Tabela 2. Poreklo biljaka iz kojih je dobijeno etarsko ulje

Naziv biljke	Latinski naziv biljke	Biljni materijal	Poreklo biljnog materijala	Godina prikupljanja
Tuja	<i>Thuja orientalis</i> L.	Plod, list	Zemun	2016-2019
Jela	<i>Abies alba</i> Mill.	Iglice	Zemun	2016-2019
Bor	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Iglice	Zemun	2016-2019
Kleka	<i>Juniperus communis</i> L.	Plod	“Bilje Boča” d.o.o.	2016-2020
Bosiljak	<i>Ocimum basilicum</i> L.	List, cvet	Mali Mokri Lug	2016-2020
Divlja nana	<i>Mentha spicata</i> L.	List, cvet	“Lekovito bilje sa Goča”	2016-2020
Pitoma nana	<i>Mentha piperita</i> L.	List, cvet	“Lekovito bilje sa Goča”	2016-2020
Majčina dušica	<i>Thymus serpyllum</i> L.	List, cvet	Kopaonik	2018-2020
Hajdučka trava	<i>Achillea millefolium</i> L.	List, cvet	“Bilje Borča” d.o.o.	2016-2020
Kantarion	<i>Hypericum perforatum</i> L.	List, cvet	“Bilje Borča” d.o.o.	2016-2020
Mirođija	<i>Anethum graveolens</i> L.	List, seme	Kosjerić	2018-2020

4.7.2. Analiza etarskih ulja

Identifikacija komponenti svih izdvojenih etarskih ulja je izvršena gasno-masnim spektrometrom (GC/MS, Varian CP-3800/Saturn 2200) opremljenim *split/splitless* injektorom i DB-5MS kolonom (30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 μ m), korišćenjem Wiley 7.0 biblioteke masenih spektara, i poređenjem dobijenih Kovačevih indeksa (RI) sa literaturnim podacima (Adams, 2007). Heksanski rastvor uzorka etarskog ulja (1 μ l, 1% rastvor) je injektiran u split-režimu (1:20), pri temperaturama injektora, jonskog trapa i transfer-linije od 250, 250 i 280°C, respektivno, pri protoku helijuma kao nosećeg gasa od 1 ml/min, dok je temperatura kolone, linearno programirana od 50 do 250°C, sa brzinom zagrevanja od 4°C i izoterskim držanjem na 250°C (10 min).

Kvantitativna analiza pojedinačnih komponenti etarskih ulja je izvršena gasnim-hromatografom (GC, Agilent 7890A) opremljenim *split/splitless* injektorom i DB-5MS kolonom (30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 μ m) i plameno-jonizujućim detektorom (FID) pri čemu je zastupljenost komponenti u hromatogramima dobijena metodom normalizacije, nakon eliminisanja pika rastvarača. Heksanski rastvor uzoraka etarskog ulja (1 μ l, 1% rastvor) je injektiran u split-režimu (1:20), pri temperaturi injektora i detektora od 250 i 300°C, respektivno, pri protoku vodonika kao nosećeg gasa od 1 ml/min, dok je temperaturni program kolone bio isti kao tokom GC/MS analize.

4.7.3. In vitro metode za određivanje antifungalnog delovanja etarskih ulja

Antifungalna aktivnost etarskih ulja *in vitro* testovima određena je primenom mikrodilucione metode i primenom četiri makrodilucione metode: fumigantne metode sa suspenzijom spora, fumigantne metode sa isečkom micelije, kontaktne metode sa suspenzijom spora i kontaktne metode sa isečkom micelije (Luković et al., 2018). Primenom mikrodilucione metode testirani su svi izolati (ukupno 22 - 12 dobijenih u ovim istraživanjima, 6 iz kolekcije Instituta za pesticide i 4 iz kolekcije Univerziteta u Segedinu), dok je za ispitivanja makrodilucionim metodama odabrano šest izolata (predstavnici agresivnih vrsta sa šampinjona (1) i bukovače (2) i predstavnici vrsta *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona (1), bukovače (1) i šiitake (1)). Osetljivost svih izolata uključenih u istraživanja (22) prema etarskom ulju mirođije određena je primenom svih pet metoda.

Primenom mikro- i makrodilucionih metoda sa suspenzijom spora patogena, inokulum 10^6 konidija/ml je pripreman ispiranjem konidija destilovanom vodom (10 ml) sa površine čiste kulture patogene gljive (inkubirane četiri dana na PDA pri temperaturi od 20°C, u Petri kutiji $\varnothing=90$ mm) uz dodatak emulgatora Tween 20 (v/v 0,1%), proceđivanjem kroz dvostruki sloj gaze i određivanjem koncentracije hemocitometrom. Primenom metoda sa isečcima micelije, uzimani su fragmenti prečnika 6 mm sa ivica kolonije patogene gljive (inkubirane četiri dana na PDA pri temperaturi od 20°C).

Mikrodiluciona metoda

Primenom mikrodilucione metode određena je antifungalna aktivnost etarskih ulja pri direktnom kontaktu ulja i spora gljive. Ispitivanja su izvođena u mikrotitarskim pločicama sa 96 udubljenja sa "U" dnom (Spektar d.o.o., Čačak) zapremine 300 μ l. U svako udubljenje je dodavana ukupna količina 100 μ l: 80 μ l hranljive podloge MB (*Malt broth* - MB: industrijski slad – 500 ml i destilovana voda – 500 ml. Smeša vode i slada se zagreva do ključanja i reguliše pH pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl) (Booth, 1971), 10 μ l rastvora različitih koncentracija etarskih ulja u emulgatoru Tween 20 i 10 μ l suspenzije spora patogenih gljiva 10^6 konidija/ml. Dve negativne kontrole su bile bez etarskih ulja, prva bez emulgatora [90 μ l podloge MB i 10 μ l suspenzije spora patogenih gljiva], i druga sa emulgatorom [80 μ l podloge MB, 10 μ l emulgatora Tween 20 i 10 μ l suspenzije spora]. Pozitivna kontrola je bio fungicid prochloraz u koncentraciji 0,01%, (Mirage 450 EC, Adama Makhsteshim Ltd, Izrael): 80 μ l podloge MB, 10 μ l fungicida prochloraza i 10 μ l suspenzije spora (10^6 konidija/ml). Štok rastvor fungicida pripreman je sa sterilnom vodom u normalnim sudovima 100 ml, a rastvori etarskih ulja sa emulgatorom Tween 20 u mikrotubama 0,5 ml. Aktivnost etarskih ulja određena je postavkom simetrično rastućih koncentracija rastvorenih u emulgatoru Tween 20: 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 i 25 μ l/ml. Test za svaku koncentraciju i kontrole je rađen u četiri ponavljanja, a ceo ogled je ponovljen dva puta.

Makrodiluciona kontaktna metoda

Primenom makrodilucione kontaktne metode određena je antifungalna aktivnost etarskih ulja pri direktnom kontaktu ulja i spora gljive i pri direktnom kontaktu ulja i micelije gljive u Petri kutijama ($\varnothing=55$ mm) na PDA podlozi.

Makrodiluciona kontaktna metoda sa suspenzijom spora. Rastvor etarskog ulja i emulgatora Tween 20 (1 ml) je nakon mešanja Vortex-om (zbog boljeg dispergovanja u podlozi) dodavan u otopljenu PDA podlogu (4 ml) promešan na magnetnoj mešalici i razlivan u plastične Petri kutije ($\varnothing=55$ mm). U agarnoj hranljivoj podlozi napravljeno je po tri udubljenja prečnika 5 mm (ponavljanja) u koje je mikropipetom dodavano po 10 μ l suspenzije spora. Pripremljeni su štokovi različitih koncentracija etarskih ulja dispergovanih u emulgatoru Tween 20: 1,25; 2,5; 5; 10 i 20 μ l, pa su nakon dodavanja u PDA podlogu dobijene konačne koncentracije etarskih ulja: 0,25; 0,5; 1; 2 i 4 μ l/ml. Zasejane kutije su zaštićene parafilmom i inkubirane u obrnutom položaju tri dana pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Rađeno je po tri ponavljanja za svaku koncentraciju ulja i dve pozitivne kontrole sa PDA podlogom sa i bez emulgatora Tween 20, kako bi se ispitalo dejstvo samog rastvarača na gljivu. Ogled je ponovljen dva puta.

Makrodiluciona kontaktna metoda sa isečkom micelije. Etarska ulja u ovoj metodi primenjivana su u koncentracijama u PDA podlozi: 0,25; 0,5; 1; 2 i 4 μ l/ml. Mešavina podloge (4 ml) i etarskog ulja sa emulgatorom Tween 20 (1 ml) u konačnoj zapremini od 5 ml razlivana je u Petri kutije ($\varnothing=55$ mm) i zasejavana isečkom micelije kolonije patogene gljive prečnika 6 mm. Isečak micelije kolonije postavljan je na sredinu Petri kutije. Postavljene su dve pozitivne kontrole sa PDA podlogom, sa i bez emulgatora Tween 20, kako bi se ispitalo dejstvo samog emulgatora na gljivu. Zasejane kutije su zaštićene parafilmom i inkubirane u obrnutom položaju tri dana pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Test za svaku koncentraciju i kontrole je ponovljen tri puta, a ceo ogled dva puta.

Makrodiluciona fumigantna metoda

Primenom makrodilucione fumigantne metode određena je antifungalna aktivnost etarskih ulja dejstvom para (gasovite faze) na klijanje spora gljive i dejstvom para ulja na porast micelije gljive u Petri kutijama ($\varnothing=55$ mm) na PDA podlozi.

Makrodiluciona fumigantna metoda sa suspenzijom spora. Odabrana etarska ulja primenjivana su u koncentracijama od: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 i 0,32 μ l/ml vazdušne faze. Ove konačne

vrednosti primenjivanih koncentracija etarskih ulja u vazdušnoj fazi Petri kutije ($\varnothing=55$ mm), dobijene su preračunavanjem odgovarajućih količina ulja (0,66; 1,32; 2,64; 5,28 i 10,56 μ l) direktno dodavanih na sterilne filter papiriće prečnika 6 mm na sredini poklopca Petri kutija. Prethodno otopljena PDA podloga razlivana je u Petri kutije u količini po 5 ml. U svakoj kutiji napravljeno je tri udubljenja prečnika 5 mm (ponavljanja) u koje je mikropipetom dodavano 10 μ l suspenzije spora patogenih gljiva. Zasejane kutije su zaštićene parafilmom, kako bi se sprečilo isparavanje ulja u spoljašnju sredinu. Kutije su zatim inkubirane u obrnutom položaju u trajanju od tri dana pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Test za svaku koncentraciju ulja i kontrolu (bez etarskog ulja) je postavljen tri puta. Ogled je ponovljen dva puta.

Makrodiluciona fumigantna metoda sa isečkom micelije. Etarska ulja dodavana su direktno na filter papiriće prečnika 6 mm, postavljenih na sredinu poklopca Petri kutija ($\varnothing=55$ mm) u količinama od: 0,66; 1,32; 2,64; 5,28 i 10,56 μ l. Na osnovu zapremine vazdušne faze u Petri kutijama, preračunate su konačne koncentracije etarskih ulja: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 i 0,32 μ l/ml vazdušne faze. Prethodno otopljena PDA podloga (55°C) razlivana je u Petri kutije u količini po 5 ml i zasejavana isečkom micelije kolonije patogene gljive prečnika 6 mm. Isečak micelije kolonije postavljan je na sredinu Petri kutije. Zasejane kutije su umotavane parafilmom i inkubirane u obrnutom položaju tri dana pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Rađeno je po tri ponavljanja za svaku koncentraciju ulja i kontrolu, a ceo ogled je ponovljen dva puta.

Očitavanje rezultata testova sa primenjenom makrodilucionom metodom je vršeno vizuelno - posmatranjem dna mikrotitarskih ploča. Nakon inkubacije, određena je minimalna inhibitorna koncentracija testiranog ulja (*minimum inhibitory concentration*, MIC = najmanja koncentracija ulja koja sprečava vidljivi porast patogene gljive) i minimalna fungicidna koncentracija ulja (*minimum fungicidal concentration*, MFC = najmanja koncentracija ulja koja sprečava vidljivi porast gljive nakon presejavanja na podlogu bez antimikrobne supstance). Rezultati za makrodilucionu metodu očitani su nakon sedam dana inkubacije pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$. MFC je određena reinokulisanjem 2 μ l iz udubljenja mikrotitarskih ploča u kojim nije bilo razvoja patogena u 100 μ l tečne MB podloge i inkubiranjem tri dana pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$ do očitavanja. Najniža koncentracija na kojoj nije bilo vidljivog rasta određena je kao MFC, ukazujući na inhibiciju klijanja spora 99,5% u poređenju sa pozitivnom kontrolom sa fungicidom prochlorazom. Metoda se izvodi po preporuci CLSI (CLSI, *Clinical and laboratory standards institute*, USA, 2008).

Primenom makrodilucione metode, nakon tri dana inkubacije su očitavani rezultati merenjem poluprečnika kolonije i utvrđivanjem MIC. MFC je određena reinokulacijom isečka micelije patogena na čistu PDA podlogu i daljom inkubacijom u trajanju od tri dana pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$ do očitavanja. Procenat inhibicije rasta micelije određen u testovima sa makrodilucionim metodama i izračunat pomoću sledeće formule (Kaiser et al., 2005):

$$\text{PI} (\%) = (\text{K} - \text{T}) / \text{K} \times 100$$

PI - inhibicija rasta micelije izražena u procentima (%),
K - poluprečnik micelije u kontroli i
T - poluprečnik micelije u tretmanu.

4.7.4. *Checkerboard* metoda za utvrđivanje sinergističke aktivnosti etarskih ulja

Za ispitivanje potencijalne sinergističke aktivnosti između dva etarska ulja (mirođije i divlje nane; mirođije i pitome nane; mirođije i majčine dušice) prema *Trichoderma* spp. korišćene su mikrotitarske pločice sa 96 mesta - udubljenja "U" oblika zapremine 300 μ l i tečna MB podloga. U udubljenja je dodavano: 70 μ l tečne MB podloge, po 10 μ l etarskih ulja (u koncentracijama od $1/16 \times \text{MIC}$ do $8 \times \text{MIC}$ međusobno kombinovanih u šahovskom stilu) i 10 μ l suspenzije spora testiranih izolata 10^6 spora/ml. Etarska ulja ispitivana su u koncentracijama od: $1/16 \times \text{MIC}$; $1/8 \times \text{MIC}$; $1/4 \times$

MIC; $1/2 \times \text{MIC}$; $1 \times \text{MIC}$; $2 \times \text{MIC}$; $4 \times \text{MIC}$ i $8 \times \text{MIC}$, u kombinaciji svako etarsko ulje sa svakim. Očitavanja su vršena nakon sedam dana inkubacije pri temperaturi od $22 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Jasqueline et al.**, 2005). Ispitivanja su obuhvatila sve izolate uključene u istraživanja (22). Interakcija dva ulja određena je na osnovu frakcione inhibitorne koncentracije (FIC) i frakcionog inhibitornog koncentracionog indeksa (FiCi).

Frakciona inhibitorna koncentracija FIC (*fractional inhibitory concentration*) izračunata je preko sledećih formula:

$\text{FIC ulja 1} = \text{MIC ulja 1 kada je u kombinaciji sa uljem 2} / \text{MIC ulja 1}$

$\text{FIC ulja 2} = \text{MIC ulja 2 kada je u kombinaciji sa uljem 1} / \text{MIC ulja 2}$

Interakcija dva ulja ili frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks FiCi (*fractional inhibitory concentration index*) dobijen je preko formule:

$\text{FiCi} = \text{FIC ulja 1} + \text{FIC ulja 2}$

Nivo sinergizma određen je preko sledeće skale:

$\text{FiCi} \leq 0,5$ – sinergistički efekat,

$\text{FiCi} > 0,5 < 2,0$ – aditivni efekat

$\text{FiCi} > 2,0 < 4,0$ – indiferentni efekat i

$\text{FiCi} \geq 4,0$ – antagonistički efekat (**Jasqueline et al.**, 2005).

4.7.5. In vitro makrodiluciona metoda za određivanje toksičnosti fungicida

In vitro osetljivost izolata vrsta roda *Trichoderma* prema dva fungicida testirana je po delimično modifikovanoj metodi **Leroux and Gredit** (1972). Isečci micelije kolonija *Trichoderma* izolata stara četiri dana inokulisani su na PDA podlogu obogaćenu različitim koncentracijama fungicida: 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 100,00 i 1000,00 $\mu\text{g/ml}$, i inkubirani pri temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Ovim preliminarnim ispitivanjima određene su koncentracije fungicida kojima je postignuta inhibicija izolata između 5 i 95% u odnosu na kontrolu. 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% (EC_{50}) (**Robertson et al.**, 1984). Na osnovu prethodnih rezultata izabrane su konačne koncentracije za prochloraz i metrafenon: 0,00243; 0,0081; 0,027; 0,09 i 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Toksičnost fungicida metrafenona ispitivana je prema svim izolatima uključenim u istraživanja (22), dok je toksičnost fungicida prochloraza ispitivana prema 16 izolata (12 izolata dobijenih u ovim istraživanjima i 4 iz kolekcije Univerziteta u Segedinu).

Fungicidi su dispergovani u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim uz neprekidno mešanje aseptično dodavani u rastopljenu PDA podlogu, prethodno ohlađenu do 50°C . Odnos fungicida i podloge bio je 1:9, dok je u kontroli fungicid zamenjen destilovanom vodom. Svi testovi su izvedeni u tri ponavljanja, a eksperiment je ponovljen dva puta. Nakon tri dana inkubacije pri temperaturi od $20 \pm 1^\circ\text{C}$ vršeno je merenje po šest radialno raspoređenih rastojanja od ivice inokuluma do ivice kolonije. Toksičnost fungicida određena je probit analizom, za koju su uzimani rezultati odgovarajućih koncentracija i procenti inhibicije izračunati u odnosu na kontrolu. Određene su koncentracije koje inhibiraju rast micelije 50% i 90% (EC_{50} i EC_{90}), kao i nagib regresione linije (b) (**Leroux and Gredit**, 1972). Kriterijum za značajno razlikovanje dve regresione linije bio je nepreklapanje intervala poverenja za EC_{50} i EC_{90} na nivou verovatnoće 0,05 (**Finney**, 1971). Ispitivani izolati su na osnovu EC_{50} vrednosti grupisani na: visoko osetljive ukoliko je EC_{50} manja od 5 $\mu\text{g/ml}$, umereno osetljive ukoliko je EC_{50} između 5 i 50 $\mu\text{g/ml}$ i rezistentne ukoliko je EC_{50} veća od

50 µg/ml (Gea et al., 1996; Grogan et al., 2000). Određen je i faktor rezistentnosti (*resistance factor*, RF) preko formule (Delp and Dekker, 1985):

$RF = EC_{50} \text{ posmatranog izolata} / EC_{50} \text{ najosetljivijeg izolata.}$

Nivo rezistentnosti ocenjen je na osnovu skale koju je predložio Gout (1994):

RF < 3 – osetljivi izolati,
RF > 3 < 20 – umereno rezistentni,
RF > 20 < 80 – rezistentni i
RF > 100 – visoko rezistentni izolati.

Selektivna toksičnost. Indeks selektivnosti za etarsko ulje mirođije i fungicide prochloraz i metrafenon izračunat je kao odnos srednje EC₅₀ vrednosti za *Trichoderma* spp. i odgovarajuće procenjene vrednosti za jestivu gljivu - šampinjon, bukovaču ili šiitake (Chrysai-Tokousbalides et al., 2007). Toksičnost etarskog ulja mirođije, fungicida metrafenona i prochloraza prema jestivim gljivama određena je primenom makrodilucione metode. Isečci micelije sojeva jestivih gljiva (iz kolekcija Instituta za pesticide: šampinjon A15 (Sylvan, Hungaria zRt, Mađarska), bukovača P80 (Hollander spawn BV, Holandija i šiitake 237) starih dve nedelje inokulisani su na PDA podlogu obogaćenu različitim koncentracijama etarskog ulja mirođije: 0,065; 0,125; 0,25; 0,5 i 1 µg/ml i fungicida: 0,00243; 0,0081; 0,027; 0,09 i 0,3 µg/ml. Nakon deset dana inkubacije pri temperaturi od 20 ± 1°C vršeno je merenje po šest radijalno raspoređenih rastojanja od ivice inokuluma do ivice kolonije. Toksičnost je određena probit analizom.

4.7.6. *In vivo* test za procenu efikasnosti antifungalnih jedinjenja i uticaja na prinos šampinjona

Plan ogleda. Efikasnost odabranog etarskog ulja i biopreparata u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i uticaj na prinos šampinjona ispitan je u oglednom gajilištu Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, u uslovima *in vivo*. Ogledi su postavljeni po uzoru na proces komercijalne proizvodnje šampinjona u Srbiji. Ispitivanja su izvedena u dva nezavisna ogleda. Netretirane inokulisane i neinokulisane varijante predstavljale su negativne kontrole. Ukupno 10 varijanti postavljano je u šest ponavljanja. Tretirane površine u gajilištu su bile raspoređene po potpuno slučajnom blok sistemu. Ceo ogled je ponovljen dva puta.

Fermentisan i pasterizovan kompost (1,5 kg) (Fabrika komposta „Uča.“, Smederevo-Vranovo, Srbija) je zasejan micelijom šampinjona, tzv. "semena" *Agaricus bisporus* A15 (Sylvan Hungaria Zrt, Mađarska) u količini 1% (15 g) i smešten u plastične kutije dimenzija 0,340 m × 0,215 m × 0,130 m (dužina×širina×visina), prethodno sterilisanih 96% etanolom. Micelija šampinjona je inkubirana u supstratu 14 - 20 dana pri temperaturi od 24°C. Nakon što je micelija u potpunosti prorasla kompost, na površinu komposta postavljeno je po 1,3 kg pokrivke, odnosno crnog treseta (Terahum d.o.o., Veliko Gradište, Srbija) pomešanog sa krečom (1,4%, Tara stil d.o.o., Dobanovci, Srbija) i sterilisanog persirćetnom kiselinom (90 ml/m², 15 % Peral S, MidraEko, Beograd, Srbija). Dan postavljanja pokrivke označan je kao nulti dan ogleda. Sedam dana nakon inkubacije pri 22°C, temperatura je spuštana na 17°C kako bi se podstaklo obrazovanje karpofora šampinjona. Pokrivka je rastresena grabuljanjem desetak dana nakon njenog postavljanja, kako bi se omogućilo lakše prorastanje micelije kroz pokrivku i formiranje karpofora na celoj površini. Karpofore su brane ručno svakog dana tokom dva talasa plodonošenja i klasifikovane u dve grupe: zdrave (bez simptoma zelene plesni) ili bolesne (sa simptomima zelene plesni). Prilikom klasifikacije na osnovu direktne vizuelne observacije, zabeleženi su i broj i masa karpofora. Na osnovu dobijenih podataka za svaki tretman izračunat je procenat efikasnosti tretmana za suzbijanje patogena preko Abbott-ove formule (Abbott, 1925; Gea et al., 2010):

$E (\%) = ((I_k - I_t) / I_k) \times 100$

E – efikasnost,
 Ik – pojava bolesti u kontroli i
 It – pojava bolesti u tretmanu.

Efekat tretmana na prinos šampinjona procenjen je na osnovu biološke efektivnosti (BE) prema **Chrysai-Tokousbalides et al. (2007)** i izračunat preko formule:

$$BE (\%) = (\text{ukupna masa sveže ubranih karpofora} / \text{suva masa komposta}) \times 100$$

Suva masa komposta određena je prema metodi **Reeb and Milota (1999)**: masa komposta merena je pre i nakon sušenja 24 h pri temperaturi od 105°C, a zatim je izračunat sadržaj vlage komposta kao odnos suve i vlažne mase izražen u procentima (suva masa komposta / vlažna masa komposta \times 100).

Veštačka inokulacija. Kompost je inokulisan pripremljenom suspenzijom spora 10^6 konidija/ml *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 na dan postavljanja supstrata zasejanog micelijom šampinjona u plastične kutije. Suspenzija soja T77 doze 10^6 konidija/m² površine komposta je dodavana u količini po 10 ml niz svaki od četiri unutrašnja zida kutija.

Tretmani. Tretmani tečnim suspenzijama fungicida/biofungicida i etarskog ulja su izvedeni zalivanjem pokrivke inokulisanih i neinokulisanih supstrata u količini primene od 30 ml/kutuji (osim negativne kontrole): *a*) etarsko ulje mirođije [*aI*] $6 \times 5 \mu\text{l}$ - na dan postavljanja pokrivke i svakih sedam dana; *aII*) $6 \times 10 \mu\text{l}$ - na dan postavljanja pokrivke i svakih sedam dana]; *b*) fungicidom prohloraz – prva pozitivna kontrola ($2 \times 1,5 \text{ ml}$ – četvrtog dana od postavljanja pokrivke i nakon prvog talasa plodonošenja, nakon 22. dana); i *c*) biofungicid azadiraktin – druga pozitivna kontrola ($6 \times 0,5 \text{ ml}$ – na dan postavljanja pokrivke i svakih sedam dana). Negativne kontrole (inokulisana i neinokulisana) tretirane su primenom 30 ml česmenske vode u vreme tretiranja fungicidima.

Sinergističko dejstvo fungicida i etarskog ulja mirođije je ispitano postavljanjem pet dodatnih inokulisanih tretmana: *d*) etarsko ulje mirođije 20% od početne doze [*dI*] 20% od početne doze ($6 \times 1 \mu\text{l}$ – na dan postavljanja pokrivke i zatim na sedam dana); *dII*) 20% od početne doze ($6 \times 2 \mu\text{l}$ – na dan postavljanja pokrivke i zatim na sedam dana)]; *e*) fungicid prohloraz u dozi 80% standardne doze ($2 \times 1,2 \text{ ml}$ - četvrtog dana od postavljanja pokrivke i posle prve berbe); *f*) zajednička primena etarskog ulja mirođije I/II (20%) i fungicida (80%): [*fI*] etarsko ulje mirođije 20% od početne doze ($6 \times 1 \mu\text{l}$ – na dan postavljanja pokrivke i zatim na sedam dana) i fungicida 80% ($2 \times 1,2 \text{ ml}$ - četvrtog dana od postavljanja pokrivke i posle prve berbe); *fII*) 20% od početne doze ($6 \times 2 \mu\text{l}$ – na dan postavljanja pokrivke i zatim na sedam dana) i fungicida prohloraza 80% ($2 \times 1,2 \text{ ml}$ - četvrtog dana od postavljanja pokrivke i posle prve berbe)]. Doze primene tretmana prikazane su Tabeli 3.

Tabela 3. Primenjeni tretmani u oglednom gajilištu

Tretman	Aktivna supstanca	Doza po m ²	Stopa primene vodenog rastvora
Etarsko ulje I (1%)	EU Mirođija (6×5)	30 μl	390 ml/m ²
Etarsko ulje II (2%)	EU Mirođija (6×10)	60 μl	390 ml/m ²
Azadiraktin (1%)	Azadiraktin 1%	3 ml	390 ml/m ²
Prohloraz s.d.p.	Prohloraz 450 mg/l	3 ml	390 ml/m ²
Prohloraz 80% s.d.p.	Prohloraz 450 mg/l	2,4 ml	390 ml/m ²
Etarsko ulje 20% I	EU Mirođija (6×1)	6 μl	390 ml/m ²
Etarsko ulje 20% II	EU Mirođija (6×2)	12 μl	390 ml/m ²
EU I 20% + P 80% s.d.p.	EU M 0,5 + P 450 mg/l	6 μl + 2,4 ml	390 ml/m ²
EU II 20% + P 80% s.d.p.	EU M 1 + P 450 mg/l	12 μl + 2,4 ml	390 ml/m ²

s.d.p. – standardna doza primene

4.7.7. Ispitivanje aditivnog, sinergističkog ili antagonističkog dejstva antifungalnih jedinjenja

Aditivno, sinergističko ili antagonističko dejstvo fungicida i etarskog ulja mirođije izračunato je Limpel-ovoj formuli (**Richer**, 1987):

$$Ee = (X+Y) - (X \times Y) / 100$$

Ee – očekivani aditivni odgovor dve inhibitorne supstance (etarskog ulja mirođije i fungicida prochloraz),

X i Y – procenat unhibicije koju izazivaju etarsko ulje mirođije i fungicid prochloraz.

Sinergistički faktor (SF) izračunat je na osnovu Abbott-ove formule kao odnos očekivane i postignute inhibicije (**Abbot**, 1925). Nivo sinergizma određen je preko sledeće skale:

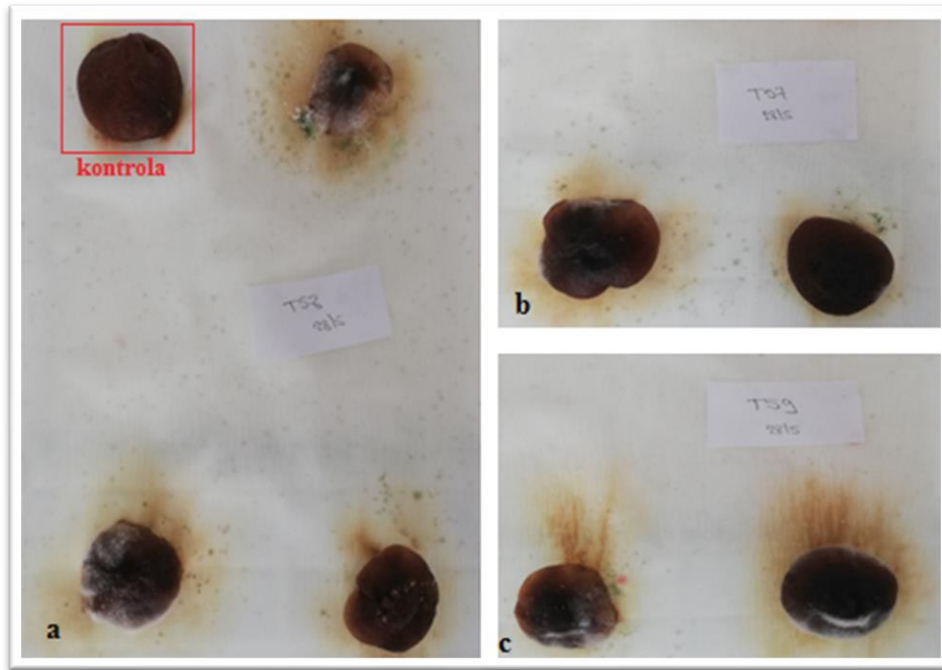
SF > 1 – sinergistička reakcija,

SF = 1 – aditivna reakcija i

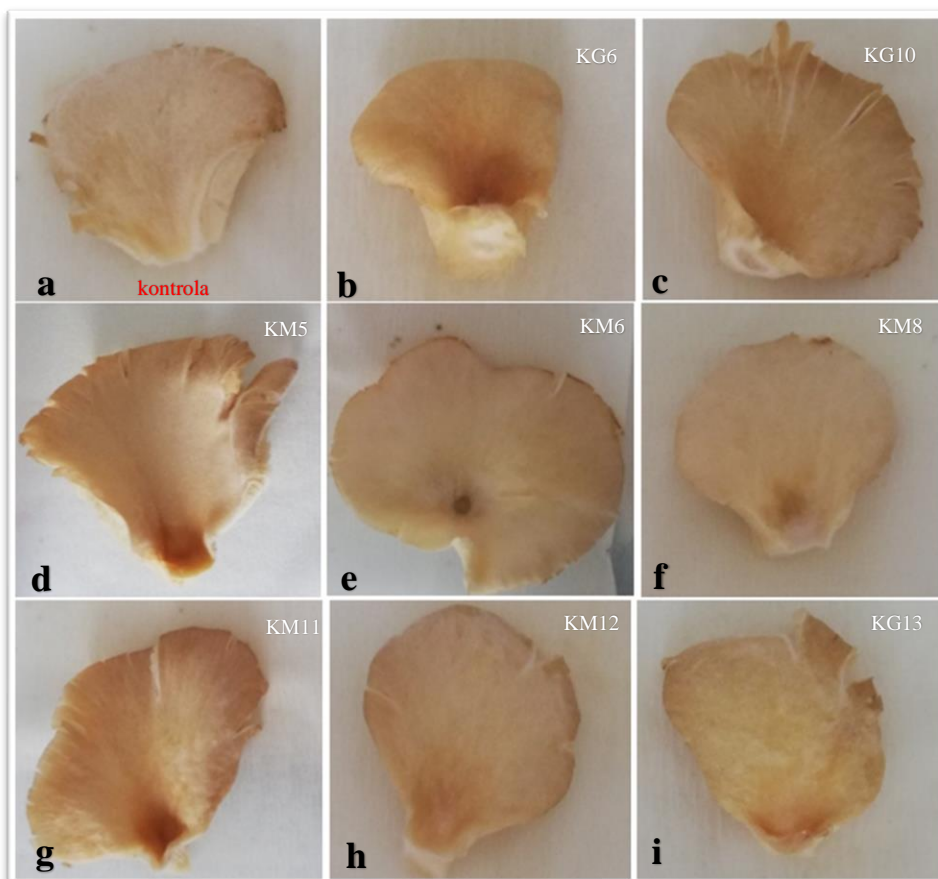
SF < 1 – antagonistička reakcija.

4.8. Statistička analiza

Za statističku obradu podataka korišćen je softverski paket *Statistika za Windows 6.0.* (*Stat Soft Italy*, 1997) i program *Statgraphics* (*Statistical Graphics Corporation, USA*). Podaci su analizirani serijom testova: ANOVA testom (jedno- i multifaktorijalnom analizom varijanse), a značajnost razlika *Fisher LSD* testom. Kriterijum za značajnost razlika je na nivou verovatnoće $P < 0,05$ (**Sokal and Rohlf**, 1995). Testovi su primenjeni u analizi antifungalnih supstanci, toksičnosti za izolate patogenih gljiva *in vitro* i efikasnosti u suzbijanju simptoma zelene plesni i uticaja na prinos *in vivo*. Kriterijum za značajno razlikovanje dve regresione linije u probit analizi toksičnosti fungicida je nepreklapanje intervala poverenja za EC₅₀ i EC₉₀ na nivou verovatnoće 0,05 (**Finney**, 1971).



Slika 2. Izgled karpofora šiitake nakon pet dana od veštačke inokulacije spoljašnje strane šešira suspenzijom spora izolata: T58 (a), T57 (b) i T59 (c). Kontrola je inokulisana sterilnom vodom.



Slika 3. Izgled karpofora bukovače nakon pet dana od veštačke inokulacije spoljašnje strane šešira suspenzijom spora izolata: KG6 (b), KG10 (c), KM5 (d), KM6 (e), KM8 (f), KM11 (g), KM12 (h), KG13 (i). Kontrola (a) je inokulisana sterilnom vodom.

5.3. Molekularna identifikacija i filogenetske analize izolata

Identifikacija na osnovu ITS regiona. Molekularna identifikacija izolata na bazi ITS regiona obavljena je primenom PCR metode uz korišćenje ITS1/ITS4 para prajmera. Identifikacija 12 odabranih izolata (KG6, KG10, KG13, KM4, KM5, KM6, KM8, KM11, KM12, T57, T58 i T59) obavljena je nakon sekvenciranja ITS regiona i njihove obrade, višestrukim uparivanjem sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti pomoću BLAST (*Basic Alignment Search Tool*) analize i upotrebom bioinformatičkog programa *TrichoKEY* 2.0 na www.isth.info (Druzhinina et al., 2005).

Kao rezultat umnožavanja ITS regiona PCR metodom, korišćenjem univerzalnog para prajmera (ITS1/ITS4), utvrđeno je prisustvo amplifikovanih fragmenata DNA očekivane veličine ~600 bp kod svih ispitivanih izolata.

Analizom dobijenih sekvenci ITS regiona rDNA izolata KG6, KM4, KM5 i KM12 utvrđena je 100% nukleotidna sličnost sa sekvencom izolata vrste *T. pleurotica* izolovanog iz poljoprivrednog zemljišta u Kini (MF871561), kao i 99,65% sličnosti sa sekvencom referentnog izolata vrste *T. pleurotica* izolovanog iz supstrata bukovače u Severnoj Koreji (CBS:124383, HM142362). Međusobnim poređenjem četiri sekvence *T. pleurotica* dobijenih u ovim istraživanjima utvrđena je 100% sličnost sva četiri izolata.

Analizom dobijenih sekvenci izolata KM6, KM8 i KM11 utvrđena je nukleotidna sličnost od 99,82% sa sekvencom referentnog izolata vrste *T. pleuroti* izolovanog iz supstrata bukovače u Severnoj Koreji (CBS:124387, HM142363) i sekvencom izolata vrste *T. pleuroti* izolovanog iz supstrata bukovače u Španiji (FJ418567), kao i 99,64% sličnosti sa sekvencama izolata vrste *T. pleuroti* izolovanog iz supstrata bukovače u Mađarskoj (EU280069). Međusobnim poređenjem tri sekvence izolata *T. pleuroti* dobijenih u ovim istraživanjima utvrđena je 100% sličnost sva tri izolata.

Sekvence izolata KG10 i KG13 su na osnovu analize nukleotidne sličnosti ITS regiona rDNA imale 100% sličnost sa sekvencama izolata vrste *T. harzianum* izolovanih iz poljoprivrednog zemljišta u Kini (MF780869 i MF871532) i iz šumskog zemljišta u Španiji (KX343085 i KX343083). Međusobnim poređenjem zabeležena je 100% sličnost ova dva izolata. Sekvence izolata T58 i T59 su najviši stepen nukleotidne sličnosti od 99,82% imale sa sekvencama izolata vrste *T. harzianum* izolovanih iz zemljišta u Argentini (MT577837 i MT577649) i Kini (MK886859) i gajilišta šampinjona u Kini (MK552405). Međusobnim poređenjem zabeležena je 100% sličnost i ova dva izolata. Za sekvencu izolata T57 je utvrđena nukleotidna sličnost od 99,82% sa sekvencama izolata vrste *T. harzianum* izolovanih iz zemljišta u Kini (KY750444) i lekovite biljke noćurka u Indiji (KM203603).

Među prikupljenim izolatima iz gajilišta bukovače u Srbiji, identifikovana je vrsta *T. pleurotica* (KG6) i vrste koje pripadaju *T. harzianum* kompleksu (KG10 i KG13) imenovane kao *T. cf. harzianum* (*cf.*=*confore* – potrebno je uraditi dodatne analize kako bi se bliže odredila vrsta), dok su među izolatima iz gajilišta bukovače u S. Makedoniji identifikovane *T. pleurotica* (KM4, KM5 i KM12) i *T. pleuroti* (KM6, KM8 i KM11). Odabrani izolati prikupljeni u gajilištu šitake u Srbiji identifikovani su kao vrste koje pripadaju *T. harzianum* kompleksu tj. *T. cf. harzianum* (T57, T58 i T59) (Tabela 4).

Pristupni brojevi za ITS region u GenBank svih korišćenih izolata u ovom radu prikazani su u Tabeli 4. Identifikacije vrsta *T. pleuroti*, *T. pleurotica* i *T. cf. harzianum* (THSC), prouzrokovače zelene plesni bukovače u Srbiji i S. Makedoniji predstavljaju prve nalaze ovih patogena u ovim zemljama (Luković et al., 2021).

Identifikacija na osnovu *tef-1a* genskog regiona. Molekularna identifikacija zasnovana na analizi *tef-1a* genskog regiona pet odabranih izolata *T. harzianum* kompleksa (dva dobijena u ovom radu - KG13 i T57, tri iz kolekcije Instituta za pesticide - T10, T52, T54) obavljena je na prethodno opisan način, BLAST analizom i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama u GenBank bazi podataka, koje su dalje korišćene za filogenetske analize. Identifikacija

tri izolata *T. harzianum* kompleksa dobijenih u ovim istraživanjima (KG10, T58 i T59) urađena je na Fakultetu za nauku i informatiku Univerziteta u Segedinu u Mađarskoj (Allaga et al., 2021).

Kao rezultat umnožavanja *tef-1 α* genskog regiona PCR metodom, korišćenjem EF1-728F/TEF1LLErev para prajmera, utvrđeno je prisustvo amplifikovanih fragmenata DNA očekivane veličine ~1200 bp kod ispitivanih izolata.

Analizom dobijene sekvence *tef-1 α* regiona izolata T54 zabeležena je nukleotidna sličnost od 99,67% i 99,01% sa sekvencama izolata vrste *T. atrobrunneum* izolovanih iz treseta i zemljišta u Kini (KX632628, odnosno KX632629) i od 98,78% sa sekvencama izolata vrste *T. atrobrunneum* izolovanih iz drvenastih biljaka (smrdljivo drvo, bor, bukva i cer) u Španiji (KJ665413, KJ665396 i KJ665381), Francuskoj (KJ665384) i Italiji (KJ665369).

Analizom nukleotidne sličnosti dobijene sekvence izolata T57 zabeležena je 100% sličnost sa sekvencama izolata vrste *T. simmonsii* izolovanih iz drvenastih biljaka (brest, leska i cer) u Austriji (KJ665707 i KJ665706) i Italiji (KJ665721).

Sekvenca izolata T52 je imala 100% nukleotidne sličnosti sa sekvencama izolata vrste *T. guizhouense* izolovanih iz drvenastih biljaka (javor, brest i grab) u Španiji (KJ665506) i Hrvatskoj (KJ665505 i KF134799), dok je za sekvencu izolata T10 zabeležena nukleotidna sličnost od 99,75% sa sekvencama izolata vrste *T. pholiotae* izolovanih iz supstrata jestive gljive *Pholiota adiopse* u Kini (ON649918, ON649919 i ON649920).

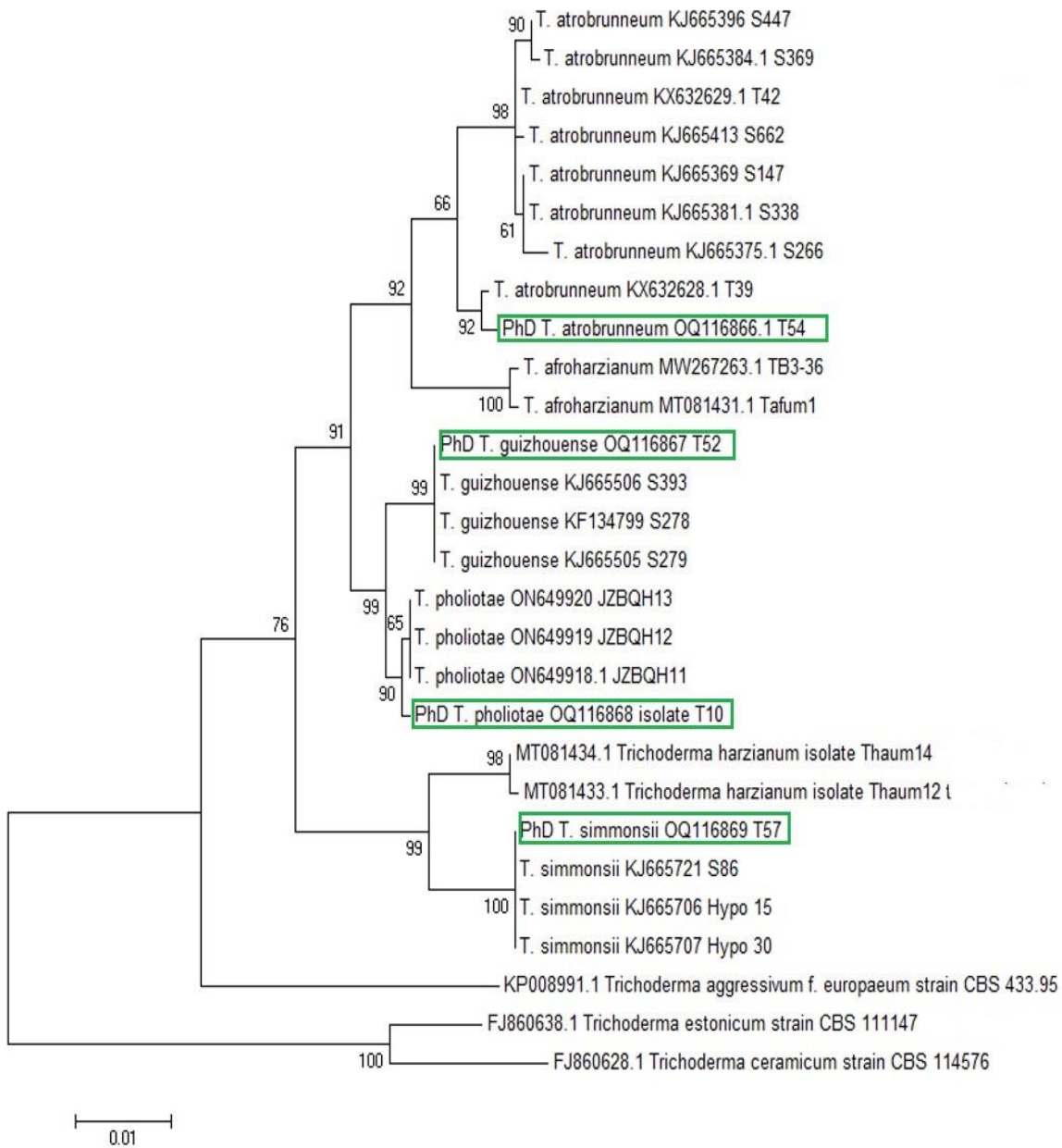
Na osnovu analize dobijenih sekvenci izdvojene su vrste u okviru *T. harzianum* kompleksa: *T. atrobrunneum* (T54), *T. simmonsii* (T57), *T. guizhouense* (T52) i *T. pholiotae* (T10). Izolat KG13 nije mogao biti identifikovan do nivoa vrste u okviru *T. harzianum* kompleksa, već je zadržao naziv *T. cf. harzianum*.

Pristupni brojevi sekvenci *tef-1 α* genskog regiona ispitivanih izolata u NCBI GenBank prikazani su u Tabeli 4. Identifikacija vrste *T. atrobrunneum* na šampinjonu predstavlja prvi nalaz u Srbiji, a vrsta *T. pholiotae* prvi nalaz u Evropi.

Filogenetska analiza odabranih izolata. Filogenetska analiza sprovedena je na osnovu sekvenci *tef-1 α* genskog regiona izolata iz *T. harzianum* kompleksa poreklom iz Srbije dobijenih u ovom radu (T57) i iz kolekcije Instituta za pesticide (T10, T52, T54). Dobijene sekvence uparene su sa 21 odabranom sekvencom vrsta iz *T. harzianum* kompleksa dostupnih u GenBank bazi podataka poreklom iz različitih delova sveta (Prilog 1; Tabela P1-1). Stablo je rekonstruisano primenom *Maximum Likelihood* (ML) metode i Kimura dvoparametarskog modela sa Gama distribucijom (K2+G). Kao *out* grupe korišćene su sekvence vrsta *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. estonicum* i *T. ceramicum*.

Analizom filogenetskog stabla, svi odabrani izolati su se grupisali u dva klastera. U okviru prvog klastera izdvojili su se *T. afroharzianum* i *T. atrobrunneum* izolati kao jedna grupa i *T. guizhouense* i *T. pholiotae* izolati kao druga grupa. U okviru drugog klastera grupisali su se u odvojene grane *T. simmonsii* i *T. harzianum* izolati.

Izolat T54 grupisao se sa izolatom iz Kine kao zasebna grana unutar grupe *T. atrobrunneum* u okviru prvog klastera. Izolat T52 grupisao se sa još tri izolata poreklom iz Španije i Hrvatske unutar grupe *T. guizhouense*, dok se izolat T10 izdvojio kao zasebna grana *T. pholiotae* unutar iste grupe sa još tri izolata poreklom iz Kine. Izolat T57 se grupisao unutar *T. simmonsii* grane u okviru drugog klastera sa još tri izolata poreklom iz Italije i Austrije. Na osnovu dobijenih rezultata među ispitivanim izolatima *T. harzianum* kompleksa, jasno su se izdvojile četiri vrste: *T. simmonsii* (T57), *T. atrobrunneum* (T54), *T. pholiotae* (T10) i *T. guizhouense* (T52). Filogenetsko stablo prikazano je na Slici 4.



Slika 4. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci *tef-1α* genskog regiona vrsta *T. harzianum* kompleksa u programu MEGA 5.0 korišćenjem *Maximum Likelihood* metode (ML) i primenom Kimura dvoparametarskog modela sa Gama distribucijom (K2+G). Na granama su označene *bootstrap* vrednosti. Izolati iz istraživanja su naznačeni.

Tabela 4. Pregled ispitivanih izolata, njihovo poreklo i pristupni brojevi

Oznaka izolata	Lokalitet	Supstrat (Domaćin)	Godina izolacije	Kolekcija	Vrsta	GenBank	
						ITS	<i>tef-1α</i>
SZMC 12454	Mađarska	Supstrat bukovače	2009 ¹⁾	US, Mađarska	<i>T. pleuroti</i>	MT876590 ¹⁾	/
SZMC 23033	Mađarska	Supstrat bukovače	2004 ²⁾	US, Mađarska	<i>T. pleuroticola</i>	EF392794 ²⁾	/
SZMC 24039 (T6)	Hrvatska	Supstrat bukovače	2011 ³⁾	US, Mađarska	<i>T. pleuroti</i>	MT876591 ³⁾	/
SZMC 24040 (T7)	Hrvatska	Supstrat bukovače	2011 ³⁾	US, Mađarska	<i>T. pleuroticola</i>	MT876592 ³⁾	/
T10	Požarevac, Srbija	Karpofofor šampinjona	2006 ⁴⁾	IPZŽS, Srbija	<i>T. pholiotae</i>	KC555182 ⁴⁾	OQ116868
T52	Zemun, Srbija	Karpofofor šampinjona	2008 ⁴⁾	IPZŽS, Srbija	<i>T. guizhouense</i>	KC555177 ⁴⁾	OQ116867
T54	Kula, Srbija	Karpofofor šampinjona	2008 ⁴⁾	IPZŽS, Srbija	<i>T. atrobrunneum</i>	KC555183 ⁴⁾	OQ116866
T57	Ugrinovci, Srbija	Karpofofor šiitake	2008	IPZŽS, Srbija	<i>T. simmonsii</i>	MT876593 ⁶⁾	OQ116869
T58	Ugrinovci, Srbija	Karpofofor šiitake	2008	IPZŽS, Srbija	<i>T. guizhouense</i>	MT876594 ⁶⁾	MZ773439 ⁵⁾
T59	Ugrinovci, Srbija	Karpofofor šiitake	2008	IPZŽS, Srbija	<i>T. guizhouense</i>	MT876595 ⁶⁾	MZ773438 ⁵⁾
T76	Lisovići, Srbija	Supstrat šampinjona	2010 ⁴⁾	IPZŽS, Srbija	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	KC555185 ⁴⁾	/
T77	Lisovići, Srbija	Supstrat šampinjona	2010 ⁴⁾	IPZŽS, Srbija	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	KC555186 ⁴⁾	/
T85	Lisovići, Srbija	Supstrat šampinjona	2010 ⁴⁾	IPZŽS, Srbija	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	KC555184 ⁴⁾	/
KG6	Kragujevac, Srbija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroticola</i>	MT876581 ⁶⁾	/
KG10	Kragujevac, Srbija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. afroharzianum</i>	MT876582 ⁶⁾	MZ773435 ⁵⁾
KG13	Kragujevac, Srbija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. cf. harzianum</i>	MT876583 ⁶⁾	/
KM4	Kavadarci, S. Makedonija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroticola</i>	MT876584 ⁶⁾	/
KM5	Kavadarci, S. Makedonija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroticola</i>	MT876585 ⁶⁾	/
KM6	Kavadarci, S. Makedonija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroti</i>	MT876586 ⁶⁾	/
KM8	Kavadarci, S. Makedonija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroti</i>	MT876587 ⁶⁾	/
KM11	Kavadarci, S. Makedonija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroti</i>	MT876588 ⁶⁾	/
KM12	Kavadarci, S. Makedonija	Supstrat bukovače	2018	IPZŽS, Srbija	<i>T. pleuroticola</i>	MT876589 ⁶⁾	/

¹⁾ Urbán (2012); ²⁾ Hatvani et al. (2007); Komoń-Zelazowska et al. (2007); ³⁾ Hatvani et al. (2012); ⁴⁾ Kosanović et al. (2013); ⁵⁾ Allaga et al. (2021); ⁶⁾ Luković et al. (2021);
 US – Univerzitet u Segedinu; IPZŽS – Institut za pesticide i zaštitu životne sredine

5.4. Morfološke karakteristike izolata *Trichoderma* spp.

Svi ispitivani izolati izolovani iz karpofora šiitake i supstrata zasejanog bukovačom su tokom prva tri dana inkubacije na PDA podlozi obrazovali belu vazdušastu miceliju, koja je kasnije postala zelena kao rezultat sporulacije. Tokom sporulacije koja je praćena do petog dana na PDA podlozi pri temperaturi od 20°C, svi izolati su obrazovali zelene elipsaste ili loptaste konidije, glatkih zidova na fjalidama.

Izolati vrste *T. pleuroti* (KM6, KM8 i KM11) su tokom prva tri dana inkubacije na PDA podlozi obrazovali belu vazdušastu miceliju i koloniju pravilnog oboda. Već drugog dana je kolonija ispunila Petri kutiju. Nije zabeležena promena boje podloge, ali jeste prisustvo prijatnog i slatkastog mirisa kolonije. Pojava svetlozelenih konidija zabeležena je četvrtog dana. Sporulacija je bila intenzivnija na ivici kutije, a takođe su zabeležene slabo izražene koncentrične zone. Boja konidija je starenjem postajala tamnija. Obrazovane konidije bile su loptastog do blago elipsastog oblika sa prosečnim dimenzijama $(1,8) - 2,7 - (5,4) \times (1,7) - 2,6 - (5,1) \mu\text{m}$. Dimenzije konidija svih izolata ove vrste prikazane su Tabeli 5.

Izolati vrste *T. pleurotica* (KM4, KM5, KM12 i KG6) su takođe tokom prva tri dana inkubacije na PDA podlozi obrazovali belu vazdušastu miceliju i koloniju pravilnog oboda. Kolonija je nakon 48 h ispunila Petri kutiju i prouzrokovala promenu boje podloge u svetložutu. Zabeležen je prijatan slatkasti miris kolonije. Sporulacija je zabeležena trećeg (KG6) i petog (KM5 i KM12) dana sa jačim intenzitetom na ivici kutije i slabo izraženim koncentričnim zonama. Boja konidija je starenjem postajala tamnija. Obrazovane konidije bile su loptastog do blago elipsastog oblika i prosečnih dimenzija $(1,8) - 3,0 - (5,4) \times (1,7) - 2,9 - (5,4) \mu\text{m}$. U Tabeli 5 prikazane su dimenzije konidija svih izolata ove vrste.

Izolati *T. harzianum* kompleksa sa šiitake (T57, T58 i T59) su na PDA podlozi tokom prvih 48 h obrazovali belu vazdušastu miceliju i kolonije pravilnog oboda. Sporulacija za T58 i T59 (vrsta *T. giuzhouense*) izolate zabeležena je nakon 48 h, dok je za izolat T57 (vrsta *T. simmonsii*) zabeležena nakon 72 h. Zabeležene su koncentrične zone i promena boje konidija iz svetlozelene u tamnozelenu. Obrazovane konidije bile su elipsastog oblika i prosečnih dimenzija $(2,1) - 3,0 - (3,6) \times (1,9) - 2,7 - (4,1) \mu\text{m}$. Prosečne dimenzije za vrstu *T. simmonsii* (T57) bile su $(2,6) - 3,3 - (3,6) \times (1,9) - 2,9 - (4,1) \mu\text{m}$ (odnos širine i dužine=1,1), dok su za vrstu *T. giuzhouense* (T58 i T59) bile $(2,3) - 2,9 - (3,6) \times (1,9) - 2,6 - (3,5) \mu\text{m}$ (odnos širine i dužine = 1,1). Nije zabeleženo da kolonije izolata dovode do promena boje podloge, kao ni karakterističan slatkasti miris kolonije.

Izolati *T. harzianum* kompleksa sa bukovače (KG10 i KG13) su takođe na PDA podlozi tokom prvih 48 h obrazovali belu vazdušastu miceliju i koloniju pravilnog oboda. Intenzivnija sporulacija zabeležena je nakon 72 h u koncentričnim zonama. Boja konidija je vremenom postajala tamnija, a zabeležena je i promena boje podloge u svetložutu (KG10) i tamnožutu (KG13). Obrazovane konidije bile su elipsastog oblika i prosečnih dimenzija $(2,4) - 3,2 - (4,4) \times (2,1) - 2,9 - (4,5) \mu\text{m}$. Izolat KG13 (vrsta *T. cf. harzianum*) obrazovao je konidije elipsastog oblika sa prosečnim dimenzijama $(2,6) - 3,3 - (4,4) \times (2,1) - 3,0 - (4,5) \mu\text{m}$ (odnos širine i dužine = 1,1), dok je izolat KG10 (vrsta *T. afroharzianum*) obrazovao konidije prosečnih dimenzija $(2,4) - 3,0 - (4,0) \times (2,2) - 2,9 - (3,9) \mu\text{m}$ (odnos širine i dužine = 1,0). Prijatan slatkasti miris zabeležen je za oba izolata, a nešto jači bio je kod izolata KG13.

Dimenzije svih izolata i vrsta iz *T. harzianum* kompleksa prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Dimenzije konidija *Trichoderma* spp. izolata

Vrsta	Izolat	Dimenzije konidija izolata (dužina × širina) ¹ (μm)	Odnos dužina/širina konidija izolata ¹ (μm)	Dimenzije konidija vrste (dužina × širina) ² (μm)	Odnos dužina/širina konidija vrste ² (μm)
<i>T. simmonsii</i>	T57	(2,6)-3,3-(3,6) × (1,9)-2,9-(4,1)	(1,4)-1,3 -(0,9)	(2,6)-3,3-(3,6) × (1,9)-2,9-(4,1)	(1,4)-1,1-(0,9)
<i>T. guizhouense</i>	T58	(2,1)-2,7-(3,6) × (1,9)-2,6-(3,7)	(1,1)-1,1-(1,0)	(2,3)-2,9-(3,6) × (1,9)-2,6-(3,5)	(1,1)-1,1-(1,0)
	T59	(2,4)-3,0-(3,6) × (2,0)-2,6-(3,6)	(1,2)-1,2-(1,1)		
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	(2,6)-3,3-(4,4) × (2,1)-3,0-(4,5)	(1,3)-1,1-(1,0)	(2,6)-3,3-(4,4) × (2,1)-3,0-(4,5)	(1,3)-1,1-(1,0)
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	(2,4)-3,0-(4,0) × (2,2)-2,9-(3,9)	(1,1)-1,0-(1,0)	(2,4)-3,0-(4,0) × (2,2)-2,9-(3,9)	(1,2)-1,1-(1,0)
<i>T. pleurotica</i>	KG6	(1,8)-2,6-(3,2) × (1,8)-2,3-(4,2)	(1,0)-1,1-(0,8)	(1,8)-3,0-(5,4) × (1,7)-2,9-(5,4)	(1,1)-1,0-(1,0)
	KM4	(1,8)-2,9-(3,9) × (1,7)-2,8-(3,9)	(1,1)-1,0-(1,1)		
	KM5	(2,1)-2,7-(3,4) × (2,1)-2,7-(3,4)	(1,0)-1,0-(1,0)		
	KM12	(2,1)-2,7-(3,6) × (2,0)-2,8-(3,3)	(1,0)-1,0-(1,1)		
	T7	(2,4)-3,1-(4,0) × (2,1)-2,9-(3,7)	(1,2)-1,1-(1,1)		
	23033	(2,2)-3,3-(5,4) × (2,4)-3,0-(5,1)	(0,9)-1,1-(1,1)		
<i>T. pleuroti</i>	KM6	(1,8)-2,5-(3,3) × (1,8)-2,3-(3,1)	(1,0)-1,1-(1,1)		
	KM8	(2,4)-2,7-(3,5) × (1,9)-2,5-(3,2)	(1,3)-1,1-(1,2)	(1,8)-2,7-(5,4) × (1,7)-2,6-(5,1)	(1,1)-1,1-(1,1)
	KM11	(2,2)-2,9-(3,5) × (1,7)-2,5-(3,0)	(1,3)-1,2-(1,2)		
	T6	(2,4)-3,8-(5,4) × (2,6)-3,7-(5,4)	(0,9)-1,0-(1,0)		
	12454	(2,0)-2,9-(4,7) × (1,9)-2,6-(4,7)	(1,0)-1,1-(1,3)		

¹ Srednja vrednost i opseg za dimenzije konidija i odnos dužina/širina konidija (50 merenja po izolatu), opseg je dat u zagradama; ² Srednja vrednost i opseg za dimenzije konidija i odnos dužina/širina konidija za vrstu

5.4.1. Brzina porasta kolonije izolata *Trichoderma* spp.

Stopa rasta kolonije izolata *Trichoderma* spp. gajenih na PDA pri temperaturi od 22°C izračunata je po satu i danu (Tabela 6). Najbrži porast među ispitivanim izolatima zabeležen je kod *T. pleurotica* KM5 izolata sa bukovače (0,88 mm/h, odnosno 21,5 mm/dan), dok je najsporiji porast zabeležen kod *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 izolata sa šampinjona (0,48 mm/h, odnosno 11,42 mm/dan). Najsporiji porast među izolatima sa bukovače je zabeležen kod *T. pleurotica* T7 izolata (14,58 mm/dan), dok je kod izolata sa šampinjona najbrži porast zabeležen kod *T. pholiotae* T10 izolata (14,67 mm/dan). Izolat *T. simmonsii* T57 je imao najbrži porast među izolatima sa šiitake (17,83 mm/dan), dok je *T. guizhouense* T58 najsporije rastao (14,67 mm/dan). Između vrsta su zabeležene statistički značajne razlike u brzini porasta (Tabela 6), pa je tako vrsta *T. pleuroti* imala najbrži porast (0,83 mm/h, odnosno 19,27 mm/dan), dok je vrsta *T. atrobrunneum* imala najsporiji porast (0,50 mm/h, odnosno 12 mm/dan).

Tabela 6. Stopa rasta *Trichoderma* spp. izolata gajenih na PDA podlozi pri 22°C

Vrsta	Poreklo izolata	Izolat	Stopa rasta izolata pri 22°C (mm/h) ± SD ¹	Stopa rasta vrste pri 22°C (mm/h) ± SD ¹	Stopa rasta izolata pri 22°C (mm/dan) ± SD ²	Stopa rasta vrste pri 22°C (mm/dan) ± SD ²
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Šampinjon	T76	0,59±0,02 ^j		14,08±0,42 ^j	
		T77	0,48±0,01 ^l	0,56±0,08 ^{de}	11,42±0,17 ^l	13,50±1,90 ^{de}
		T85	0,63±0,01 ⁱ		15,00±0,27 ⁱ	
<i>T. atrobrunneum</i>		T54	0,50±0,01 ^k	0,50±0,00 ^e	12,00±0,27 ^k	12,00±0,00 ^e
<i>T. pholiotae</i>		T10	0,61±0,00 ⁱ	0,61±0,00 ^{cd}	14,67±0,00 ⁱ	14,67±0,00 ^{cd}
<i>T. guizhouense</i>	Šiitake	T52	0,58±0,01 ^j	0,63±0,07 ^{cd}	14,00±0,27 ^j	15,23±1,60 ^{cd}
		T58	0,61±0,02 ⁱ		14,67±0,38 ⁱ	
		T59	0,73±0,01 ^{ef}		17,58±0,32 ^{ef}	
<i>T. simmonsii</i>		T57	0,74±0,01 ^{de}	0,74±0,00 ^{ab}	17,83±0,19 ^{de}	17,83±0,00 ^{ab}
<i>T. afroharzianum</i>	Bukovača	KG10	0,71±0,01 ^{efg}	0,71±0,00 ^{bc}	17,08±0,16 ^{efg}	17,08±0,00 ^{bc}
<i>T. cf. harzianum</i>		KG13	0,72±0,02 ^{fg}	0,72±0,00 ^{abc}	17,33±0,17 ^{fg}	17,33±0,00 ^{abc}
<i>T. pleurotica</i>		KG6	0,76±0,01 ^d	0,75±0,10 ^{ab}	18,25±0,17 ^d	18,50±2,30 ^{ab}
		KM4	0,68±0,02 ^h		16,25±0,50 ^h	
		KM5	0,88±0,01 ^a		21,25±0,17 ^a	
		KM12	0,86±0,01 ^b		20,58±0,17 ^b	
		T7	0,61±0,03 ⁱ		14,58±0,83 ⁱ	
<i>T. pleuroti</i>		23033	0,71±0,02 ^g		17,08±0,50 ^g	
		KM6	0,87±0,03 ^{ab}	0,83±0,08 ^a	20,92±0,69 ^{ab}	19,27±2,00 ^a
		KM8	0,74±0,00 ^{de}		17,67±0,00 ^{de}	
		KM11	0,85±0,01 ^b		20,41±0,17 ^b	
		T6	0,76±0,00 ^d		18,33±0,00 ^d	
		12454	0,83±0,01 ^c		19,92±0,32 ^c	

¹Srednja vrednost četiri ponavljanja za jedan h ± SD, standardna devijacija vrednosti;

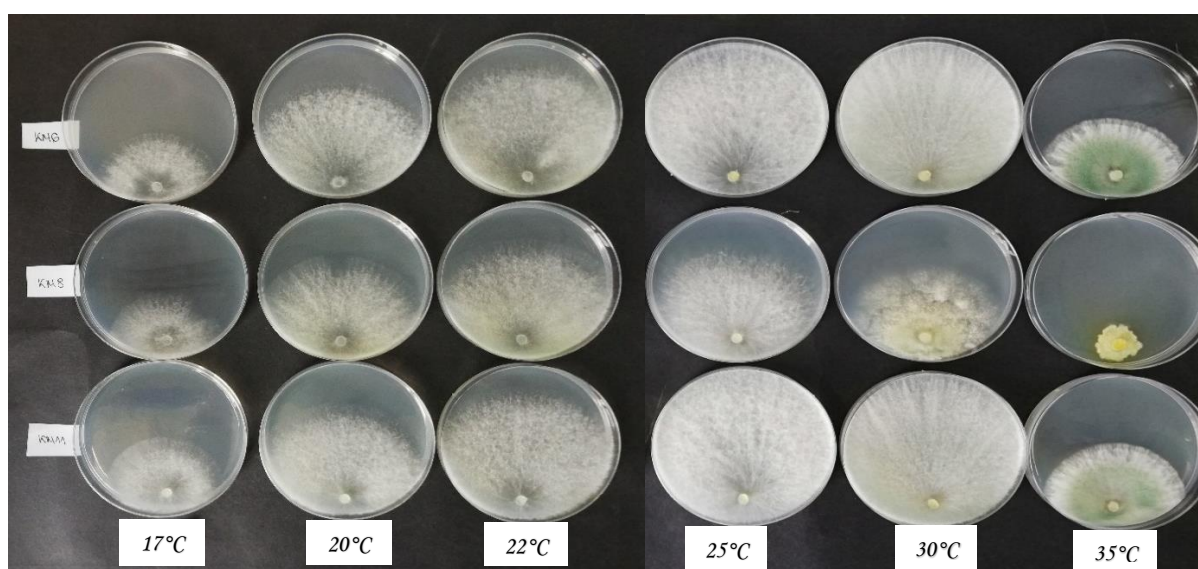
²Srednja vrednost četiri ponavljanja za 24 h ± SD, standardna devijacija vrednosti;

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k Izolati sa istim slovima statistički se značajno ne razlikuju ($P < 0,05$)

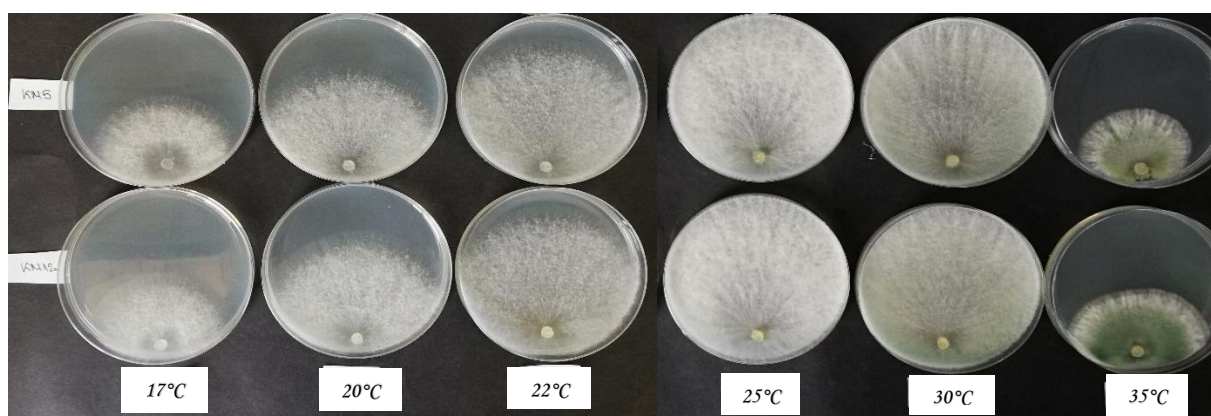
5.5. Ekološke karakteristike izolata *Trichoderma* spp.

Uticaj temperature na brzinu porasta kolonije izolata *Trichoderma* vrsta izolovanih u gajilištima bukovače i šitake ispitan je na PDA podlozi nakon 72 h pri temperaturama od 17, 20, 22, 25, 30 i 35°C. Mereni su prečnici kolonija i dobijene vrednosti su statistički obrađene dvofaktorskom analizom varijanse. U ispitivanja je bilo uključeno ukupno 16 izolata (12 izolata dobijenih u ovim istraživanjima i četiri izolata iz kolekcije Univerziteta u Segedinu). Izolati su postavljeni u četiri ponavljanja, tako da je ukupan broj podataka iznosio 384 (6×16×4).

Zabeležene su statistički značajne razlike u srednjim vrednostima prečnika kolonija na različitim temperaturama (Tabela 7). Najmanji prosečni porast svih izolata bio je pri 17°C, a najveći pri 25 i 30°C. Optimalna temperatura za rast *T. afroharzianum*, *T. simmonsii* i *T. guizhouense* izolata sa šitake (Slika 7) i bukovače, kao i *T. pleuroti* (Slika 5) izolata sa bukovače iznosila je 30°C, dok je za izolate *T. pleurotica* (Slika 6) optimalna temperatura bila 25°C. Najmanja srednja vrednost za izolate *T. harzianum* kompleksa sa šitake zabeležena je za izolat *T. guizhouense* T59 pri 17°C (32,5 mm), a najveća za *T. simmonsii* T57 pri 30°C (140 mm). Najmanja srednja vrednost za izolate sa bukovače zabeležena je za izolat *T. pleuroti* KM8 pri 35°C (23,5 mm), a najveća za *T. pleurotica* KM5 pri 30°C (141 mm).



Slika 5. Izgled kolonije *T. pleuroti* (KM6, KM8 i KM11) pri 17, 20, 22, 25, 30 i 35°C na PDA nakon 72 h inkubacije



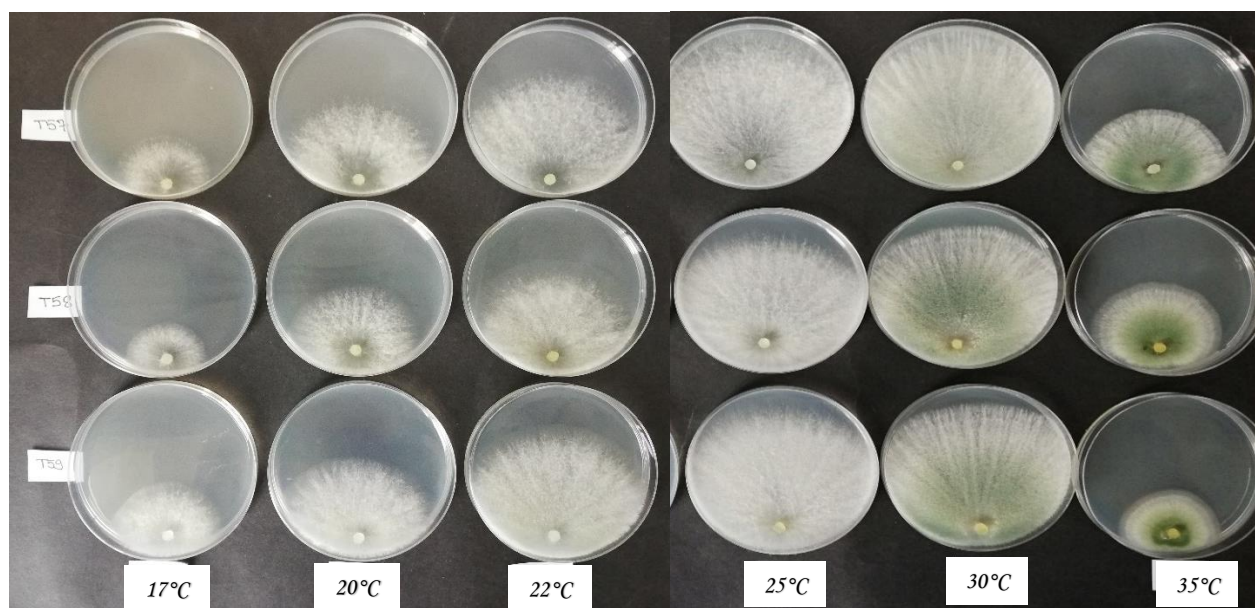
Slika 6. Izgled kolonije *T. pleurotica* (KM5 i KM11) pri 17, 20, 22, 25, 30 i 35°C na PDA nakon 72 h inkubacije

Tabela 7. Uticaj temperature na porast kolonije *Trichoderma* spp. izolata izolovanih iz gajilišta bukovače i šiitake na PDA nakon 72 h inkubacije

Vrsta	Izolat	Prečnik kolonije \pm SD (mm) ¹					
		17°C	20°C	22°C	25°C	30°C	35°C
<i>T. simmonsii</i>	T57*	47,00 \pm 0,50 ^f	74,00 \pm 1,41 ^d	107,00 \pm 0,58 ^c	132,50 \pm 1,41 ^b	140,00 \pm 0,00 ^a	55,50 \pm 7,78 ^e
<i>T. guizhouense</i>	T58*	33,00 \pm 0,71 ^d	63,00 \pm 2,12 ^c	88,00 \pm 1,15 ^b	122,00 \pm 0,00 ^a	120,50 \pm 1,41 ^a	65,00 \pm 1,41 ^c
	T59*	32,50 \pm 0,71 ^e	78,00 \pm 0,71 ^c	105,50 \pm 0,96 ^b	129,00 \pm 0,00 ^a	128,00 \pm 0,00 ^a	46,00 \pm 3,54 ^d
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	35,00 \pm 0,41 ^e	80,00 \pm 0,00 ^c	102,50 \pm 0,50 ^b	131,50 \pm 0,71 ^a	134,00 \pm 2,83 ^a	64,00 \pm 2,83 ^d
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	30,50 \pm 0,71 ^e	80,00 \pm 0,00 ^c	104,00 \pm 1,15 ^b	133,50 \pm 0,00 ^a	138,00 \pm 1,41 ^a	71,00 \pm 2,12 ^d
<i>T. pleurotica</i>	KG6	46,50 \pm 1,41 ^f	83,50 \pm 1,41 ^d	109,50 \pm 0,50 ^b	133,00 \pm 0,71 ^b	138,50 \pm 2,12 ^a	67,00 \pm 3,54 ^e
	KM4	39,50 \pm 0,71 ^e	76,50 \pm 0,71 ^d	97,50 \pm 1,50 ^c	123,50 \pm 0,71 ^b	133,00 \pm 0,71 ^a	28,50 \pm 2,12 ^f
	KM5	50,00 \pm 0,00 ^d	100,00 \pm 0,00 ^c	127,50 \pm 0,50 ^b	139,50 \pm 0,71 ^a	140,50 \pm 0,71 ^a	46,50 \pm 3,54 ^e
	KM12	48,00 \pm 0,71 ^e	100,00 \pm 0,00 ^c	123,50 \pm 0,50 ^b	140,00 \pm 0,00 ^a	140,00 \pm 0,00 ^a	61,00 \pm 4,24 ^d
	T7	38,50 \pm 2,12 ^e	66,50 \pm 2,12 ^d	87,50 \pm 2,50 ^b	105,00 \pm 0,71 ^a	77,50 \pm 0,00 ^c	25,00 \pm 3,54 ^f
	23033	34,00 \pm 3,54 ^e	83,00 \pm 2,83 ^c	102,50 \pm 1,50 ^b	123,50 \pm 1,41 ^a	121,50 \pm 2,83 ^a	53,00 \pm 4,24 ^d
<i>T. pleuroti</i>	KM6	42,50 \pm 0,71 ^e	104,50 \pm 0,00 ^d	123,50 \pm 2,06 ^b	139,50 \pm 0,00 ^a	140,00 \pm 0,00 ^a	62,00 \pm 0,00 ^d
	KM8	41,00 \pm 0,71 ^e	90,50 \pm 0,00 ^c	106,00 \pm 0,00 ^b	114,00 \pm 1,41 ^a	82,00 \pm 0,71 ^d	23,50 \pm 0,71 ^f
	KM11	49,50 \pm 0,00 ^e	99,00 \pm 0,00 ^c	122,50 \pm 0,50 ^b	139,50 \pm 0,00 ^a	140,00 \pm 0,00 ^a	67,50 \pm 0,71 ^d
	T6	37,50 \pm 0,00 ^e	88,00 \pm 0,71 ^c	110,00 \pm 0,00 ^b	137,50 \pm 2,12 ^a	134,50 \pm 1,41 ^a	69,00 \pm 3,54 ^d
	12454	45,50 \pm 0,00 ^e	98,50 \pm 2,12 ^c	119,50 \pm 0,96 ^b	135,50 \pm 0,00 ^a	141,00 \pm 0,00 ^a	63,50 \pm 6,36 ^d

¹Srednja vrednost četiri ponavljanja \pm SD, standardna devijacija vrednosti; ^{a, b, c, d, e, f} Izolati označeni istim slovima statistički se značajno ne razlikuju ($P < 0,05$);

* Izolati izolavani iz gajilišta šiitake



Slika 7. Izgled kolonije *T. simmonsii* (T57) i *T. guizhouense* (T58 i T59) pri 17, 20, 22, 25, 30 i 35°C na PDA nakon 72 h inkubacije

5.6. Virulentnost izolata *Trichoderma* spp.

Četiri dana od inokulacije gornje strane šešira bukovače i šiitake, svi testirani izolati različitih vrsta *Trichoderma* sa bukovače (*T. cf. harzianum* KG13, *T. afroharzianum* KG10, *T. pleuroticola* KG6, KM4, KM5, KM12, T7, 23033 i *T. pleuroti* KM6, KM8, KM11, T6, 12454) su pokazali slabu virulentnost (0 ili 1 na skali od 0 do 5), dok su testirani izolati vrsta *T. harzianum* kompleksa sa šiitake (*T. simmonsii* T57 i *T. guizhouense* T58, T59) pokazali visoku virulentnost (5 na skali 0 do 5). Na šeširima tretiranim sterilnom vodom (negativne kontrole), nisu zabeležene nikakve promene i simptomi (Tabela 8).

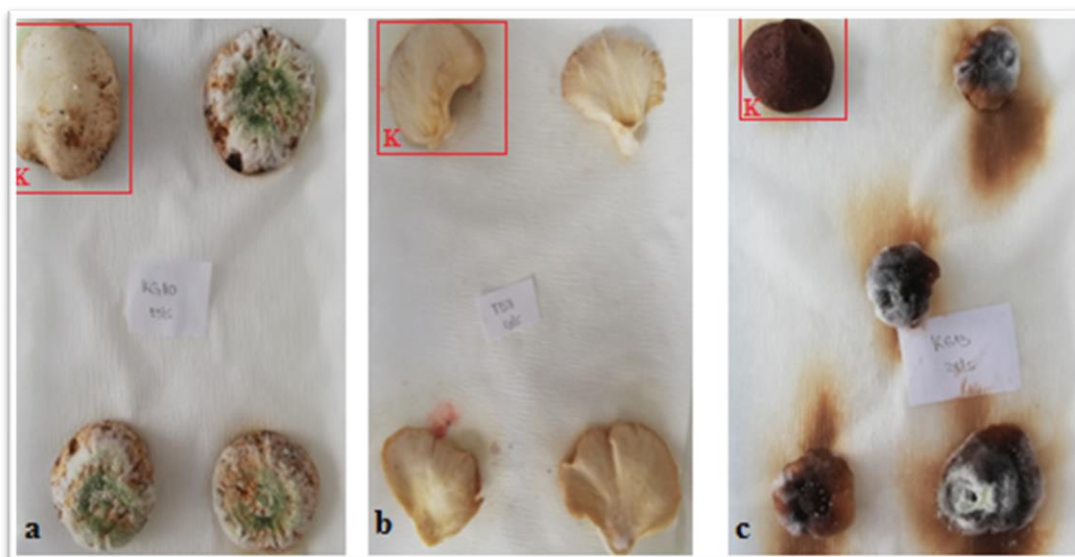
Tabela 8. Virulentnost izolata *Trichoderma* spp. prema domaćinu iz kog su izolovani

Vrsta	Domaćin	Izolat	Virulentnost ¹
<i>T. simmonsii</i>	Šiitake	T57	5
<i>T. guizhouense</i>		T58	5
		T59	5
<i>T. afroharzianum</i>	Bukovača	KG10	0
<i>T. cf. harzianum</i>		KG13	0
<i>T. pleuroticola</i>		KG6	1
		KM4	0
		KM5	0
		KM12	0
		T7	0
		23033	0
<i>T. pleuroti</i>		KM6	0
		KM8	0
	KM11	0	
	T6	0	
	12454	1	

¹ Skala za ocenjivanje stepena virulentnosti je 0 – 5, 0 - bez simptoma i 5 - izraženi simptomi

Nakon četiri dana od inokulacije suspenzijom spora izolata spoljašnje strane šešira karpofore bukovače nije došlo do pojave simptoma zelene plesni (Slika 3) i jedino je bila uočljiva promena boje oko mesta inokulacije, osim kod izolata *T. pleuroti* SZMC 12454 i *T. pleurotica* KG6, kod kojih su uočeni mali smeđi prstenovi (prečnika 2 mm). Na šesirima šiitake svi izolati su obrazovali miceliju koja je u potpunosti prorasla karpofore šiitake, sporulisala i proširila se na filter papir (Slika 2).

Osim na domaćinima iz kojih su izolovani, virulentnost izolata *T. harzianum* kompleksa ispitana je i unakrsno na drugim jestivim gljivama domaćinima (Tabela 9). Inokulacija spoljašnje strane šešira karpofora šampinjona, bukovače i šiitake izolatima *T. harzianum* kompleksa izazvala je različite simptome. Svi testirani izolati poreklom sa bukovače i šiitake ispoljili su visoku virulentnost (5 na skali od 0 do 5) na šesirima šampinjona. Na svim testiranim šesirima šampinjona pojavili su se simptomi u vidu udubljenja i smeđeg prstena, uz prisustvo micelije i sporulacije (Slika 8a). Takođe, na šesirima šiitake izolati sa šampinjona ispoljili su visoku virulentnost (4 na skali od 0 do 5) u vidu pega, tamnih prstenova uz prisustvo micelije, dok su izolati poreklom sa bukovače bili virulentniji, posebno izolat *T. cf. harzianum* KG13 čija se micelija razvila i sporulisala van šešira šiitake na filter papiru (Slika 8c). Na šesirima bukovače svi izolati dobijeni sa šampinjona i šiitake ispoljili su slabu virulentnost (1 ili 2 na skali od 0 do 5) u vidu prisustva beličaste micelije oko mesta inokulacije (Slika 8b).



Slika 8. Izgled karpofora šampinjona (a), bukovače (b) i šiitake (c) pet dana od veštačke inokulacije spoljašnje strane šešira sporama izolata *T. harzianum* kompleksa: *T. afroharzianum* KG10 (a), *T. guizhouense* T58 (b) i *T. cf. harzianum* KG13 (c). Kontrole (K) su inokulisane sterilnom vodom.

Tabela 9. Virulentnost izolata vrsta iz *T. harzianum* kompleksa na različitim domaćinima

Vrsta	Domaćin	Izolat	Ocena virulentnosti za šampinjon ¹	Ocena virulentnosti za šiitake ¹	Ocena virulentnosti za bukovaču ¹
<i>T. pholiotae</i>	Šampinjon	T10	4*	5	1
<i>T. guizhouense</i>		T52	3*	4	2
<i>T. atrobrunneum</i>		T54	5*	5	2
<i>T. simmonsii</i>	Šiitake	T57	5	5	1
<i>T. guizhouense</i>		T58	5	5	2
		T59	5	5	1
<i>T. afroharzianum</i>	Bukovača	KG10	5	5	0
<i>T. cf. harzianum</i>		KG13	5	5	0

¹ Skala za ocenjivanje stepena virulentnosti je 0 – 5, 0 - bez simptoma i 5 - izraženi simptomi; *Kosanović, 2013

5.7. Hemijski sastav etarskih ulja

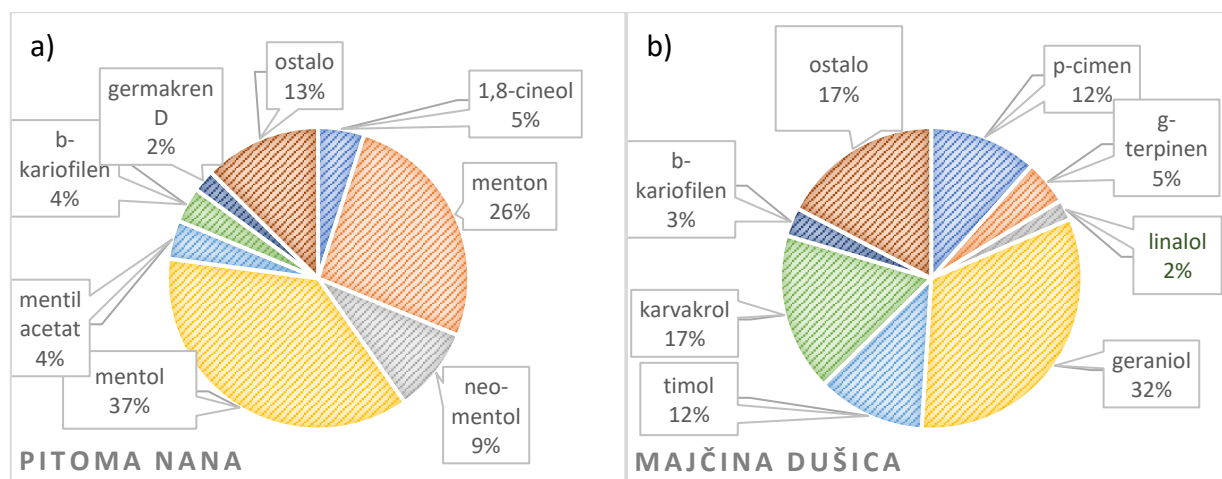
Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize hemijskog sastava etarskih ulja primenom GC-FID i GC-MS tehnika poreklom iz 11 lekovitih i aromatičnih biljnih vrsta iz Srbije: *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Thymus serpyllum*, *Abies alba*, *Thuja orientalis*, *Pinus sylvestris*, *Juniper communis*, *Achillea millefolium*, *Hypericum perforatum* i *Anethum graveolens*. Rezultati kvantitativne i kvalitativne analize hemijskog sastava etarskih ulja primenom GC-FID i GC-MS tehnika poreklom iz 11 lekovitih i aromatičnih biljnih vrsta iz Srbije: *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Thymus serpyllum*, *Abies alba*, *Thuja orientalis*, *Pinus sylvestris*, *Juniper communis*, *Achillea millefolium*, *Hypericum perforatum* i *Anethum graveolens*, prikazani su u priložima (Prilog 2; Tabele P2-1 – P2-4).

5.7.1. Etarska ulja majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka

Kompletni sastavi i prinosi odabranih etarskih ulja četiri biljke iz familije Lamiaceae (majčina dušica, pitoma nana, divlja nana i bosiljak) prikazani su u Prilogu 2 (Tabela P2-1). Najveći prinos etarskog ulja zabeležen je kod majčine dušice (1,80% v/w), a najmanji kod divlje nane (1,02% v/w).

Glavne komponente etarskog ulja dobijenog iz lista i cveta majčine dušice su monoterpeni: geraniol (32,43%), fenoli karvakrol (16,97%) i timol (11,59%) i monoterpeni ugljovodonik *p*-cimen (11,58%) (Grafikon 1b). Ukupno je identifikovana 41 komponenta. Najveći deo ulja se sastoji od monoterpena (ugljovodonici - 21,08%, oksidovani monoterpeni - 39,54%), a zatim slede fenoli (28,56%), seskviterpeni ugljovodonici (9,17%), oksidovani seskviterpeni (0,57%) i ostala jedinjenja (alkoholi-1,01%).

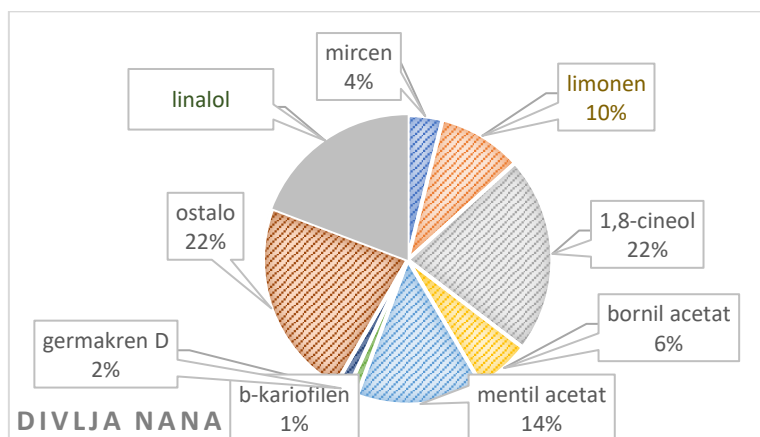
Dominantne komponente etarskog ulja dobijenog iz lista i cveta pitome nane su mentol (36,80%) i menton (26,21%) (Grafikon 1a). Ukupno je identifikovano 48 komponenti. Ubedljivo najzastupljeniji u ovom ulju su oksidovani monoterpeni (86,29%). Seskviterpeni ugljovodonika ima 7,43%, monoterpeni ugljovodonika 2,73%, oksidovani seskviterpeni 1,33%, dok sva ostala jedinjenja čine 1,69% od ukupno identifikovanih komponenti.



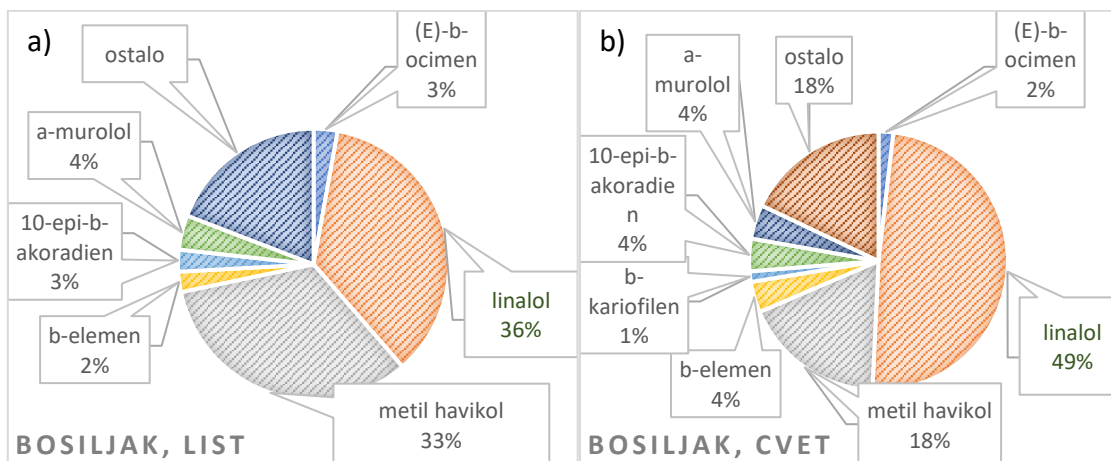
Grafikon 1. Udeo dominantnih komponenti etarskih ulja pitome nane (a) i majčine dušice (b)

Etarsko ulje izdvojeno iz listova i cvetova divlje nane, najbogatije je u sadržaju 1,8-cineola (22,05%), linalola (19,23%) i mentil acetata (14,21%) kao oksidovanih monoterpena, i limonena (9,42%) kao monoterpenog ugljovodonika (Grafikon 2). Ukupno su identifikovane 43 komponente. Uopšteno gledano, monoterpeni su najzastupljeniji (ugljovodonici - 26,21%, oksidovani monoterpeni - 68,21%), dok seskviterpeni ugljovodonici i oksidovani seskviterpeni zauzimaju 3,79 odnosno 0,26%. Preostalih 1,07% identifikovanih komponenti zauzimaju alkohol 2-oktanol i keton 2-tridekanon.

Etarsko ulje izdvojeno iz lista bosiljka je najbogatije u sadržaju linalola (35,38%) i metil kavikola (32,92%) (Grafikon 3a). Generalno, ulje sadrži najviše oksidovanih monoterpena (41,06%) i fenilpropanoide (34,28%). Seskviterpenski ugljovodoniči čine 13,34%, oksidovani seskviterpeni 5,61%, monoterpenski ugljovodoniči 5,21%, dok alkohol 3E-heksanol čini svega 0,2% od ukupno identifikovanih komponenti. Dominantne komponente etarskog ulja izolovanog iz cveta bosiljka su linalol (48,90%) i metil kavikol (17,79%), takođe (Grafikon 3b). Oksidovani monoterpeni (54,10%) su najzastupljenija jedinjenja, a u odnosu na ulje izdvojeno iz listova, ovo ulje sadrži manje fenilpropanoide (18,33%). Sadržaji seskviterpenskih ugljovodoniča (17,73%), oksidovanih seskviterpena (6,85%) i monoterpenskih ugljovodoniča (3,23%) su slični. Ukupan broj identifikovanih komponenti u ulju izolovanom iz listova je 44, dok je u ulju izolovanom iz cvetova taj broj 48.



Grafikon 2. Udeo dominantnih komponenti etarskog ulja divlje nane



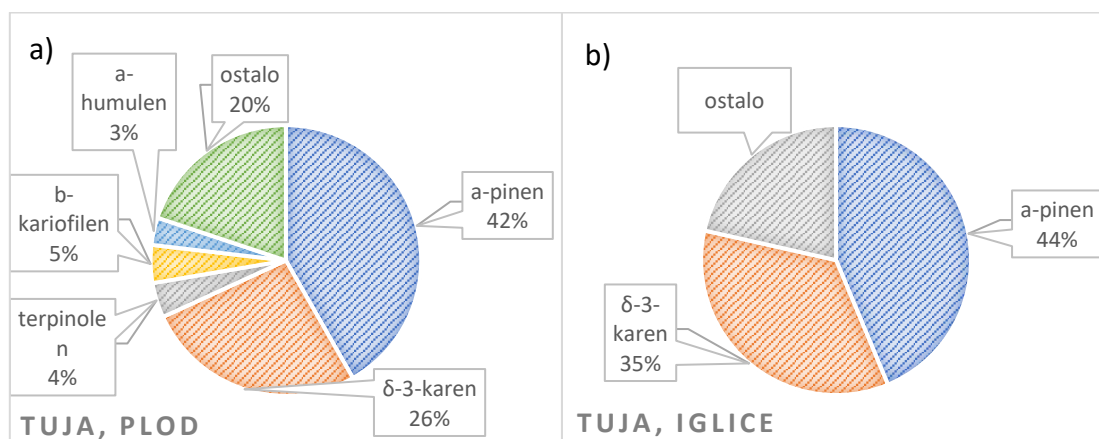
Grafikon 3. Udeo dominantnih komponenti etarskog ulja bosiljka izdvojenog iz lista (a) i cveta (b)

5.7.2. Etarska ulja tuje, kleke, jele i bora

Rezultati sastava i prinosa etarskih ulja četiri zimzelene biljke (tuja, kleka, jela i bor) prikazani su u Prilogu 2 (Tabela P2-2). Najveći prinos etarskog ulja zabeležen je kod kleke (1,52% v/w), a najmanji kod etarskog ulja jele (0,35% v/w).

U sastavu etarskog ulja tuje (iglice i plod) dominiraju monoterpenski ugljovodoniči α -pinen (41,75 odnosno 43,75%) i δ -3-karen (26,40 odnosno 34,83%) (Grafikon 4). Uopšteno posmatrano, monoterpenski ugljovodoniči dominiraju u oba etarska ulja (81,62% u ulju iglica i 93,86% u ulju ploda). Sa izuzetkom aldehida 2E-heksenala (prisutan u ulju iglica tuje), ostala jedinjenja iz oba ulja

tuje pripadaju seskviterpenskim ugljovodonicima (12,15% u ulju iglica i 3,41% u ulju ploda), oksidovanim monoterpenima (1,88 i 1,30%) i seskviterpenima (3,36 i 1,27%). Ukupan broj identifikovanih komponenti u ulju iglica tuje je 36, a u ulju ploda 33.

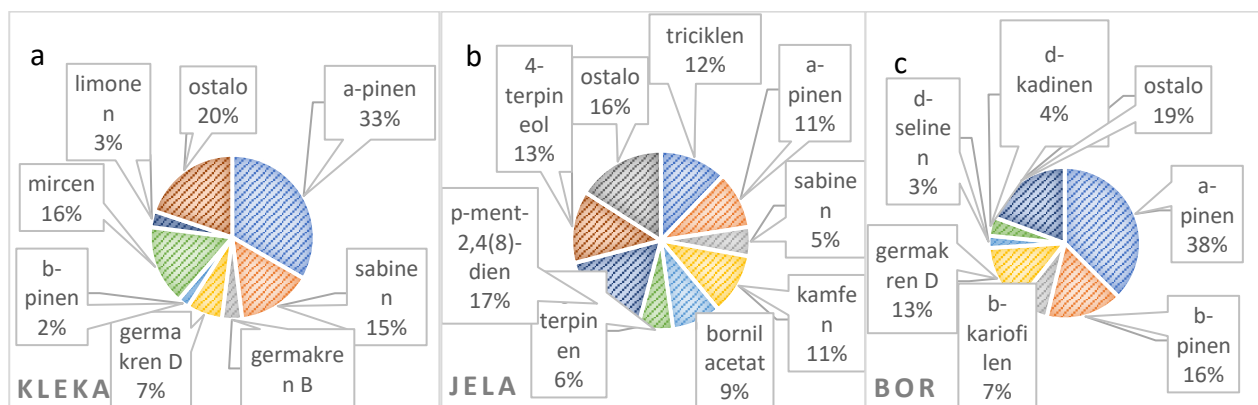


Grafikon 4. Udeo dominantnih komponenti etarskog ulja tuje izdvojenog iz ploda (a) i iglica (b)

Hemijska karakterizacija etarskog ulja ploda kleke ukazuje da su glavne komponente monoterpeni ugljovodonici α -pinen (32,06%), mircen (15,09%) i sabinen (14,20%) (Grafikon 5a). Ukupno je identifikovano 63 komponente u sastavu ulja. Monoterpeni ugljovodonici dominiraju sa 71,16%, dok 22,31% zauzimaju seskviterpeni ugljovodonici. Zatim slede oksidovani monoterpeni (3,55%) i seskviterpeni (1,42%), elemicin kao fenilpropanoid sa svega 0,08%, dok sva ostala jedinjenja čine 0,63% sadržaja ulja.

Etarsko ulje iglica jele najbogatije je u sadržaju p-menta-2,4(8)-diena (15,99%), triciklena (11,61%), kamfena (10,58%) i α -pinena (9,93%) kao monoterpenih ugljovodonika i terpinen-4-ola (12,5%), kao monoterpenskog alkohola (Grafikon 5b). Ukupno je identifikovano 36 komponenti. Generalno, u pomenutom etarskom ulju dominiraju monoterpeni (monoterpeni ugljovodonici - 72,98% i oksidovani monoterpeni - 25,18%), dok su seskviterpeni ugljovodonici, oksidovani seskviterpeni i ostala jedinjenja prisutna u sadržaju manjim od 1%.

Glavne komponente etarskog ulja iglica belog bora su monoterpeni ugljovodonici α -pinen (37,48%) i β -pinen (16,35%) i seskviterpeni ugljovodonik germakren D (13,35%) (Grafikon 5c). U sastavu ulja je identifikovano ukupno 47 komponenti. Monoterpeni (59,95%) i seskviterpeni (32,60%) dominiraju u ovom etarskom ulju, dok oksidovani monoterpeni i seskviterpeni čine 4,21 odnosno 2,88% od ukupnog sadržaja ulja.



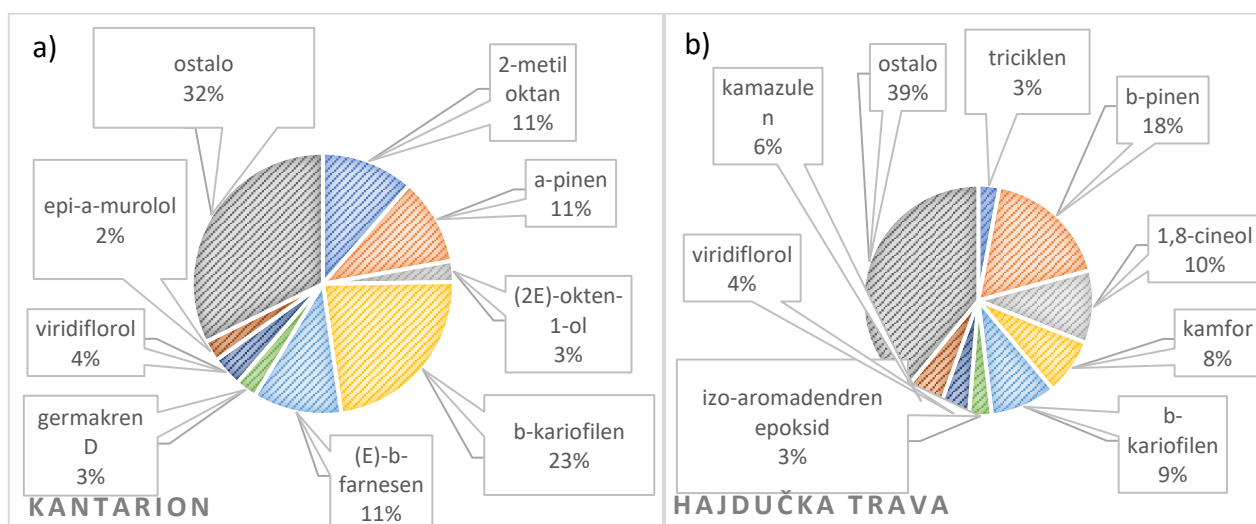
Grafikon 5. Udeo dominantnih komponenti etarskih ulja izdvojenih iz kleke (a), jele (b) i bora (c)

5.7.3. Etarska ulja kantariona i hajdučke trave

Kompletan sastav i prinos etarskih ulja izdvojenih iz kantariona i hajdučke trave prikazan je u Prilogu 2 (Tabela P2-3). Prinos etarskih ulja obe biljke je najmanji od svih 11 testiranih biljaka, posebno kantariona sa svega 0,08% v/w.

Dominantne komponente etarskog ulja izdvojenog iz listova i cvetova kantariona su β -kariofilen (22,97%), 2-metil oktan (11,44%), (E)- β -farnesen (10,96%) i α -pinen (10,74%) (Grafikon 6a). Ukupno je identifikovano 65 komponenti. Uopšteno posmatrano, najviše su zastupljeni seskviterpenski ugljovodonici (49,60%). Monoterpenski ugljovodonici čine 14,15% sadržaja ulja, oksidovani seskviterpeni 13,90%, oksidovani monoterpeni 1,58%, a ostala jedinjenja 20,69%.

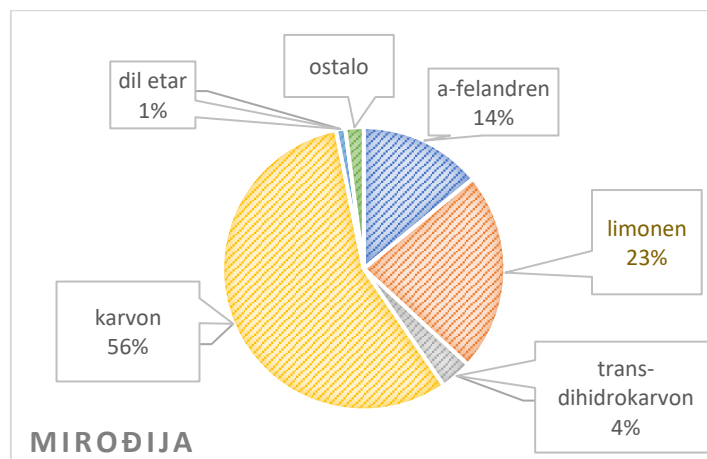
Etarsko ulje izdvojeno iz listova i cvetova hajdučke trave je najbogatije u sadržaju β -pinena (17,99%), 1,8-cineola (10,30%), β -kariofilena (9,33%) i kamfora (7,99%) (Grafikon 6b). U sastavu je ukupno identifikovana 81 komponenta. Monoterpenski ugljovodonici čine 30,90% sadržaja ulja, oksidovani monoterpeni 33,30%, seskviterpenski ugljovodonici 15,03%, oksidovani seskviterpeni 12,33%, oksidovani diterpeni (4,8,13-duvatrien-1,3-ol) 0,17%, fenoli (karvakrol) 0,05%, fenilpropanoidi (eugenol i metil eugenol) 0,65%, a sva ostala jedinjenja 6,88%, od kojih samo kamazulen 5,45%. Izdvojeno ulje je plave boje.



Grafikon 6. Udeo dominantnih komponenti etarskih ulja izdvojenih iz kantariona (a) i hajdučke trave (b)

5.7.4. Etarsko ulje mirodije

Kompletan kvantitativni i kvalitativni sastav etarskog ulja mirodije prikazan je u Prilogu 2 (Tabela P2-4). Prinos etarskog ulja izdvojenog iz listova i semena mirodije je najveći od svih 11 testiranih biljaka (2,02% v/w). Glavne komponente su monoterpeni karvon (56,40%), limonen (22,83%) i α -felandren (14,02%) (Grafikon 7). U sastavu ovog etarskog ulja ukupno je identifikovano 16 komponenti. Osim 2E-decenala (0,07%) kao alifatičnog aldehida, sve ostale identifikovane komponente čine monoterpeni (ugljovodonici - 37,96%, i oksidovani monoterpeni - 61,76%).



Grafikon 7. Udeo dominantnih komponenti etarskog ulja mirođije

5.8. Antifungalno delovanje etarskih ulja *in vitro*

Efekat antifungalnog delovanja 11 etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja iz Srbije ispitan je primenom različitih metoda. Primenom mikrodilucione metode izvršeno je preliminarno ispitivanje delovanja testiranih ulja na spore svih izolata *Trichoderma* spp. Primenom makrodilucione metode ispitan je efekat delovanja ulja na spore i miceliju vrsta roda *Trichoderma*: fumigantnom metodom zabeleženi su efekti delovanja gasovitom fazom na određene izolate (tri najagresivnije patogene vrste: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. pleuroti* i *T. pleuroticola* i tri vrste iz *T. harzianum* kompleksa sa sva tri domaćina: *T. cf. harzianum*, *T. guizhouense* i *T. atrobrunneum*), dok je primenom kontaktne metode potvrđen efekat delovanja testiranih ulja iz preliminarnih ispitivanja.

5.8.1. Antifungalno delovanje etarskih ulja majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka

In vitro efekat antifungalnog delovanja etarskih ulja četiri biljke iz familije Lamiaceae (majčina dušica, pitoma nana, divlja nana i bosiljak) određen je primenom mikrodilucione i makrodilucione fumigantne metode, pri čemu je ispitano kontaktno delovanje i delovanje gasovite faze odabranih ulja na izolate *Trichoderma* spp.

Efekat kontaktnog delovanja primenom mikrodilucione metode

Efekat kontaktnog delovanja na spore izolata *Trichoderma* spp. odabrana četiri ulja iz familije Lamiaceae ispitan je primenom mikrodilucione metode. Sva četiri testirana ulja ispoljila su fungicidni efekat prema svim ili prema određenim izolatima (Tabela 10).

Etarsko ulje majčine dušice pokazalo je najjaču aktivnost ispoljivši fungicidni efekat prema svim testiranim izolatima. Minimalna fungicidna koncentracija (MFC) za *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. afroharzianum*, *T. pleuroticola*, *T. guizhouense* i *T. cf. harzianum* iznosila je 12,5 µl/ml. MFC za *T. simmonsii*, *T. pholiotae* i većinu *T. pleuroti* izolata je iznosila 25 µl/ml. Osetljiviji su bili izolati *T. pleuroticola* i *T. pleuroti* sa bukovače poreklom iz Mađarske sa MFC vrednostima od 6,25 µl/ml. Inhibitorne vrednosti su bile u opsegu od 1,56 µl/ml za većinu izolata *T. pleuroti* i *T. pleuroticola*, *T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. pholiotae* i *T. cf. harzianum*, do 6,25 µl/ml za *T. simmonsii*, *T. atrobrunneum* i izolate sa bukovače poreklom iz Mađarske i Hrvatske.

Etarska ulja divlje i pitome nane ispoljila su fungicidni efekat prema svim testiranim izolatima sa bukovače i šitake, dok je kod izolata sa šampinjona MFC zabeležena jedino kod *T. aggressivum* f. *europaeum* T76 izolata (25 µl/ml). MFC vrednosti etarskog ulja divlje nane za izolate *T. harzianum* kompleksa sa šitake (*T. guizhouense* i *T. simmonsii*) i bukovače (*T. afroharzianum* i *T. cf.*

harzianum), kao i za *T. pleuroti* i *T. pleurotica* izolate iznosila je 12,5 µl/ml. Niže MFC vrednosti zabeležene su jedino za izolate sa bukovače poreklom iz Mađarske. Inhibitorne koncentracije za etarsko ulje divlje nane su bile u opsegu od 1,56 do 6,25 µl/ml. MIC za izolate sa šiitake (*T. guizhouense* i *T. simmonsii*) i bukovače (*T. afroharzianum*, *T. cf. harzianum* i *T. pleurotica*) iznosila je 3,12 µl/ml, dok je za *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. pholiotae*, *T. guizhouense* i *T. atrobrunneum* izolate sa šampinjona iznosila 6,25 odnosno 12,5 µl/ml. MFC vrednosti etarskog ulja pitome nane za *T. afroharzianum*, *T. cf. harzianum*, *T. simmonsii* i *T. pleurotica* izolate iznosile su 25 µl/ml, dok su za *T. guizhouense* i *T. pleuroti* izolate iznosile 12,5 µl/ml. Najniže MFC vrednosti od 1,56 µl/ml za etarsko ulje pitome nane zabeležene su za izolate sa bukovače poreklom iz Mađarske i izolat *T. afroharzianum* KG10 poreklom iz Srbije. Inhibitorne vrednosti etarskog ulja divlje nane kretale su se od 1,56 do 12,5 µl/ml. Najosetljiviji su bili izolati sa bukovače poreklom iz Hrvatske i Mađarske sa MIC od 1,56 µl/ml, a najotporniji *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. guizhouense* T52 sa MIC od 12,5 µl/ml.

Etarsko ulje bosiljka je ispoljilo fungicidno delovanje jedino prema izolatima sa bukovače poreklom iz Mađarske (*T. pleuroti* 23033 i *T. pleurotica* 12454) sa MFC vrednostima od 12,5 odnosno 6,25 µl/ml. Minimalne inhibitorne koncentracije bile su različite za sve izolate, u opsegu od 3,12 do 12,5 µl/ml. Najveću otpornost prema ulju bosiljka pokazali su izolati: *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. guizhouense* T52 i T59, *T. simmonsii* T57, *T. pleurotica* T7 i *T. pleuroti* T6, sa MIC vrednostima 12,5 µl/ml.

Tabela 10. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskih ulja biljaka majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka za *Trichoderma* spp., prouzrokovala zelene plesni jestivih gljiva, primenom mikrodilucione metode

Vrsta	Izolat	Divlja nana		Pitoma nana		Majčina dušica		Bosiljak	
		MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²
		(µl/ml)							
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	6,25	>25	3,12	25	3,12	12,5	3,12	>25
	T77	6,25	>25	12,5	>25	6,25	12,5	12,5	>25
	T85	6,25	>25	3,12	>25	1,56	12,5	3,12	>25
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	12,5	>25	6,25	>25	6,25	12,5	6,25	>25
<i>T. pholiotae</i>	T10	6,25	>25	3,12	>25	1,56	25	6,25	>25
<i>T. guizhouense</i>	T52	12,5	>25	12,5	>25	1,56	12,5	12,5	>25
	T58	3,12	12,5	3,12	12,5	6,25	12,5	3,12	>25
	T59	3,12	12,5	3,12	12,5	6,25	12,5	12,5	>25
<i>T. simmonsii</i>	T57	3,12	12,5	6,25	25	6,25	25	12,5	>25
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	3,12	12,5	1,56	25	1,56	12,5	3,12	>25
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	3,12	12,5	3,12	25	1,56	12,5	3,12	>25
<i>T. pleurotica</i>	KG6	3,12	25	3,12	25	6,25	25	6,25	>25
	KM4	3,12	12,5	3,12	25	1,56	12,5	3,12	>25
	KM5	3,12	12,5	6,25	12,5	1,56	12,5	3,12	>25
	KM12	3,12	12,5	6,25	12,5	1,56	12,5	6,25	>25
	T7	1,56	12,5	1,56	25	6,25	25	12,5	>25
<i>T. pleuroti</i>	23033	1,56	3,12	1,56	3,12	6,25	6,25	6,25	12,5
	KM6	3,12	12,5	3,12	25	1,56	25	6,25	>25
	KM8	1,56	12,5	3,12	25	1,56	25	6,25	>25
	KM11	6,25	12,5	3,12	12,5	1,56	12,5	3,12	>25
	T6	1,56	12,5	1,56	6,25	6,25	25	12,5	>25
	12454	3,12	6,25	1,56	3,12	6,25	6,25	3,12	6,25

¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija

Efekat gasovite faze prema odabranim izolatima *Trichoderma* spp. primenom makrodilucione fumigantne metode

Efekat delovanja gasovite faze četiri etarska ulja iz familije Lamiaceae ispitan je na sporama i isečcima micelije testiranih izolata, predstavnicima različitih vrsta roda *Trichoderma*, kako bi se utvrdilo samo dejstvo i razlike u rastu micelije nakon izlaganja spora i nakon izlaganja micelije patogenih gljiva. Za ispitivanje delovanja ulja primenom fumigantne metode odabrane su tri najagresivnije patogene vrste za šampinjon (*T. aggressivum* f. *europaeum* T77) i bukovaču (*T. pleuroti* KM11, *T. pleurotica* KM12) i tri vrste iz *Trichoderma harzianum* kompleksa sa šampinjona (*T. atrobrunneum* T54), bukovače (*T. cf. harzianum* KG13) i šiitake (*T. guizhouense* T59).

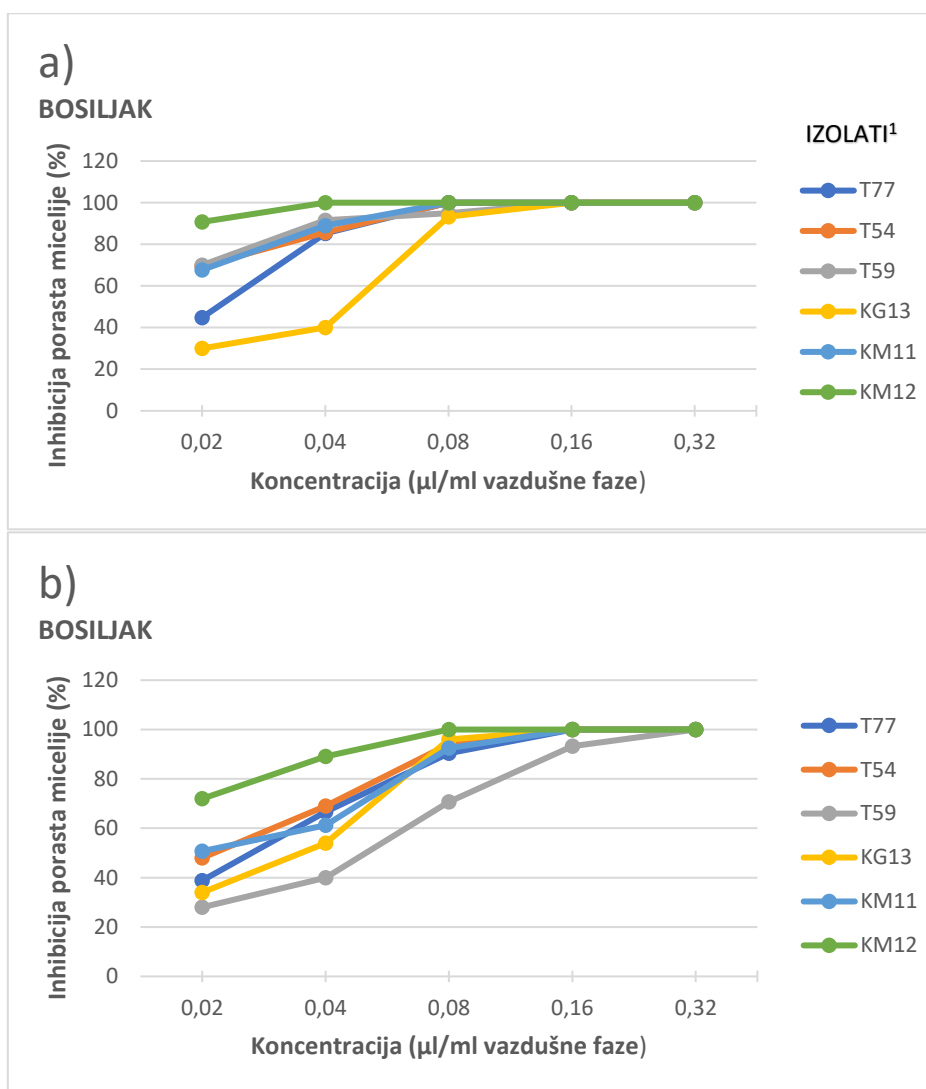
Primenom makrodilucione fumigantne metode nije zabeležen fungicidni efekat ni za jedno od četiri testirana ulja. Najjači inhibitorni efekat primenom fumigantne metode sa suspenzijom spora ispoljilo je etarsko ulje bosiljka, zatim majčina dušica, dok su efekti etarskih ulja divlje i pitome nane bili ujednačeni. Primenom fumigantne metode sa isečkom micelije, sva četiri testirana ulja ispoljila su ujednačeno delovanje, gde su nešto veću aktivnost ispoljila ulja bosiljka i divlje nane (Tabela 11).

Etarsko ulje bosiljka primenom fumigantne metode sa suspenzijom spora ispoljilo je potpuni inhibitorni efekat prema svim testiranim vrstama sa MIC vrednostima od 0,04 do 0,16 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze. Najosetljivija vrsta je bila *T. pleurotica* (KM12) sa vrednošću MIC od 0,04 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze i inhibicijom porasta kolonije micelije 90,76% na najmanjoj ispitivanoj koncentraciji od 0,02 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze. Inhibicija porasta micelije svih testiranih vrsta prikazana je na Grafikonu 8a: *T. aggressivum* f. *europaeum* (T77) 44,82 - 100%; *T. atrobrunneum* (T54) 69,56 - 100%; *T. guizhouense* (T59) 70 - 100%; *T. cf. harzianum* (KG13) 30 - 100% i *T. pleuroti* (KM11) 67,71 - 100%. Primenom fumigantne metode sa isečkom micelije zabeležene su MIC vrednosti od 0,08 do 0,32 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze, gde je najosetljivija vrsta bila takođe *T. pleurotica* (MIC=0,08 $\mu\text{l/ml}$). Inhibicija porasta micelije je prikazana na Grafikonu 8b: *T. aggressivum* f. *europaeum* 38,23 - 100%; *T. atrobrunneum* 48 - 100%; *T. guizhouense* 28 - 100%; *T. cf. harzianum* 34 - 100%; *T. pleuroti* 50,73 - 100% i *T. pleurotica* 71,96 - 100%.

Tabela 11. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskih ulja biljaka divlje nane, pitome nane, majčine dušice i bosiljka za *Trichoderma* spp., prouzrokovače zelene plesni jestivih gljiva, primenom makrodilucione fumigantne metode: sa suspenzijom spora i sa isečkom micelije

Vrsta	Izolat	Metoda	Divlja nana		Pitoma nana		Majčina dušica		Bosiljak	
			MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²
($\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze)										
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T77	micelija	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32
		spore	0,16	>0,32	0,32	>0,32	0,32	>0,32	0,08	>0,32
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	micelija	0,08	>0,32	0,32	>0,32	0,32	>0,32	0,16	>0,32
		spore	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,32	>0,32	0,08	>0,32
<i>T. guizhouense</i>	T59	micelija	0,32	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,32	>0,32
		spore	>0,32	>0,32	0,32	>0,32	0,04	>0,32	0,16	>0,32
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	micelija	0,32	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32
		spore	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,02	>0,32	0,16	>0,32
<i>T. pleuroti</i>	KM11	micelija	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,08	>0,32	0,16	>0,32
		spore	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,08	>0,32
<i>T. pleurotica</i>	KM12	micelija	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,16	>0,32	0,08	>0,32
		spore	0,16	>0,32	0,08	>0,32	>0,32	>0,32	0,04	>0,32

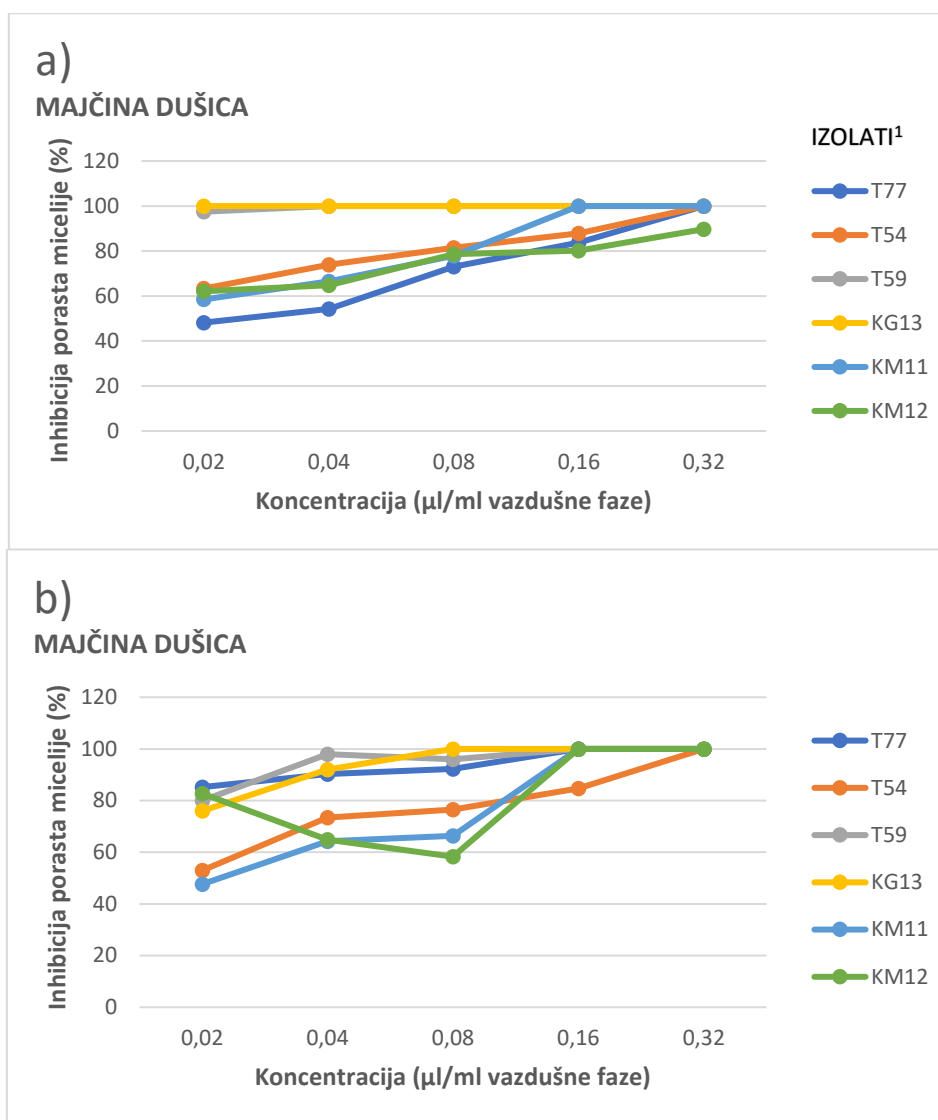
¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija



¹T77 – *T. aggressivum* f. *europaeum*; T54 – *T. atrobrunneum*; T59 – *T. guizhouense*; KG13 – *T. cf. harzianum*; KM11 – *T. pleuroti* i KM12 – *T. pleuroticola*

Grafikon 8. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. za etarsko ulje bosiljka primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a) i isečkom micelije (b)

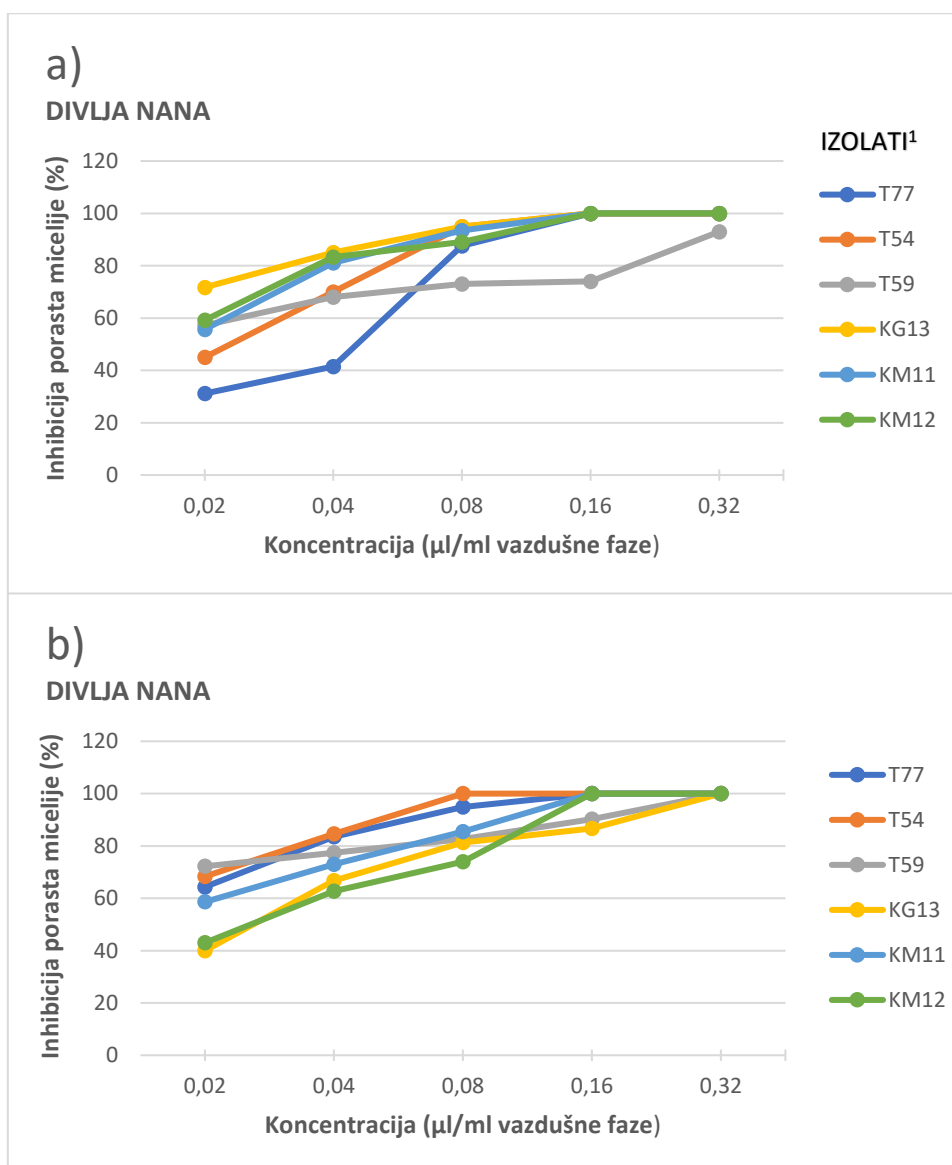
Etarsko ulje majčine dušice primenom fumigantne metode sa suspenzijom spora ispoljilo je potpuni inhibitorski efekat prema svim ispitivanim vrstama sa MIC vrednostima od 0,02 do 0,32 µl/ml vazdušne faze (Tabela 11), osim prema *T. pleuroticola*, kod koje je na najvišoj testiranoj koncentraciji od 0,32 µl/ml vazdušne faze zabeležena inhibicija porasta micelije od 89,73%. Najosetljivija je bila vrsta *T. cf. harzianum* sa vrednošću MIC od 0,02 µl/ml vazdušne faze. Na Grafikonu 9a prikazana je inhibicija porasta micelije svih testiranih vrsta: za *T. aggressivum* f. *europaeum* 48,19 - 100%; za *T. atrobrunneum* 63,35 - 100%; za *T. guizhouense* 97,5 - 100%; za *T. pleuroti* 58,50 - 100% i za *T. pleuroticola* 62,12 - 89,73%. Primenom metode sa isečcima micelije zabeležene su MIC vrednosti od 0,16 µl/ml vazdušne faze za većinu testiranih vrsta, osim za *T. atrobrunneum*, gde je iznosila 0,32 µl/ml vazdušne faze i *T. cf. harzianum*, koja je bila najosetljivija sa vrednošću MIC od 0,08 µl/ml vazdušne faze. Na Grafikonu 9b prikazana je inhibicija porasta micelije izolata *Trichoderma* spp. na svim testiranim koncentracijama ulja: *T. aggressivum* f. *europaeum* 85,52 - 100%; *T. atrobrunneum* 73,44 - 100%; *T. guizhouense* 80 - 100%; *T. cf. harzianum* 76 - 100%; *T. pleuroti* 47,64 - 100% i *T. pleuroticola* 58,30 - 100%.



¹T77 – *T. aggressivum* f. *europaeum*; T54 – *T. atrobrunneum*; T59 – *T. guizhouense*;
 KG13 – *T. cf. harzianum*; KM11 – *T. pleuroti* i KM12 – *T. pleuroticola*

Grafikon 9. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. za etarsko ulje majčine dušice primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a) i isečkom micelije (b)

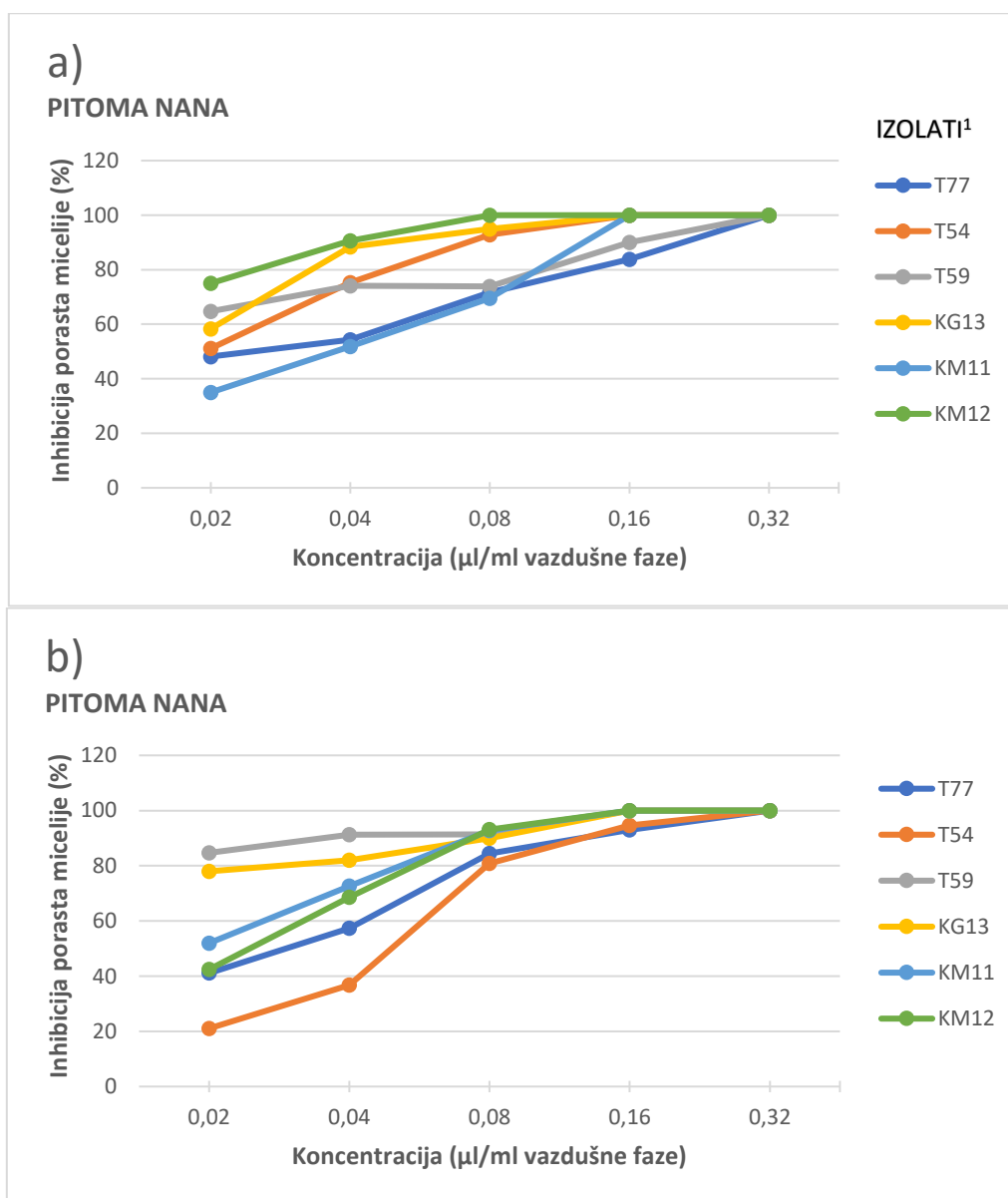
Primenom fumigantne metode sa suspenzijom spora, etarsko ulje divlje nane ispoljilo je potpuni inhibitorni efekat prema svim testiranim vrstama, osim prema *T. guizhouense*, kod koje je pri najvišoj testiranoj koncentraciji ulja zabeležena inhibicija porasta micelije od 93%. Minimalne inhibitorne koncentracije za sve ostale vrste bile su ujednačene i iznosile su 0,16 µl/ml vazdušne faze. Inhibicije porasta micelije prikazane su na Grafikonu 10a: *T. aggressivum* f. *europaeum* 31,15 - 100%; *T. atrobrunneum* 45 - 100%; *T. guizhouense* 57,25 - 93%; *T. cf. harzianum* 71,75 - 100%; *T. pleuroti* 55,69 - 100% i *T. pleuroticola* 59,19 - 100%. Primenom metode sa isečkom micelije potpuni inhibitorni efekat etarskog ulja divlje nane zabeležen je prema svim testiranim vrstama. Minimalne fungicidne koncentracije su bile u opsegu od 0,08 do 0,32 µl/ml vazdušne faze (Tabela 11), dok je inhibicija porasta micelije različitih *Trichoderma* vrsta bila: *T. aggressivum* f. *europaeum* 63,34 - 100%; *T. atrobrunneum* 68,34 - 100%; *T. guizhouense* 72,22 - 100%; *T. cf. harzianum* 44 - 100%; *T. pleuroti* 58,61 - 100% i *T. pleuroticola* 42,99 - 100% (Grafikon 10b).



¹T77 – *T. aggressivum* f. *europaeum*; T54 – *T. atrobrunneum*; T59 – *T. guizhouense*;
 KG13 – *T. cf. harzianum*; KM11 – *T. pleuroti* i KM12 – *T. pleuroticola*

Grafikon 10. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. za etarsko ulje divlje nane primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a) i isečkom micelije (b)

Etarsko ulje pitome nane primenom fumigantne metode sa suspenzijom spora je ispoljilo potpuni inhibitorni efekat prema svim vrstama sa vrednostima MIC od 0,08 do 0,32 µl/ml vazdušne faze (Tabela 11), gde je najosetljivija vrsta bila *T. pleuroticola* (MIC=0,08). Procenti inhibicije porasta micelije (Grafikon 11a) za različite vrste na svim testiranim koncentracijama ulja su bili: *T. aggressivum* f. *europaeum* 48,16 - 100%; *T. atrobrunneum* 51,13 - 100%; *T. guizhouense* 64,75 - 100%, *T. cf. harzianum* 58,35 - 100%; *T. pleuroti* 35,01 - 100% i *T. pleuroticola* 75,03 - 100%. Primenom metode sa isečkom micelije, etarsko ulje pitome nane ispoljilo je takođe potpuni inhibitorni efekat prema svim testiranim vrstama sa vrednostima MIC od 0,16 µl/ml vazdušne faze. Jedino je vrednost MIC za *T. atrobrunneum* iznosila 0,32 µl/ml vazdušne faze. Procenti inhibicije (Grafikon 11b) porasta micelije za različite vrste su bili: *T. aggressivum* f. *europaeum* 41,11 - 100%; *T. atrobrunneum* 21,06 - 100%; *T. guizhouense* 75,04 - 100%; *T. cf. harzianum* 78 - 100%; *T. pleuroti* 51,98 - 100% i *T. pleuroticola* 42,45 - 100%.



¹T77 – *T. aggressivum* f. *europaeum*; T54 – *T. atrobrunneum*; T59 – *T. guizhouense*;
 KG13 – *T. cf. harzianum*; KM11 – *T. pleuroti* i KM12 – *T. pleuroticola*

Grafikon 11. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. za etarsko ulje pitome nane primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a) i isečkom micelije (b)

Poređenjem dve fumigantne metode uočeno je da etarsko ulje bosiljka ispoljava jače antifungalno delovanje na klijanje spora svih testiranih vrsta, a da etarsko ulje majčine dušice jače deluje na klijanje spora vrsta *T. guizhouense* i *T. cf. harzianum*, dok je delovanje etarskih ulja divlje i pitome nane bilo ujednačeno i na klijanje spora i na porast micelije svih testiranih vrsta.

5.8.2. Antifungalno delovanje etarskih ulja jele, kleke, tuje i bora

In vitro efekat antifungalnog delovanja etarskih ulja četiri zimzelene biljke (jela, kleke, tuje i bora) određen je primenom mikrodilucione i makrodilucione fumigantne metode, pri čemu je ispitivano kontaktno delovanje i delovanje gasovite faze odabranih ulja prema izolatima vrsta roda *Trichoderma*.

Efekat kontaktnog delovanja primenom mikrodilucione metode

Primenom mikrodilucione metode nije zabeleženo fungicidno delovanje odabranih etarskih ulja, dok inhibitorsni efekat nije zabeležen samo kod određenih izolata (*T. aggressivum* f. *europaeum* T77 i *T. pholiotae* T10) izolovanih iz gajilišta šampinjona (Tabela 12).

Etarsko ulje jele ispoljilo je inhibitorsni efekat prema većini *T. pleurotica* izolata i *T. cf. harzianum* sa vrednošću MIC od 12,5 µl/ml, dok je vrednost MIC za većinu *T. pleuroti* izolata iznosila 25 µl/ml. Izdvojila se najosetljivija vrsta *T. afroharzianum* sa vrednošću MIC od 6,25 µl/ml.

Etarsko ulje bora ispoljilo je inhibitorsni efekat prema izolatima *T. pleuroti* i *T. pleurotica* sa vrednostima MIC od 12,5 do 25 µl/ml, kao i prema izolatima *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. atrobrunneum* sa šampinjona (MIC=25 µl/ml).

Inhibitorsni efekat prema skoro svim izolatima (osim T77, T10 i T52), sa MIC vrednostima od 25 µl/ml, ispoljilo je etarsko ulje kleke. Slično delovanje zabeleženo je i za etarsko ulje tuje, čije su MIC vrednosti iznosile 25 µl/ml prema svim izolatima sa bukovače i šiitake, osim prema dva izolata sa bukovače poreklom iz Mađarske (MIC=12,5 µl/ml). Etarsko ulje tuje nije ispoljilo inhibitorsni efekat prema izolatima sa šampinjona: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. pholiotae*, *T. guizhouense* i *T. atrobrunneum*.

Tabela 12. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskih ulja biljaka jele, bora, kleke i tuje za *Trichoderma* spp., prouzrokovala zelene plesni jestivih gljiva, primenom mikrodilucione metode

Vrsta	Izolat	Jela		Bor		Kleka		Tuja	
		MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²
		(µl/ml)							
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	>25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25
	T77	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
	T85	>25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	25	>25	25	>25	25	>25	>25	>25
<i>T. pholiotae</i>	T10	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
<i>T. guizhouense</i>	T52	>25	>25	25	>25	>25	>25	>25	>25
	T58	>25	>25	>25	>25	12,5	>25	25	>25
	T59	>25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
<i>T. simmonsii</i>	T57	25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	6,25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	12,5	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
<i>T. pleurotica</i>	KG6	>25	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
	KM4	25	>25	12,5	>25	25	>25	25	>25
	KM5	25	>25	25	>25	25	>25	25	>25
	KM12	25	>25	12,5	>25	25	>25	25	>25
	T7	12,5	>25	25	>25	25	>25	25	>25
<i>T. pleuroti</i>	23033	12,5	>25	>25	>25	25	>25	12,5	>25
	KM6	25	>25	25	>25	25	>25	25	>25
	KM8	12,5	>25	12,5	>25	25	>25	25	>25
	KM11	12,5	>25	12,5	>25	25	>25	25	>25
	T6	12,5	>25	>25	>25	25	>25	25	>25
	12454	12,5	>25	>25	>25	25	>25	12,5	>25

¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija

Efekat gasovite faze prema odabranim izolatima *Trichoderma* spp. primenom makrodilucione fumigantne metode

Ispitivanjem uticaja gasovite faze odabranih etarskih ulja četiri zimzelene biljke (jele, bora, tuje i kleke) na klijanje spora i porst micelije različitih *Trichoderma* vrsta primenom dve makrodilucione fumigantne metode nije zabeležen niti fungicidni niti potpuni inhibitorski efekat pri primenjenim koncentracijama (Tabela 13).

Procenti inhibicije porasta micelije određeni su samo za vrstu *T. cf. harzianum* (Prilog 3; Grafikon P3-1) za sva četiri ulja primenom metode sa isečkom micelije: etarsko ulje jele 19 - 60,02%; etarsko ulje bora 1,47 - 50,58%; etarsko ulje tuje 3,16 - 50,41% i etarsko ulje kleke 4,16 - 84,8%. Takođe, etarsko ulje jele ispoljilo je svega 12% inhibicije porasta micelije izolata *T. aggressivum* f. *europaeum*.

Primenom metode sa suspenzijom spora, procenti inhibicije porasta micelije zabeleženi su za *T. cf. harzianum*: etarsko ulje jele 19 - 63,29%; etarsko ulje bora 6,76 - 54,28%; etarsko ulje tuje 7,2 - 35,2% i etarsko ulje kleke 8,7 - 71,29%, kao i za *T. pleuroti*: etarsko ulje jele 5 - 35%; etarsko ulje bora 15 - 20%; etarsko ulje tuje 5 - 10% i etarsko ulje kleke 10%. Takođe, minimalni efekat od 10% zabeležen je za etarsko ulje jele na *T. aggressivum* f. *europaeum*.

Tabela 13. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskih ulja jele, bora, kleke i tuje za *Trichoderma* spp., prouzrokovaoce zelene plesni jestivih gljiva primenom makrodilucione fumigantne metode: sa suspenzijom spora i sa isečkom micelije

Vrsta	Izolat	Metoda	Jela		Bor		Kleka		Tuja		
			MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	
(µl/ml vazdušne faze)											
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T77	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. guizhouense</i>	T59	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. pleuroti</i>	KM11	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. pleurotica</i>	KM12	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32

¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija

5.8.3. Antifungalno delovanje etarskih ulja kantariona i hajdučke trave

Efekat kontaktnog delovanja i delovanja gasovite faze lekovitih biljaka hajdučke trave i kantariona na klijanje spora i porast micelije izolata *Trichoderma* spp. ispitan je primenom tri različite metode: mikrodilucione, makrodilucione fumigantne sa isečkom i makrodilucione fumigantne sa suspenzijom spora.

Efekat kontaktnog delovanja primenom mikrodilucione metode

Etarska ulja lekovitih biljaka kantariona i hajdučke trave nisu ispoljila fungicidni efekat prema testiranim izolatima *Trichoderma* spp. pri ispitivanju kontaktnog delovanja, dok za etarsko ulje kantariona nije zabeležen čak ni inhibitorski efekat pri testiranim koncentracijama (Tabela 15).

Minimalne fungicidne koncentracije za oba etarska ulja bile su veće od 25 µl/ml. Minimalne inhibitorne koncentracije za etarsko ulje kantariona bile su veće od 25 µl/ml, dok su za etarsko ulje hajdučke trave bile u opsegu od 12,5 do 25 µl/ml. Za izolate sa bukovače: *T. pleuroti*, *T. pleurotica*, *T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum* i šitake: *T. guizhouense* i *T. simmonsii*, vrednosti MIC su bile 25 µl/ml, dok su za izolate *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. guizhouense*, *T. atrobrunneum* i *T. pholiotae* sa šampinjona iznosile 12,5 µl/ml. Kod svih testiranih izolata uočen je bujniji rast i obilna sporulacija pri svim testiranim koncentracijama ulja kantariona, što može ukazivati na postojanje stimulatívno delovanja ovog ulja prema *Trichoderma* spp.

Efekat gasovite faze prema odabranim izolatima *Trichoderma* spp. primenom makrodilucione fumigantne metode

Fumigantno antifungalno delovanje etarskih ulja kantariona i hajdučke trave na spore i isečke micelije testiranih izolata *Trichoderma* spp. nije bilo zadovoljavajuće, jer nisu zabeležene vrednosti MIC i MFC (veće od 0,32 µl/ml vazdušne faze) (Tabela 14). Međutim, može se zaključiti da je na svim ispitivanim koncentracijama ispoljen izvestan vid stimulatívno delovanja etarskog ulja kantariona prema izolatima *Trichoderma* spp., koji je bio uočljiviji nego u testovima gde je ispitivano kontaktno delovanje. Kolonija micelije izolata *Trichoderma* spp. se u Petri kutijama dosta brzo razvijala, pa je za kratko vreme prerasla celu površinu i započela rast van nje izdižući poklopac kutije.

Etarsko ulje hajdučke trave je gasovitom fazom delovalo značajno slabije na isečke micelije kolonije nego na spore testiranih izolata. Vrednosti MIC i MFC nisu zabeležene delovanjem ulja ni na spore ni na isečke micelije izolata *Trichoderma* spp., ali su procenti inhibicije klijanja spora bili prilično zadovoljavajući. Inhibicija porasta micelije dejstvom ulja na isečke kolonije je bila slaba, svega 4 do 32%, osim za izolat *T. cf. harzianum* gde je jedino zabeležena vrednost veća od 50 (56%) (Grafikon 12a). Inhibicija klijanja spora za različite vrste pri koncentracijama ulja nižim od MIC je bila: *T. aggressivum* f. *europaeum* 16,67 - 81,5%; *T. atrobrunneum* 35,29 - 88,24%; *T. guizhouense* 23,35 - 48,35%; *T. cf. harzianum* 3,35 - 70%; *T. pleurotica* 53,33 - 88,67% i *T. pleuroti* 77,78 - 97,5% (Grafikon 12b).

Tabela 14. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskih ulja biljaka kantariona i hajdučke trave za izolate *Trichoderma* spp., prouzrokovaoče zelene plesni jestivih gljiva, primenom makrodilucione fumigantne metode: sa suspenzijom spora i sa isečkom micelije

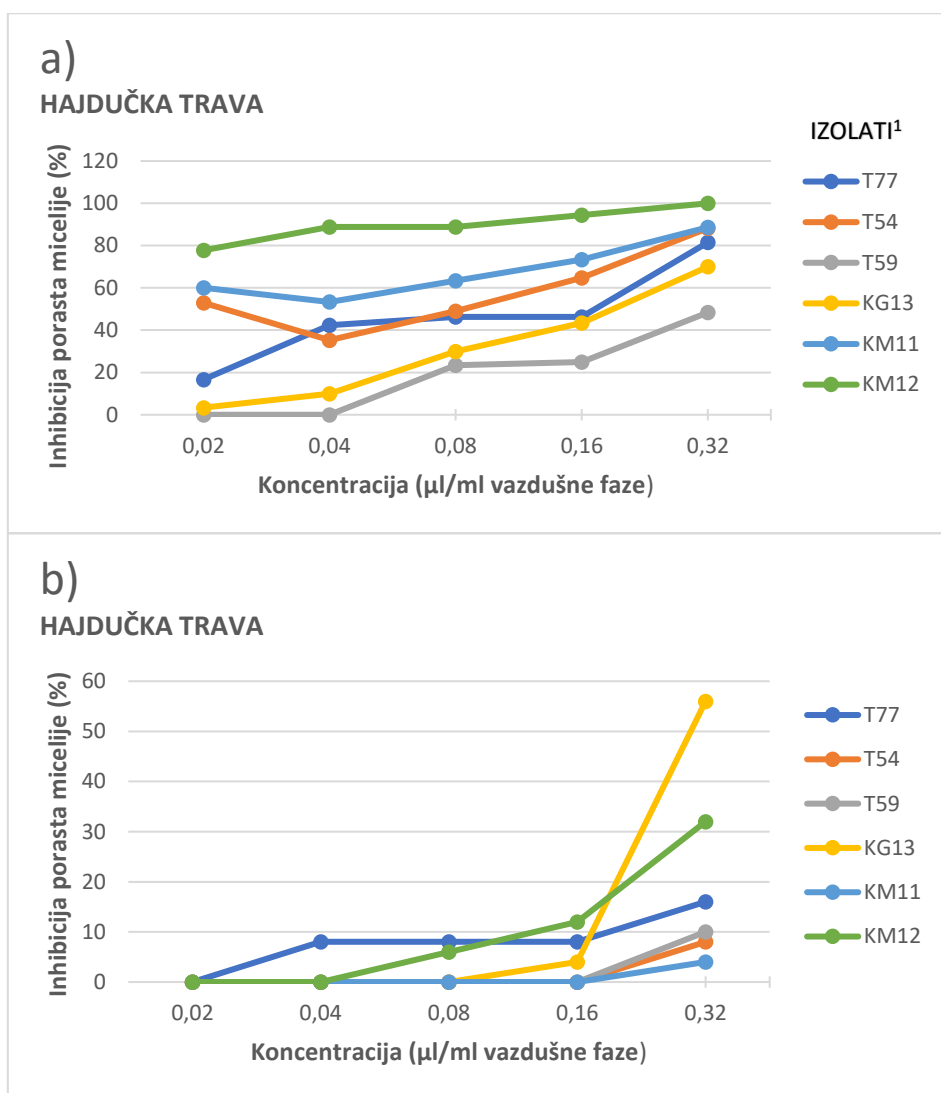
Vrsta	Izolat	Metoda	Kantarion		Hajdučka trava	
			MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²
(µl/ml vazdušne faze)						
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T77	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. guizhouense</i>	T59	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. pleuroti</i>	KM11	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. pleurotica</i>	KM12	spore	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
		micelija	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32

¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija

Tabela 15. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskih ulja biljaka kantariona, hajdučke trave i mirođije za izolate *Trichoderma* spp., prouzrokovaoče zelene plesni jestivih gljiva, primenom mikrodilucione metode

Vrsta	Izolat	Kantarion		Hajdučka trava		Mirođija	
		MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²
(µl/ml)							
<i>T. aggressivum f. europaeum</i>	T76	>25	>25	12,5	>25	1,56	6,25
	T77	>25	>25	12,5	>25	1,56	6,25
	T85	>25	>25	12,5	>25	1,56	25
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	>25	>25	12,5	>25	1,56	12,5
<i>T. pholiotae</i>	T10	>25	>25	12,5	>25	1,56	25
<i>T. giuzhouense</i>	T52	>25	>25	12,5	>25	1,56	12,5
	T58	>25	>25	25	>25	1,56	6,25
	T59	>25	>25	25	>25	1,56	6,25
<i>T. simmonsii</i>	T57	>25	>25	25	>25	1,56	12,5
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	>25	>25	25	>25	3,12	3,12
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	>25	>25	25	>25	3,12	3,12
<i>T. pleurotica</i>	KG6	>25	>25	25	>25	1,56	6,25
	KM4	>25	>25	25	>25	3,12	3,12
	KM5	>25	>25	25	>25	3,12	3,12
	KM12	>25	>25	25	>25	3,12	12,5
	T7	>25	>25	12,5	>25	3,12	12,5
	23033	>25	>25	25	>25	1,56	3,12
<i>T. pleuroti</i>	KM6	>25	>25	25	>25	3,12	6,25
	KM8	>25	>25	25	>25	3,12	12,5
	KM11	>25	>25	25	>25	3,12	12,5
	T6	>25	>25	25	>25	1,56	6,25
	12454	>25	>25	25	>25	1,56	3,12

¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija



¹T77 – *T. aggressivum* f. *europaeum*; T54 – *T. atrobrunneum*; T59 – *T. guizhouense*;
 KG13 – *T. cf. harzianum*; KM11 – *T. pleuroti* i KM12 – *T. pleurotica*

Grafikon 12. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. za etarsko ulje hajdučke trave primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a) i isečkom micelije (b)

5.8.4. Antifungalno delovanje etarskog ulja mirođije

Antifungalno delovanje etarskog ulja mirođije *in vitro* ispitano je primenom čak pet metoda. Prilikom preliminarnog ispitivanja primenom mikrodilucione metode, koja se pokazala pouzdanom i najekonomičnijom metodom, etarsko ulje mirođije pokazalo je i više nego zadovoljavajući efekat ispoljivši i fungicidni i inhibitorski efekat prema svim testiranim izolatima. Kao ulje sa najboljim antifungalnim efektom odabrano je da bude testirano primenom svih metoda kako bi se potvrdili rezultati iz preliminarnih ispitivanja. Pored mikrodilucione metode, u testiranje antifungalnog delovanja ulja mirođije bile su uključene i po dve makrodilucione, kontaktne i fumigantne metode, tj. svaka delovanjem na klijanje spora i na porast micelije izolata *Trichoderma* spp.

Efekat kontaktnog delovanja primenom mikrodilucione metode

Mikrodiluciona metoda korišćena je za preliminarna ispitivanja kontaktnog delovanja etarskog ulja. Primenom ove metode, etarsko ulje mirođije ispoljilo je najbolji antifungalni efekat među 11 testiranih etarskih ulja. Zabeležene su MIC i MFC vrednosti za sve testirane izolate (Tabela

15). Fungicidne koncentracije ulja mirođije su bile u opsegu od 3,12 do 25 µl/ml, dok su minimalne inhibitorne koncentracije bile od 1,56 do 3,12 µl/ml. Vrednosti MIC su bile ujednačene za sve testirane izolate, dok su MFC vrednosti bile dosta varijabilnije, čak i između izolata iste vrste. Vrednosti MIC od 1,56 µl/ml zabeležene su za izolate *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. simmonsii*, *T. pholiotae* i *T. guizhouense*, dok su vrednosti od 3,12 µl/ml određene za *T. afroharzianum*, *T. cf. harzianum*, *T. pleurotica* i *T. pleuroti*. Vrednosti MFC su bile najniže za *T. pleuroti*, *T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum* (MFC=3,12 µl/ml), dok su najviše bile za izolate iz *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona (*T. guizhouense*, *T. pholiotae* i *T. atrobrunneum*) i *T. pleurotica* sa bukovače (12,5 i 25 µl/ml).

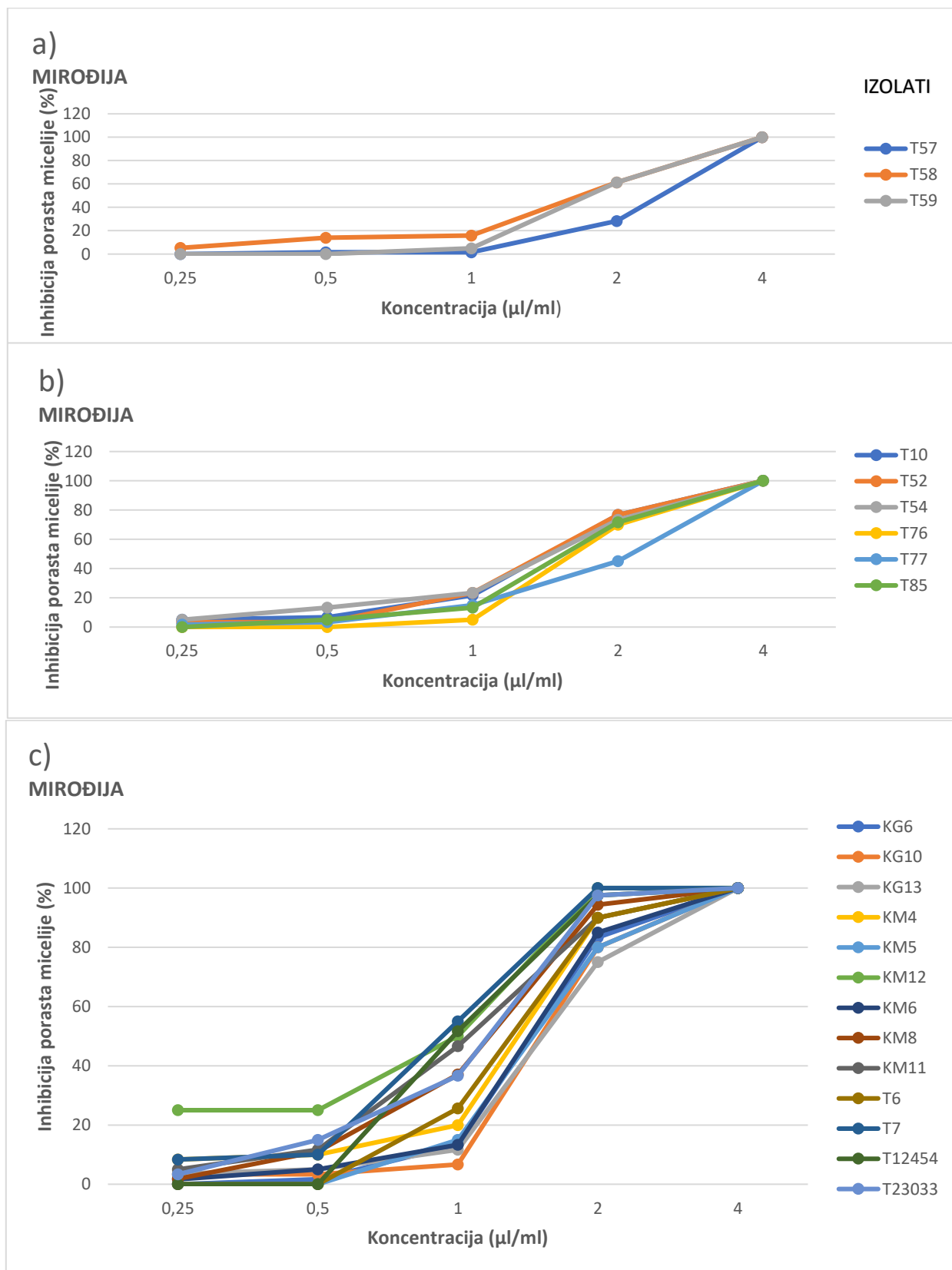
Efekat kontaktnog delovanja primenom makrodilucione kontaktne metode

Primenom makrodilucione kontaktne metode sa suspenzijom spora potvrđeni su rezultati iz preliminarne mikrodilucione metode. U testovima su korišćene koncentracije od 0,25 do 4 µl/ml, jer su MIC vrednosti primenom makrodilucione kontaktne metode bile do 3,12 µl/ml (Tabela 16). Primenom ove metode zabeležene su MIC vrednosti za sve testirane izolate od 4 µl/ml, osim za izolate *T. pleurotica* T7 i KM12 (MIC=2 µl/ml), čime su potvrđeni rezultati iz mikrodilucione metode. Inhibicija klijanja spora ulja mirođije makrodilucionom kontaktnom metodom je bila u opsegu od 2,74 do 100%, dok su procenti za pojedinačne izolate prikazani grafički (Grafikon 13). Izdvojena je inhibicija devet izolata predstavnika vrsta roda *Trichoderma* sa različitih domaćina: tri najagresivnije patogene vrste šampinjona (*T. aggressivum* f. *europaeum* T77 1,65 - 100%) i bukovače (*T. pleuroti* KM11 25 - 100% i *T. pleurotica* KM12 5 - 100%) i šest vrsta iz *Trichoderma harzianum* kompleksa sa šampinjona (*T. atrobrunneum* T54 5 - 100% i *T. pholiotae* T10 5 - 100%), bukovače (za *T. cf. harzianum* KG13 3,55 - 100% i *T. afroharzianum* KG10 3,55 - 100%) i šiitake (za *T. guizhouense* T59 5 - 100% i *T. simmonsii* T57 1,65 - 100%).

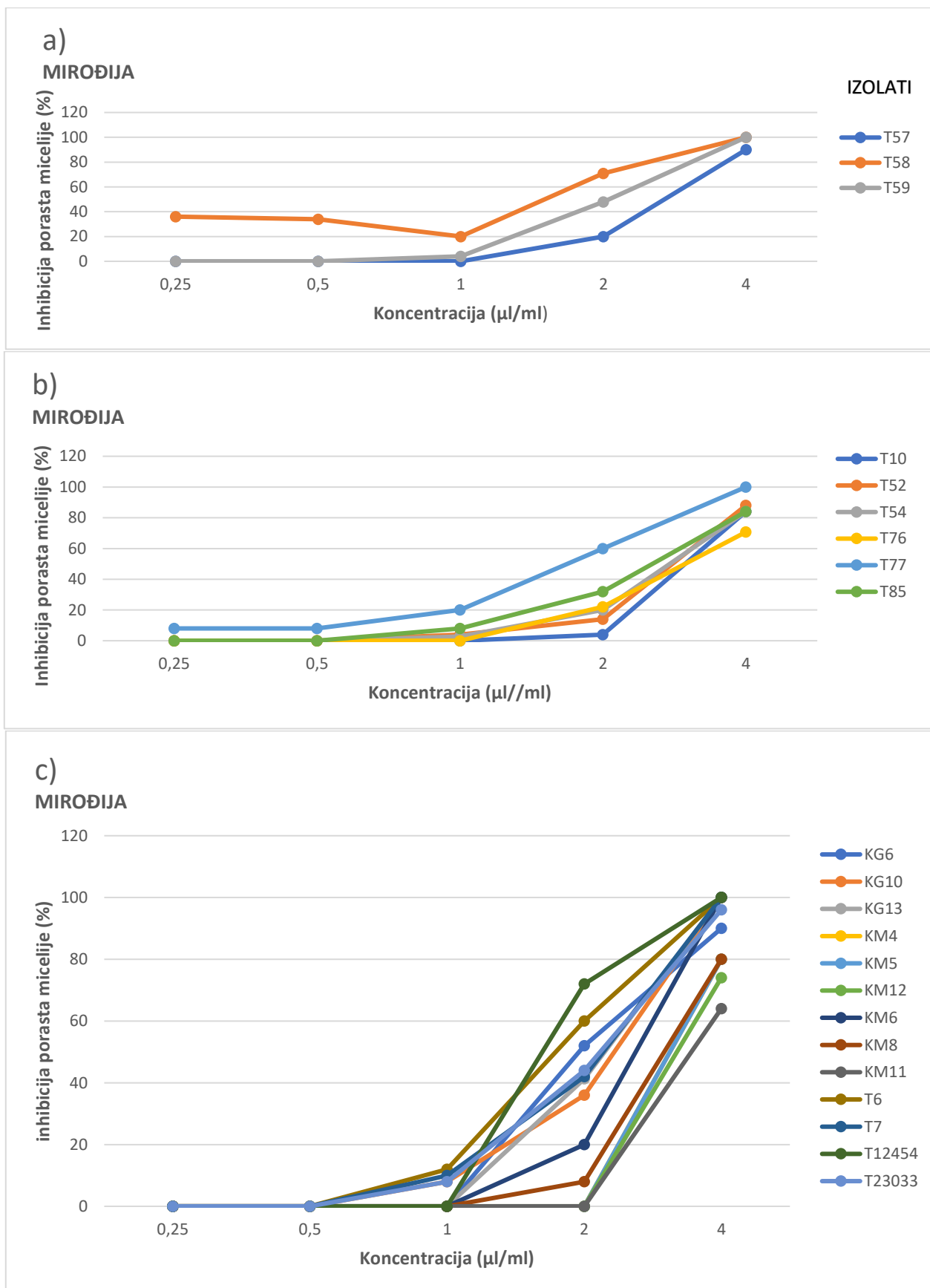
Minimalne fungicidne koncentracije nisu zabeležene imajući u vidu da su i primenom preliminarne metode za većinu izolata MFC vrednosti bile veće od 4 µl/ml, tačnije od 6,25 do 25 µl/ml, osim za par izolata kod kojih su određene vrednosti od 3,12 µl/ml.

Primenom kontaktne metode sa isečkom micelije ispitivano je delovanje ulja i na razvoj micelije direktno, gde je u poređenju sa metodom sa suspenzijom spora zabeležen nešto slabiji efekat delovanja ulja mirođije. Vrednost MIC od 4 µl/ml zabeležena je samo kod *T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. cf. harzianum* i par izolata (T77, KM6, T7, T6 i 12454), dok su MFC vrednosti bile veće od 4 µl/ml za sve testirane izolate (Tabela 16). Procenti inhibicije porasta micelije su bili u opsegu od 1,63 do 100%, dok su za pojedinačne izolate prikazani grafički (Grafikon 14). Inhibicija porasta micelije različitih vrsta na ispitivanim koncentracijama je bila: *T. atrobrunneum* 4 - 82,68%; *T. guizhouense* 4 - 100%; *T. pholiotae* 4 - 84%, *T. simmonsii* 20 - 90%; *T. aggressivum* f. *europaeum* 16 - 100%; *T. cf. harzianum* 44 - 100%; *T. pleuroti* oko 70%, *T. pleurotica* oko 70,8 % i *T. afroharzianum* 8 - 100%.

Procenti inhibicije i linearno raspoređene koncentracije etarskog ulja mirođije iskorišćene su za probit analizu, gde su određene EC₅₀ vrednosti za sve testirane izolate (Tabela 17), pomoću kojih je kasnije određena selektivna toksičnost za patogenu gljivu i gljivu domaćina. Pored EC₅₀ vrednosti, određeni su i drugi parametri osetljivosti poput EC₉₀ vrednosti i faktora rezistentnosti (RF). EC₅₀ vrednosti za etarsko ulje mirođije su bile u opsegu od 0,96 (*T. guizhouense* T58) do 3,44 µg/ml (*T. pleuroti* KM11), dok su se EC₉₀ vrednosti kretale od 3,24 (*T. pleuroti* T6) do 6,04 µg/ml (*T. pleuroti* KM11). Prema **Gea et al.** (1996) i **Grogan et al.** (2000), svi izolati su svrstani u visoko osetljive (EC₅₀ < 5 µg/ml). Vrednosti za faktor rezistentnosti (RF) bile su manje od 3, što po skali koju su dali **Gout et al.** (1994) znači da su svi testirani izolati svrstani u osetljive na etarsko ulje mirođije. Najviša RF vrednost zabeležena je za izolat *T. simmonsii* T57 (2,73), dok su najniže zabeležene za *T. aggressivum* f. *europaeum* T77, *T. guizhouense* T58 i *T. pleuroti* T6 izolate (1).



Grafikon 13. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. izolata sa šitake (a), šampinjona (b) i bukovače (c) za etarsko ulje mirođije primenom makrodilucione kontaktne metode sa suspenzijom spora



Grafikon 14. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. izolata sa šiitake (a), šampinjona (b) i bukovače (c) za etarsko ulje mirođije primenom makrodilucione kontaktne metode sa isečkom micelije

Tabela 16. Minimalne inhibitorne i fungicidne koncentracije etarskog ulja mirođije za izolate *Trichoderma* spp., prouzročivače zelene plesni jestivih gljiva primenom makrodilucionih metoda: kontaktne i fumigantne

Vrsta	Izolat	Kontaktna metoda ($\mu\text{l/ml}$)				Fumigantna metoda ($\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze)			
		Spore		Micelija		Spore		Micelija	
		MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²	MIC ¹	MFC ²
<i>T. aggressivum</i> <i>f. europaeum</i>	T76	4	> 4	> 4	> 4	0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	T77	4	> 4	4	> 4	0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	T85	4	> 4	> 4	> 4	0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	4	> 4	> 4	> 4	0,16	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. pholiotae</i>	T10	4	> 4	> 4	> 4	0,16	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. guizhouense</i>	T52	4	> 4	> 4	> 4	0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	T58	4	> 4	4	> 4	0,16	>0,32	>0,32	>0,32
	T59	4	> 4	4	> 4	0,16	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. simmonsii</i>	T57	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	4	> 4	4	> 4	0,16	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	4	> 4	4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
<i>T. pleurotica</i>	KG6	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	KM4	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	KM5	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	KM12	2	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	T7	2	> 4	4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	23033	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32
	<i>T. pleuroti</i>	KM6	4	> 4	4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32
KM8	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	
KM11	4	> 4	> 4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	
T6	4	> 4	4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	
12454	4	> 4	4	> 4	>0,32	>0,32	>0,32	>0,32	

¹Minimalna inhibitorna koncentracija; ²Minimalna fungicidna koncentracija

Efekat gasovite faze prema odabranim izolatima *Trichoderma* spp. primenom makrodilucione fumigantne metode

Pored različitih testova kontaktnog delovanja ulja mirođije, ispitan je i efekat gasovite faze na klijanje spora i porast micelije svih testiranih izolata. Fungicidno delovanje nije zabeleženo ni u metodi sa sporama ni u metodi sa isečcima, pa su vrednosti MFC bile veće od 0,32 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze za sve testirane izolate. Primenom metode sa isečkom micelije nisu zabeležene vrednosti MIC (veće od 0,32 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze), dok su u metodi sa sporama zabeležene vrednosti MIC za *T. aggressivum* f. *europaeum* od 0,32 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze i od 0,16 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze za *T. atrobrunneum*, *T. pholiotae*, *T. afroharzianum* i *T. guizhouense* (Tabela 16).

Inhibicija porasta micelije izolata *Trichoderma* spp. primenom metode sa suspenzijom spora su bile u proseku od 19,43 do 95,57% i grafički su prikazane za svaki izolat (Grafikon 15). Inhibicije klijanja spora različitih vrsta *Trichoderma* spp. su bile: *T. atrobrunneum* 50 - 100%; *T. guizhouense* 60 - 100%; *T. pholiotae* 16 - 100%; *T. simmonsii* 5 - 97,5%; *T. aggressivum* f. *europaeum* 16 - 100%; *T. cf. harzianum* 13,35 - 78,35%; *T. pleuroti* 33,35 - 95%; *T. pleurotica* 13,33 - 97,5% i *T. afroharzianum* 20 - 100%.

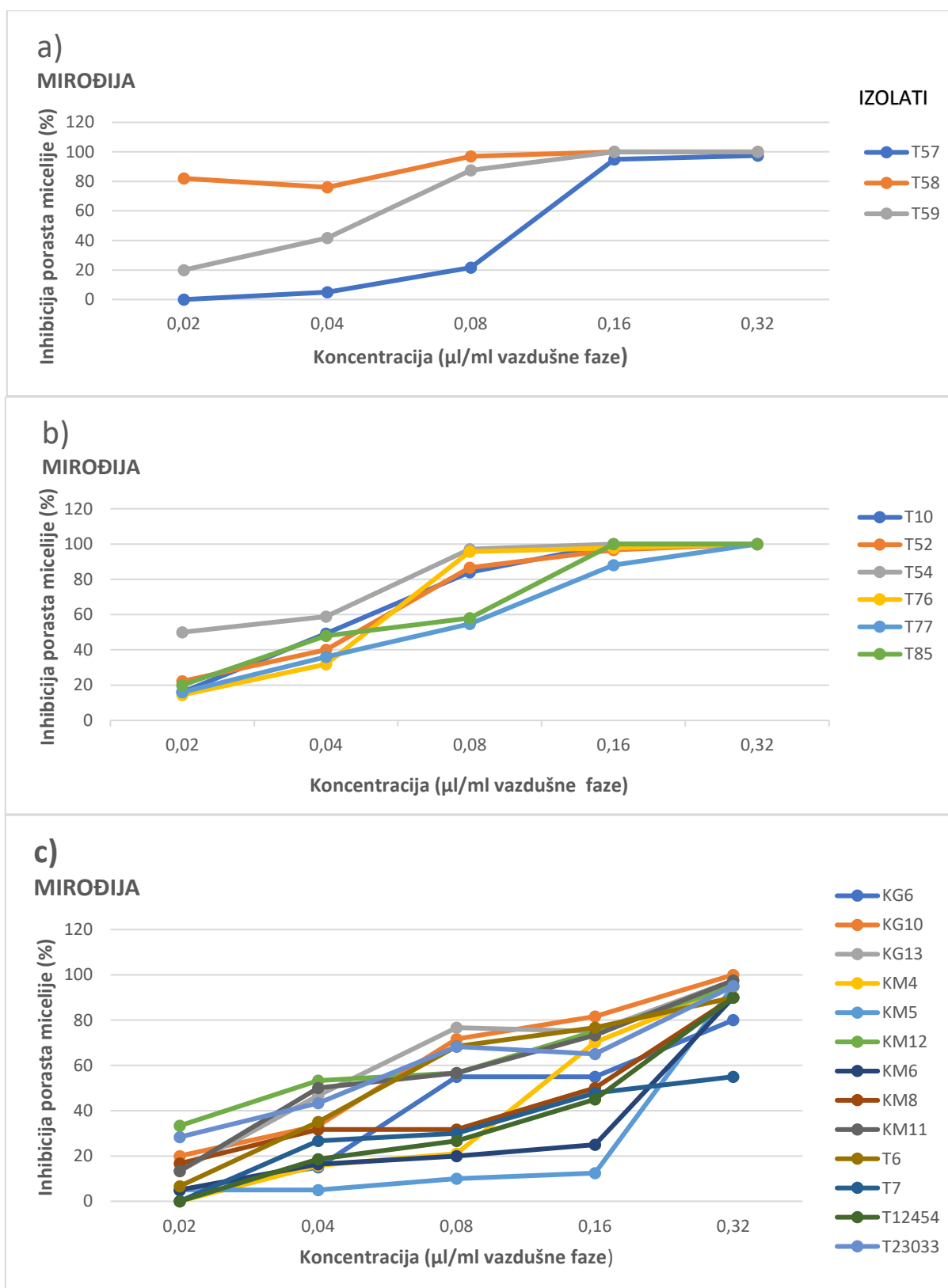
Inhibicije porasta micelije izolata *Trichoderma* spp. primenom metode sa isečkom micelije su bile nešto manje u poređenju sa dejstvom na klijanje spora (Grafikon 16) i u proseku su bile od 6,69 do 88,68%. Inhibicije porasta micelije različitih vrsta *Trichoderma* spp. su bile: *T. atrobrunneum* 13,32 - 82,68%; *T. guizhouense* 13,3 - 88,89%; *T. pholiotae* 4 - 57,32%, *T. simmonsii* 13,32 - 82,68%;

T. aggressivum f. *europaeum* 24 - 88%; *T. cf. harzianum* 10,68 - 72,84%; *T. pleuroti* 2,68 - 90,68%; *T. pleurotica* 0,91 - 80% i *T. afroharzianum* 9,32 - 69,32%.

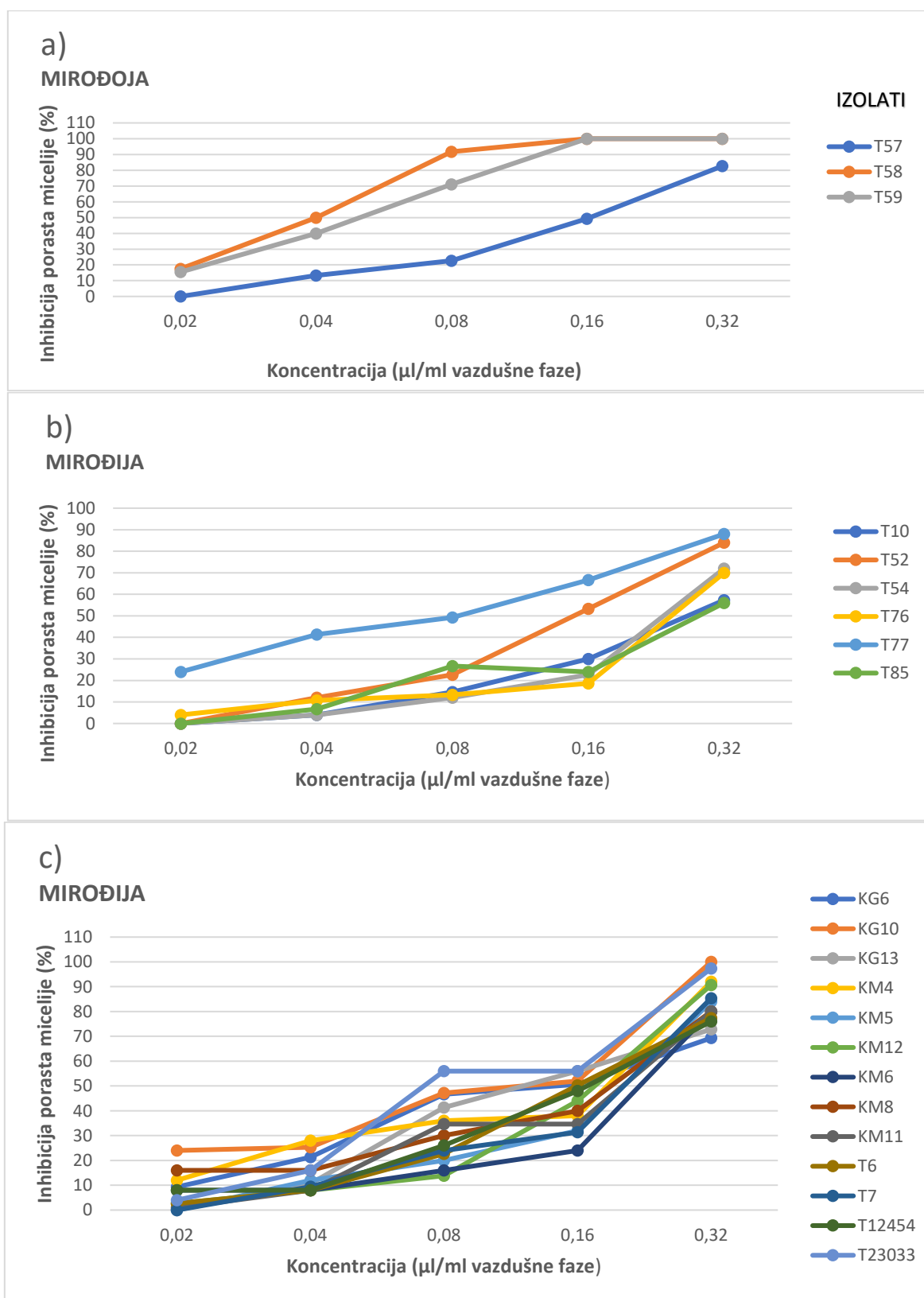
Tabela 17. Parametri osjetljivosti *Trichoderma* spp. izolata prema etarskom ulju mirođije

Vrsta	Izolat	EC ₅₀ (µg/ml) ¹ CI 95%	EC ₉₀ (µg/ml) ² CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	2,98 (2,72-3,26)	5,61 (4,85-7,77)	4,60 (4,11-5,09)	1,20	2,22
	T77	1,34 (0,83-2,41)	4,71 (4,01-16,83)	2,35 (2,17-2,53)	4,71	1,00
	T85	2,77 (2,49-3,12)	6,17 (5,09-8,17)	3,68 (3,29-4,08)	0,87	2,07
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	2,69 (2,48-2,94)	4,72 (4,17-5,60)	5,26 (4,74-5,78)	3,59	2,01
<i>T. pholiotae</i>	T10	2,97 (2,72-3,26)	5,30 (4,62-6,46)	5,09 (4,56-5,62)	0,19	2,22
<i>T. guizhouense</i>	T52	2,66 (2,47-2,87)	4,18 (3,78-4,79)	6,53 (5,90-7,16)	0,25	1,99
	T58	0,96 (0,77-1,26)	6,03 (3,70-13,45)	1,61 (1,40-1,82)	1,48	1,00
	T59	2,18 (2,02-2,36)	3,75 (3,36-4,33)	5,42 (5,00-5,84)	0,02	2,27
<i>T. simmonsii</i>	T57	2,62 (2,44-2,82)	4,04 (3,67-4,60)	6,83 (6,16-7,50)	0,50	2,73
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	2,08 (1,93-2,19)	3,68 (3,30-4,28)	5,02 (4,57-5,47)	2,16	1,13
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	2,16 (2,01-2,33)	3,39 (3,07-3,87)	6,57 (5,93-7,11)	1,18	1,17
<i>T. pleurotica</i>	KG6	2,34 (2,16-2,54)	4,00 (3,38-4,36)	5,51 (5,00-6,02)	2,66	1,27
	KM4	3,02 (2,81-3,26)	4,71 (4,25-5,43)	6,67 (5,99-7,35)	3,04	1,64
	KM5	3,02 (2,81-3,26)	4,71 (4,25-5,43)	6,67 (5,98-7,36)	3,04	1,64
	KM12	3,16 (2,93-3,43)	5,14 (4,57-6,61)	6,07 (5,50-6,72)	1,45	1,72
	T7	2,06 (1,19-2,23)	3,53 (3,17-4,03)	5,50 (5,10-5,90)	0,01	1,12
<i>T. pleuroti</i>	23033	2,01 (1,85-2,18)	3,56 (3,18-4,14)	5,13 (5,07-5,99)	2,75	1,09
	KM6	2,71 (2,49-2,97)	4,38 (3,82-5,39)	6,13 (5,46-6,90)	0,92	1,47
	KM8	3,02 (2,81-3,26)	4,71 (4,25-5,43)	6,67 (5,46-6,90)	3,04	1,64
	KM11	3,44 (3,15-3,81)	6,04 (5,18-7,61)	5,24 (4,63-5,85)	0,35	1,87
	T6	1,84 (1,70-2,01)	3,24 (2,90-3,76)	5,25 (4,47-4,73)	0,03	1,00
	12454	2,12 (1,97-2,28)	3,27 (2,97-3,73)	6,78 (6,11-7,45)	1,16	1,15

EC₅₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 50% micelije; EC₉₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 90% micelije; CI – interval poverenja; b – koeficijent regresije; H – heterogenost; RF – faktor rezistentnosti



Grafikon 15. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. izolata sa šiitake (a), šampinjona (b) i bukovače (c) za etarsko ulje mirođije primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora



Grafikon 16. Procenti inhibicije porasta micelije *Trichoderma* spp. izolata sa šitake (a), šampinjona (b) i bukovače (c) za etarsko ulje mirođije primenom makrodilucione fumigantne metode sa isečkom micelije

Poređenjem metoda kojima je ispitivana antifungalna aktivnost etarskog ulja mirođije može se zaključiti da je primenom mikrodilucione metode zabeležena različita osetljivost testiranih izolata prema ovom etarskom ulju sa MIC vrednostima od 1,56 do 3,12 $\mu\text{l/ml}$ i MFC vrednostima od 3,12 do 25 $\mu\text{l/ml}$. Primenom makrodilucione kontaktne metode sa suspenzijom spora potvrđeni su rezultati iz preliminarne mikrodilucione metode, gde je vrednost MIC za skoro sve testirane izolate iznosila 4 $\mu\text{l/ml}$, dok MFC vrednosti nisu zabeležene. Inhibicije porasta micelije testiranih izolata *Trichoderma* spp. na koncentracijama nižim od MIC bile su u opsegu od 2,74 do 78,5%. Direktni uticaj ulja na razvoj micelije ispitan je kontaktnom metodom sa isečkom micelije, gde su zabeleženi nešto slabiji rezultati, jer su MIC vrednosti utvrđene samo za određene izolate i vrste. Prosečna inhibicija porasta micelije primenom ove metode je bila u opsegu od 1,63 do 87,52%.

Pored kontaktnog delovanja, ispitana je mogućnost delovanja etarskog ulja gasovitom fazom primenom makrodilucione fumigantne metode. Delovanju gasovite faze bile su izložene spore i isecci micelije testiranih izolata. Primenom fumigantne metode nisu zabeležene MFC vrednosti niti MIC vrednosti u metodi sa isečcima, dok su u metodi sa sporama MIC vrednosti bile utvrđene samo za određene izolate i vrste (0,16 - 0,32 $\mu\text{l/ml}$ vazdušne faze). Prosečni procenti inhibicije porasta micelije patogeno primenom metode sa sporama su bili u opsegu od 19,43 do 95,57%, dok su u metodi sa isečkom micelije bili od 6,69 do 88,68%. Rezultati makrodilucione metode ukazuju da je kontaktno delovanje ulja bilo jače prema sporama testiranih izolata, a isto tako je i fumigantno delovanje bilo jače prema sporama micelije.

5.8.5. Uporedna analiza antifungalnog delovanja etarskih ulja u *in vitro* testovima

Etarska ulja četiri odabrane biljne vrste iz familije Lamiaceae (majčina dušica, pitoma nana, divlja nana i bosiljak) ispoljila su inhibitorni efekat prema svim testiranim izolatima *Trichoderma* spp. Iz ove grupe ulja, fungicidni efekat prema svim testiranim izolatima ispoljilo je etarsko ulje majčine dušice, dok za ulja divlje i pitome nane fungicidni efekat nije zabeležen jedino za izolate sa šampinjona (*T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. pholiotae* i *T. guizhouense*). Etarsko ulje bosiljka ispoljilo je fungicidni efekat jedino prema mađarskim izolatima sa bukovače. Mađarski i hrvatski izolati sa bukovače bili su osetljiviji na ulja divlje i pitome nane, a otporniji na ulje majčine dušice. Makedonski izolati sa bukovače bili su osetljiviji na ulje majčine dušice, a otporniji na ulja nana. Ulje bosiljka ispoljilo je ujednačeno delovanje prema svim izolatima. Inhibitorno delovanje ulja mirođije bilo je ujednačeno prema svim izolatima, a pored visokog stepena inhibicije za ovo ulje je zabeleženo jako fungicidno delovanje prema svim izolatima.

Takođe, zabeleženo je ujednačeno inhibitorno delovanje etarskog ulje hajdučke trave prema svim izolatima. Međutim, za etarsko ulje hajdučke trave nije utvrđeno fungicidno delovanje. Etarsko ulje kantariona je pokazalo stimulatívno delovanje. Inhibicija izolata etarskim uljima četiri zimzelene biljke (jele, tuje, bora i kleke) razlikovala se od izolata do izolata za jednu vrednost manje od najveće testirane koncentracije ili je bila veća od nje.

Fungicidno delovanje mikrodilucionom kontaktnom metodom (Prilog 4; Slike P4-1 – P4-3) prema svim vrstama ispoljila su etarska ulja mirođije i majčine dušice. Etarska ulja divlje i pitome nane ispoljila su fungicidni efekat primenom kontaktne metode samo prema vrstama izolovanim iz gajilišta bukovače i šitake (*T. pleuroti*, *T. pleuroticola*, *T. simmonsii*, *T. afroharzianum*, *T. guizhouense* i *T. cf. harzianum*). Fungicidno delovanje preostalih sedam ulja primenom ove metode nije zabeleženo. Najbolje inhibitorno delovanje ispoljilo je ulje mirođije, a zatim slede ulja biljaka iz familije Lamiaceae (majčina dušica, divlja nana, pitoma nana i bosiljak). Delimično inhibitorno delovanje (samo prema određenim vrstama) ispoljila su etarska ulja hajdučke trave i četiri zimzelene biljke (jela, kleka, tuja i bor). Inhibitorni efekat nije zabeležen samo za etarsko ulje kantariona.

Najjači efekat ($\mu\text{l/ml}$) prema vrsti *T. aggressivum* f. *europaeum* ispoljila su etarska ulja mirođije (MIC=1,56; MFC=6,25) i majčine dušice (MIC=3,12; MFC=12,5), zatim ulja bosiljka i pitome nane (MIC=3,12), kao i ulje divlje nane (MIC=6,25), dok su najslabije delovala ulja jele, tuje i kantariona (MIC>25). Prema vrstama *T. pleuroticola* i *T. pleuroti*, etarska ulja mirođije (MIC=3,12; MFC=3,12 i 6,25) i majčine dušice (MIC=1,56; MFC=12,5 i 25), zatim ulje divlje nane (MIC=3,12;

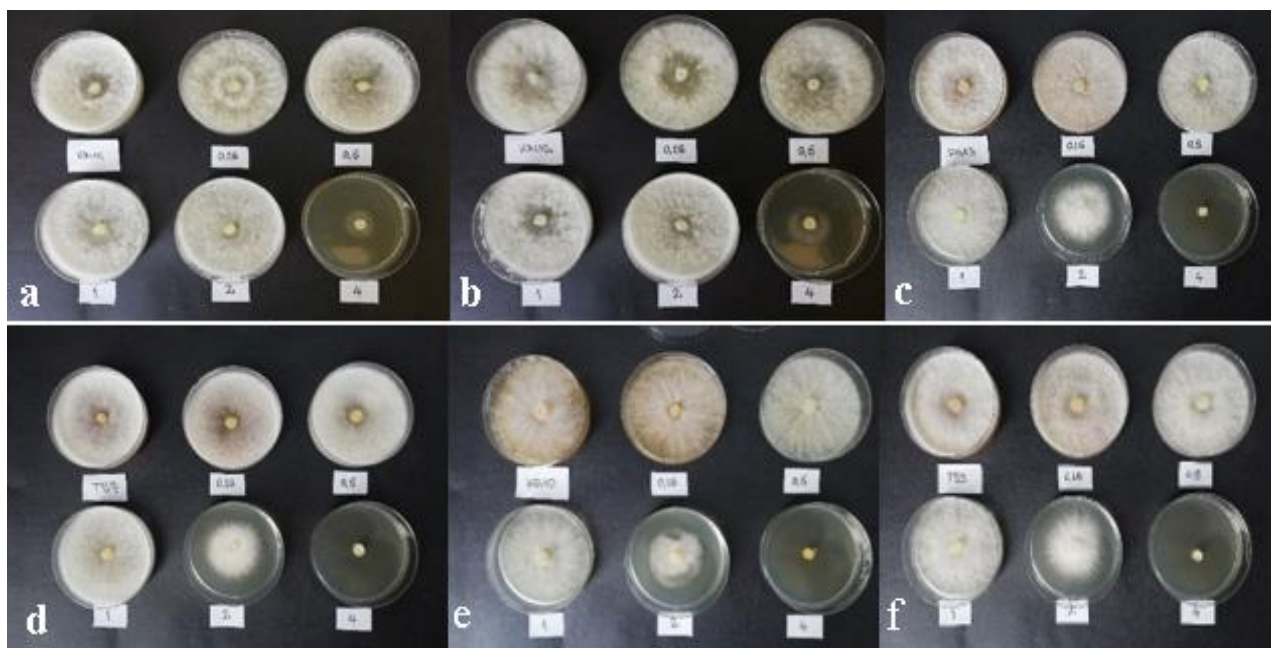
MFC=12,5) i ulja pitome nane (MIC=6,25 i 3,12; MFC=12,5 i 25) i bosiljka (MIC=3,12 i 6,25) ispoljila su najjači efekat, dok je ulje kantariona delovalo najslabije (MIC>25).

Prema vrstama *T. harzianum* kompleksa izolovanim iz gajilišta šampinjona (*T. guizhouense*, *T. pholiotae* i *T. atrobrunneum*), zabeleženo je ujednačeno delovanje svih ulja, a najosetljivija je bila vrsta *T. atrobrunneum* na koju jedino nisu delovala ulja tuje i kantariona (MIC>25). Prema vrstama *T. harzianum* kompleksa sa šiitake (*T. guizhouense* i *T. simmonsii*) jedino ulja bora i kantariona nisu delovala pri testiranim koncentracijama (MIC>25). Prema vrsti *T. guizhouense* nije zabeleženo ni delovanje ulja jele, a za ulja pitome nane, majčine dušice, bosiljka i mirođije zabeležene su niže vrednosti MIC i MFC u poređenju sa *T. simmonsii*, što ukazuje na njenu veću osetljivost prema ovim uljima. Takođe, zabeležena je minimalna razlika u delovanju pojedinih ulja prema izolatima *T. guizhouense* izolovanih iz gajilišta šampinjona u odnosu na izolate iste vrste izolovanih iz gajilišta šiitake. Sva testirana ulja su ujednačeno delovala na izolate *T. harzianum* kompleksa sa bukovače (*T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum*), sa skoro identičnim MIC i MFC vrednostima.

Primenom makrodilucione kontaktne metode sa suspenzijom spora potvrđeni su rezultati iz preliminarnog testa sa mikrodilucionom metodom za etarsko ulje mirođije, gde je vrednost MIC za skoro sve testirane izolate iznosila 4 µl/ml, dok MFC vrednosti nisu zabeležene (Slika 9). Direktni uticaj ulja mirođije na razvoj micelije ispitan je kontaktnom metodom sa isečkom micelije, gde su zabeležena nešto slabija delovanja, jer su MIC vrednosti utvrđene samo za pojedine izolate (Slika 10).



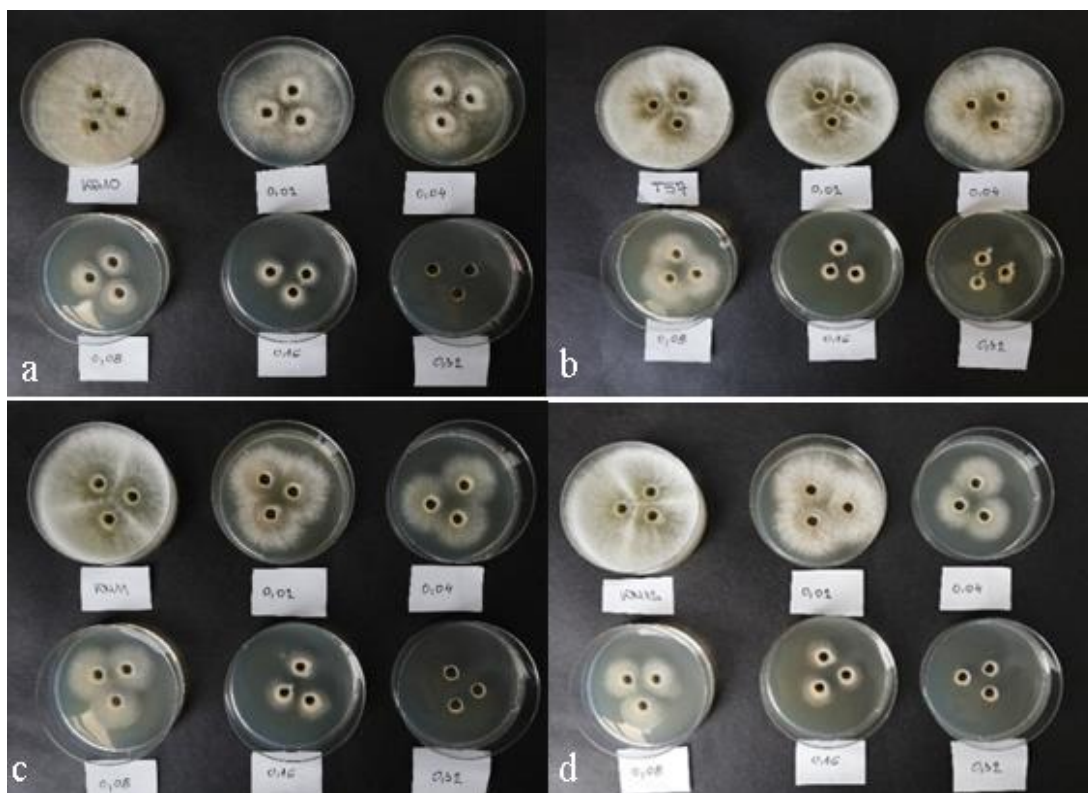
Slika 9. Delovanje etarskog ulja mirođije primenom makrodilucione kontaktne metode sa suspenzijom spora prema: *T. pleuroti* (a), *T. pleuroticola* (b), *T. aggressivum* f. *europaeum* (c), *T. simmonsii* (d), *T. afroharzianum* (f), *T. cf. harzianum* (g) i *T. guizhouense* (h-i).



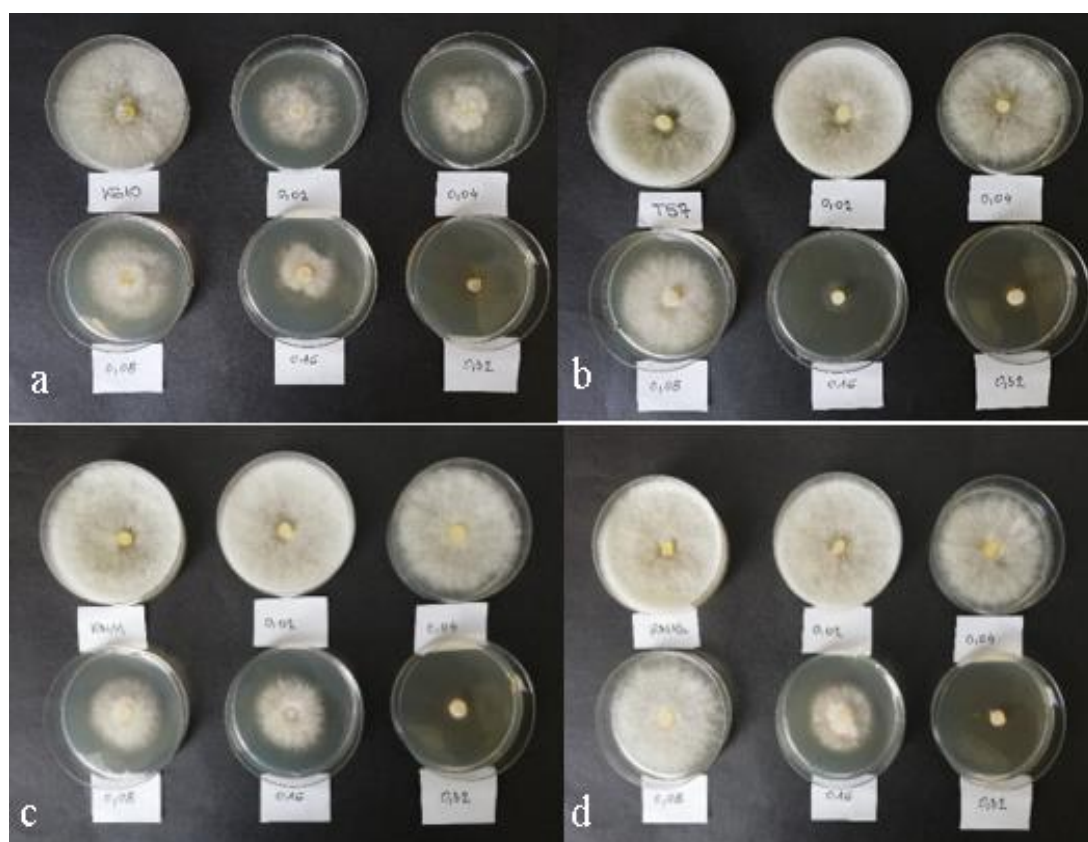
Slika 10. Delovanje etarskog ulja mirođije primenom makrodilucione kontaktne metode sa isečkom micelije prema: *T. pleuroti* (a), *T. pleurotica* (b), *T. cf. harzianum* (c), *T. simmonsii* (d), *T. afroharzianum* (e) i *T. guizhouense* (f)

Primenom fumigantnih metoda nije zabeležen fungicidni efekat pri testiranim koncentracijama, dok je potpuni inhibitorski efekat zabeležen samo za etarska ulja četiri biljke iz familije Lamiaceae (divlju nanu, pitomu nanu, majčinu dušicu i bosiljak). Etarsko ulje mirođije (Slika 12) ispoljilo je potpunu inhibiciju kljanja spora vrsta: *T. guizhouense*, *T. atrobrunneum*, *T. afroharzianum* (MIC=0,16) i *T. aggressivum* f. *europaeum* (MIC=0,32). Ujednačeno delovanje (MIC=0,16) na kljanje spora odabranih vrsta (*T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. pleuroti*, *T. pleurotica* i *T. cf. harzianum*) ispoljilo je etarsko ulje divlje nane (Slika 16), osim prema *T. guizhouense* (MIC>0,32). Ulje pitome nane (Slika 16) je najslabiji inhibitorski efekat ispoljilo prema *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. guizhouense* (MIC=0,32), dok je najjači efekat ispoljilo na kljanje spora vrste *T. pleurotica* (MIC=0,08). Najosetljiviji prema etarskom ulju majčine dušice (Slika 13) su bili izolati vrsta *T. guizhouense* (MIC=0,04) i *T. cf. harzianum* (MIC=0,02), dok je najotpornija bila vrsta *T. pleurotica* (MIC>0,32). Najbolji fumigantni efekat na kljanje spora svih testiranih vrsta ispoljilo je etarsko ulje bosiljka (Slika 13), prema kom je *T. pleurotica* bila najosetljivija (MIC=0,04). Malo manje osjetljive bile su *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum* i *T. pleuroti* (MIC=0,08), dok su *T. guizhouense* i *T. cf. harzianum* bile najotpornije (MIC=0,16).

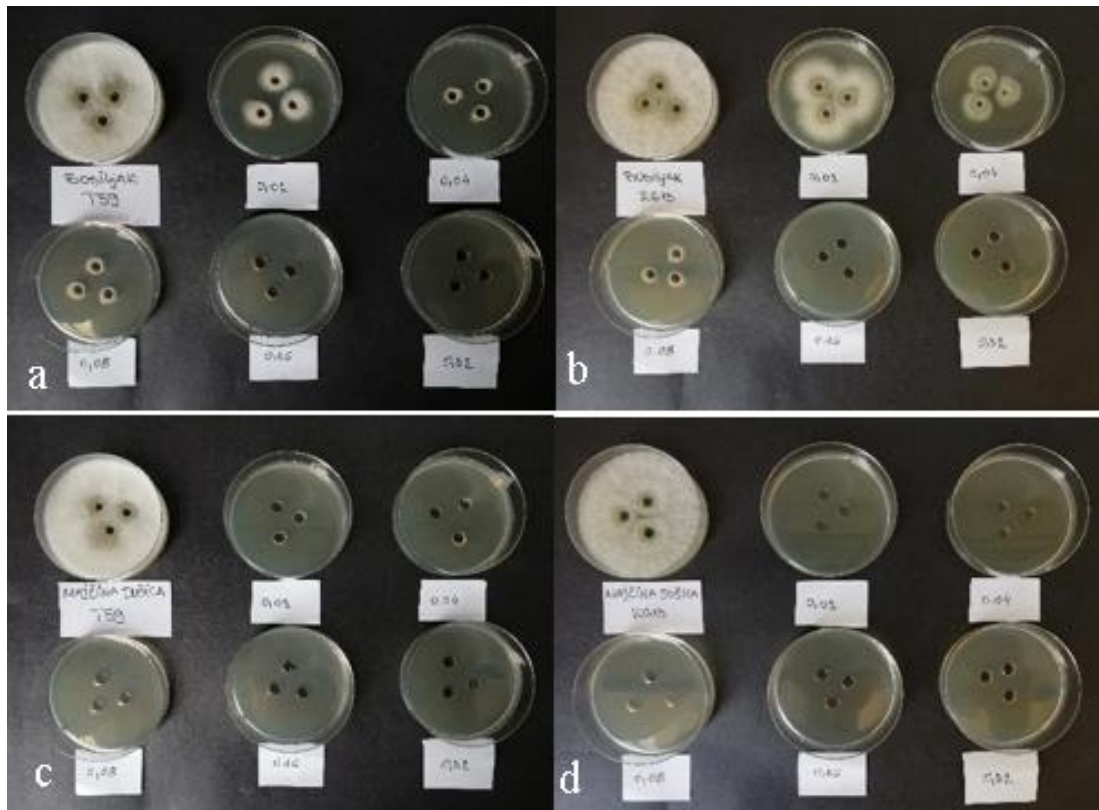
Slično delovanje zabeleženo je i primenom metode sa isečkom micelije, gde je takođe najjači efekat ispoljilo etarsko ulje bosiljka, prema kom je *T. pleurotica* bila najosetljivija (MIC=0,08), a *T. guizhouense* najotpornija (MIC=0,32). Delovanje bosiljka (Slika 15) prema ostalim vrstama bilo je ujednačeno (MIC=0,16). Takođe, delovanje pitome nane je bilo ujednačeno (MIC=0,16) prema svim vrstama, osim prema *T. atrobrunneum* (MIC=0,32). Etarsko ulje majčine dušice je ispoljilo delovanje slično pitomom nani, a jedino je vrsta *T. pleuroti* bila nešto osjetljivija prema ovom ulju u odnosu na ostale (MIC=0,08). Ulje divlje nane je najjače delovalo na porast micelije *T. atrobrunneum* (MIC=0,08), dok su izolati *T. guizhouense* i *T. cf. harzianum* bili najotporniji prema ovom ulju (MIC=0,32). Jedino za etarsko ulje mirođije nisu zabeležene MIC vrednosti (Slika 12).



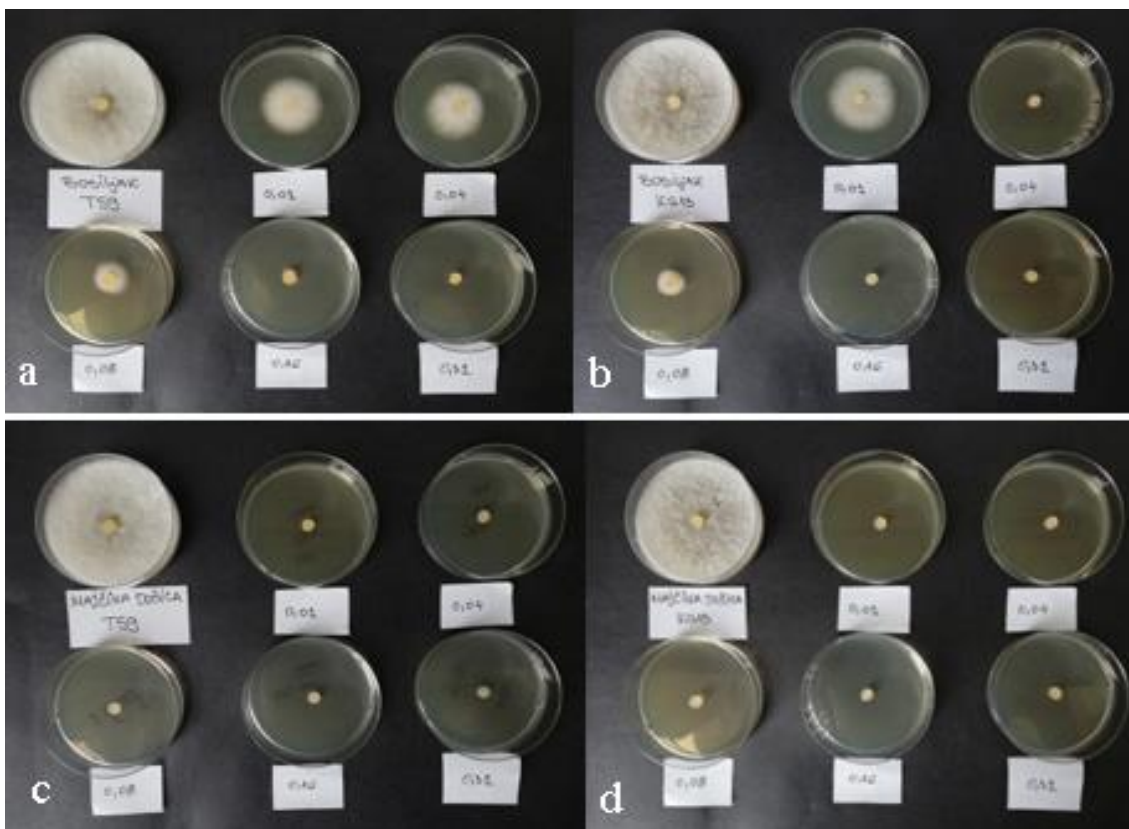
Slika 11. Delovanje etarskog ulja mirođije primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora prema: *T. afroharzianum* (a), *T. simmonsii* (b), *T. pleuroti* (c) i *T. pleuroticola* (d)



Slika 12. Delovanje etarskog ulja mirođije primenom makrodilucione fumigantne metode sa isečkom micelije prema: *T. afroharzianum* (a), *T. simmonsii* (b), *T. pleuroti* (c) i *T. pleuroticola* (d)

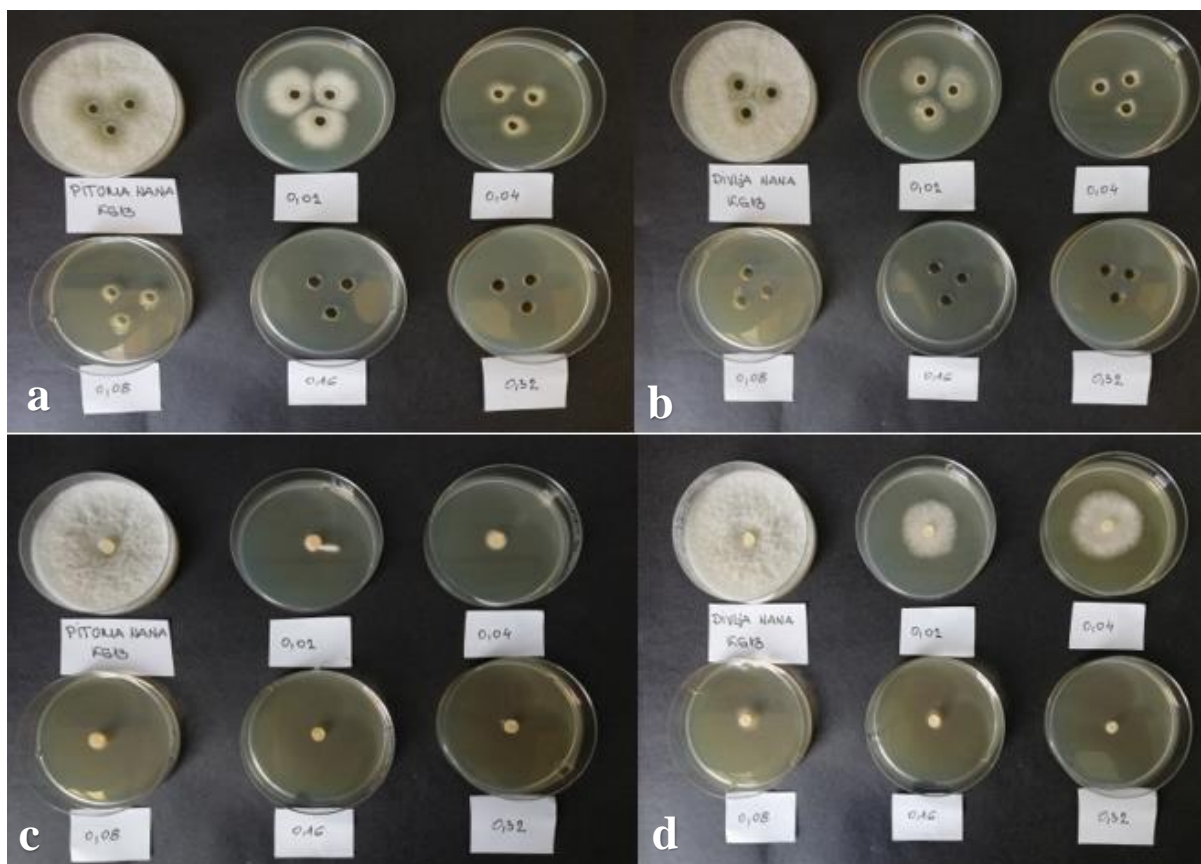


Slika 13. Delovanje etarskih ulja majčine dušice (c, d) i bosiljka (a, b) primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora prema: *T. guizhouense* (a, c) i *T. cf. harzianum* (b, d)



Slika 14. Delovanje etarskih ulja majčine dušice (c, d) i bosiljka (a, b) primenom makrodilucione fumigantne metode sa isečkom micelije prema *T. guizhouense* (a, c) i *T. cf. harzianum* (b, d)

Poređenjem fumigantnih metoda, može se zaključiti da je inhibicija klijanja spora i porasta micelije etarskim uljima divlje nane, pitome nane, majčine dušice i bosiljka bila ujednačena za vrste *T. pleuroti* i *T. atrobrunneum*, dok su spore vrsta *T. guizhouense* i *T. cf. harzianum* bile nešto osetljivije, a *T. aggressivum* f. *europaeum* neznatno otpornije.



Slika 15. Delovanje etarskih ulja pitome nane (a, c) i divlje nane (b, d) primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a, b) i isečkom micelije (c, d) prema *T. cf. harzianum*

5.9. Antifungalno delovanje kombinacija etarskih ulja *in vitro*

Sinergističko delovanje etarskih ulja je ispitano kroz tri uparene kombinacije etarskog ulja mirođije sa etarskim uljima majčine dušice, divlje nane i pitome nane. Kombinacije su odabrane na osnovu jačine ispoljenog antifungalnog delovanja pojedinačnih ulja prema izolatima *Trichoderma* spp. Prema tome, etarsko ulje mirođije koje je pokazalo najjaču antifungalnu aktivnost je kombinovano sa još tri ulja koja su posle njega pokazala najjače delovanje.

Tumačenja rezultata interakcije dva ulja se razlikuju u zavisnosti od autora i u ovom radu je odabrano tumačenje prema **Jasqueline et al.** (2005). Prema ovim autorima, interakcija dva etarska ulja može biti: sinergistička, ako je indeks $FiCi \leq 0,5$; aditivna ako je $FiCi$ između 0,5 i 2,0; indiferentna ako je $FiCi$ između 2,0 i 4,0 i antagonistička ako je $FiCi \geq 4,0$. Pod sinergizmom se smatra da je delovanje kombinacija dva jedinjenja/komponente veće od delovanja pojedinačnih jedinjenja/komponenti, a pod antagonizmom da je aktivnost dva jedinjenja/komponente manja od delovanja najaktivnijeg pojedinačnog jedinjenja/komponente. Aditivno delovanje se javlja kad je aktivnost kombinacija dva jedinjenja/komponente jednaka zbiru aktivnosti pojedinačnih jedinjenja/komponenti, dok se indiferentno delovanje javlja kada je aktivnost kombinacija dva jedinjenja/komponente jednaka aktivnosti najaktivnijeg jedinjenja/komponente.

5.9.1. Antifungalno delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i majčine dušice

Delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i majčine dušice praćeno je prema svih 22 izolata *Trichoderma* spp. Minimalne inhibitorne vrednosti odabranih ulja, kao i delovanje njihovih kombinacija prikazani su u Tabeli 18. Osetljivost vrsta prema delovanju odabrane kombinacije prikazana je kao prosek delovanja odgovarajućih izolata iskazan kroz FiCi indeks (Tabela 21).

Dobijeni rezultati delovanja kombinacije ulja mirođije i majčine dušice ukazuju na postojanje sinergističkog ili aditivnog dejstva prema izolatima *Trichoderma* spp. Sinergističko delovanje ove kombinacije ulja zabeleženo je prema: *T. guizhouense*; *T. simmonsii*; *T. pleuroti* i *T. pleurotica*, sa prosečnim vrednostima za indeks FiCi 0,12; 0,50; 0,49 i 0,37, dok je aditivno delovanje zabeleženo prema: *T. cf. harzianum*, *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. pholiotae*, *T. atrobrunneum* i *T. afroharzianum*, sa FiCi indeksima 0,56; 0,63; 1; 1,52 i 0,63. Izolat T52 (vrsta *T. guizhouense* sa šampinjona) je bio najotporniji sa FiCi indeksom 3, dok su najosetljiviji izolati bili T58, T59, T77 i T6 sa FiCi indeksima 0,12.

Tabela 18. Delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i majčine dušice prema *Trichoderma* spp.

Vrsta	Izolat	MIC EU M (μ l/ml)	FIC EU M	MIC EU MD (μ l/ml)	FIC EU MD	FiCi EU M + EU MD	Međusobno delovanje
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	1,56	0,50	3,12	0,06	0,56	aditivno
	T77	1,56	0,06	6,25	0,06	0,12	sinergističko
	T85	1,56	0,25	1,56	1,00	1,25	aditivno
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	1,56	0,50	6,25	0,06	0,56	aditivno
<i>T. pholiotae</i>	T10	1,56	0,50	1,56	0,50	1,00	aditivno
<i>T. guizhouense</i>	T52	1,56	2,00	3,12	1,00	3,00	indiferentno
	T58	1,56	0,06	6,25	0,06	0,12	sinergističko
	T59	1,56	0,06	6,25	0,06	0,12	sinergističko
<i>T. simmonsii</i>	T57	1,56	0,25	6,25	0,25	0,50	sinergističko
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	3,12	0,13	1,56	0,50	0,63	aditivno
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	3,12	0,50	1,56	0,06	0,56	aditivno
<i>T. pleurotica</i>	KG6	1,56	0,13	6,25	0,06	0,19	sinergističko
	KM4	3,12	0,13	1,56	0,06	0,19	sinergističko
	KM5	3,12	0,25	1,56	0,06	0,31	sinergističko
	KM12	3,12	1,00	1,56	0,06	1,06	aditivno
	T7	3,12	0,06	6,25	0,25	0,31	sinergističko
	23033	1,56	0,06	6,25	0,06	0,12	sinergističko
<i>T. pleuroti</i>	KM6	3,12	0,25	1,56	1,00	1,25	aditivno
	KM8	3,12	0,25	1,56	0,06	0,31	sinergističko
	KM11	3,12	0,50	1,56	0,06	0,56	aditivno
	T6	1,56	0,06	6,25	0,06	0,12	sinergističko
	12454	1,56	0,13	6,25	0,06	0,19	sinergističko

MIC-minimalna inhibitorna koncentracija; FIC-frakciona inhibitorna koncentracija; FiCi-frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks; EU-etarsko ulje; M-mirođija; MD- majčina dušica

5.9.2. Antifungalno delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i divlje nane

Delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i divlje nane ispitano je prema svih 22 izolata *Trichoderma* spp. Minimalne inhibitorne vrednosti odabranih ulja, kao i delovanje njihovih kombinacija prikazani su u Tabeli 19. Osetljivost vrsta prema delovanju odabrane kombinacije prikazana je kao prosek delovanja odgovarajućih izolata iskazan kroz FiCi indeks (Tabela 21).

Analiziranjem dobijenih rezultata može se zaključiti da kombinacija ova dva ulja pokazuje sinergističko delovanje prema skoro svim testiranim vrstama sa ujednačenim prosečnim vrednostima za FiCi indekse od: 0,31 za *T. aggressivum* f. *aggressivum*; 0,33 za *T. atrobrunneum*; 0,50 za *T. simmonsii*; 0,25 za *T. guizhouense*; 0,19 za *T. afroharzianum*; 0,38 za *T. cf. harzianum*; 0,33 za *T. pleurotica* i 0,34 za *T. pleuroti*. Jedino je za vrstu *T. pholiotae* zabeleženo aditivno delovanje sa FiCi indeksom od 0,62. U delovanju na različite izolate postoje određena variranja i razlike u vrednostima za FiCi indekse, pa je kod pojedinih izolata zabeleženo i aditivno delovanje (T10, 23033 i KM8), sa FiCi indeksima bliskim granici za sinergističko delovanje. Najosetljiviji izolat prema ovoj kombinaciji ulja bio je izolat KM4 (FiCi=0,09), dok je najotporniji bio izolat KM8 (FiCi=0,63).

Tabela 19. Delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i divlje nane prema *Trichoderma* spp.

Vrsta	Izolat	MIC EU M (μ l/ml)	FIC EU M	MIC EU DN (μ l/ml)	FIC EU DN	FiCi EU M + EU DN	Medusobno delovanje
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	1,56	0,13	6,25	0,12	0,25	sinergističko
	T77	1,56	0,06	6,25	0,25	0,31	sinergističko
	T85	1,56	0,13	6,25	0,25	0,37	sinergističko
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	1,56	0,12	12,5	0,06	0,19	sinergističko
<i>T. pholiotae</i>	T10	1,56	0,50	6,25	0,12	0,62	aditivno
<i>T. guizhouense</i>	T52	1,56	0,13	12,5	0,06	0,19	sinergističko
	T58	1,56	0,25	3,12	0,13	0,38	sinergističko
	T59	1,56	0,13	3,12	0,06	0,19	sinergističko
<i>T. simmonsii</i>	T57	1,56	0,25	3,12	0,25	0,50	sinergističko
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	3,12	0,13	3,12	0,06	0,19	sinergističko
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	3,12	0,25	3,12	0,13	0,38	sinergističko
<i>T. pleurotica</i>	KG6	1,56	0,25	3,12	0,13	0,38	sinergističko
	KM4	3,12	0,06	3,12	0,03	0,09	sinergističko
	KM5	3,12	0,13	3,12	0,13	0,25	sinergističko
	KM12	3,12	0,25	3,12	0,25	0,50	sinergističko
	T7	3,12	0,13	1,56	0,06	0,19	sinergističko
	23033	1,56	0,06	1,56	0,50	0,56	aditivno
	<i>T. pleuroti</i>	KM6	3,12	0,25	3,12	0,06	0,31
	KM8	3,12	0,13	1,56	0,50	0,63	aditivno
	KM11	3,12	0,25	6,25	0,12	0,37	sinergističko
	T6	1,56	0,06	1,56	0,06	0,13	sinergističko
	12454	1,56	0,06	3,12	0,06	0,13	sinergističko

MIC-minimalna inhibitorna koncentracija; FIC-frakciona inhibitorna koncentracija; FiCi-frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks; EU-etarsko ulje; M-mirođija; DN-divlja nana

5.9.3. Antifungalno delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i pitome nane

Delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i pitome nane praćeno je prema svih 22 izolata *Trichoderma* spp. Minimalne inhibitorne vrednosti odabranih ulja, kao i delovanje njihovih kombinacija prikazani su u Tabeli 20. Osetljivost vrsta prema delovanju odabrane kombinacije prikazana je kao prosek delovanja odgovarajućih izolata iskazan kroz FiCi indeks (Tabela 21).

Kombinacija ulja mirođije i pitome nane je ispoljila najslabiju aktivnost među tri izabrane kombinacije, sa sinergistićkim delovanjem samo prema polovini testiranih izolata i aditivnim prema drugoj polovini testiranih izolata. Sinergizam je zabeležen prema: *T. aggressivum* f. *aggressivum*; *T. simmonsii*; *T. guizhouense* (izolati T58 i T59 sa šitake) i *T. cf. harzianum* sa FiCi indeksima 0,50; 0,19; 0,44 i 0,38, dok je aditivno delovanje uočeno prema: *T. pholiotae*, *T. atrobrunneum*, *T. afroharzianum*; *T. pleurotica* i *T. pleuroti* izolatima sa bukovaće, kao i prema *T. guizhouense* sa šampinjona (izolat T52), sa FiCi indeksima 0,77; 0,75; 0,54 i 0,56. Najosetljiviji izolat prema ovoj kombinaciji ulja bio je T77 (FiCi=0,12), dok je najotporniji KG13 (FiCi=1,25).

Tabela 20. Delovanje kombinacije etarskih ulja mirođije i pitome nane prema *Trichoderma* spp.

Vrsta	Izolat	MIC EU M (µl/ml)	FIC EU M	MIC EU PN (µl/ml)	FIC EU PN	FiCi EU M + EU PN	Međusobno delovanje
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T76	1,56	0,50	3,12	0,25	0,75	aditivno
	T77	1,56	0,06	12,5	0,06	0,12	sinergistićko
	T85	1,56	0,50	3,12	0,13	0,63	aditivno
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	1,56	0,13	6,25	0,50	0,62	aditivno
<i>T. pholiotae</i>	T10	1,56	1,00	3,12	0,13	1,13	aditivno
<i>T. guizhouense</i>	T52	1,56	0,50	12,5	0,06	0,56	aditivno
	T58	1,56	0,20	3,12	0,39	0,25	sinergistićko
	T59	1,56	0,78	3,12	0,39	0,63	aditivno
<i>T. simmonsii</i>	T57	1,56	0,13	6,25	0,06	0,19	sinergistićko
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	3,12	0,50	1,56	0,25	0,75	aditivno
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	3,12	0,13	3,12	0,25	0,38	sinergistićko
<i>T. pleurotica</i>	KG6	1,56	1,00	3,12	0,25	1,25	aditivno
	KM4	3,12	0,13	3,12	0,13	0,25	sinergistićko
	KM5	3,12	0,13	6,25	0,25	0,37	sinergistićko
	KM12	3,12	0,25	6,25	0,06	0,31	sinergistićko
	T7	3,12	0,25	1,56	0,06	0,31	sinergistićko
	23033	1,56	0,25	1,56	0,50	0,75	aditivno
	T6	1,56	0,13	1,56	1,00	1,13	aditivno
<i>T. pleuroti</i>	KM6	3,12	0,25	3,12	0,50	0,75	aditivno
	KM8	3,12	0,25	3,12	0,06	0,31	sinergistićko
	KM11	3,12	0,25	3,12	0,06	0,31	sinergistićko
	T6	1,56	0,13	1,56	1,00	1,13	aditivno
	12454	1,56	0,25	1,56	0,06	0,31	sinergistićko

MIC-minimalna inhibitorna koncentracija; FIC-frakciona inhibitorna koncentracija; FiCi-frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks; EU-etarsko ulje; M-mirođija; PN-pitoma nana

5.9.4. Uporedna analiza antifungalnog delovanja kombinacija etarskih ulja

Primenom *Checkerboard* metode ispitivano je delovanje tri kombinacije etarskih ulja, gde je etarsko ulje sa najjačim antifungalnim delovanjem u pojedinačnim testiranjima (mirođija) kombinovano sa još tri ulja koja su po aktivnosti bila odmah iza njega (majčina dušica, divlja nana i pitoma nana). Sve tri kombinacije ispoljile su sinergističko ili aditivno dejstvo, što ukazuje da je kombinovanje ulja opravdano i delotvorno. Antagonizam nije zabeležen ni kod jedne kombinacije. Najbolja je bila kombinacija mirođije i divlje nane, koja je prema svim testiranim vrstama ispoljila sinergistički efekat delovanja sa FiCi indeksima od 0,19 do 0,50, osim prema vrsti *T. pholiotae*, prema kojoj je delovala aditivno sa FiCi indeksom od 0,62 (Tabela 21). Najosetljivije vrste prema ovoj kombinaciji bila su *T. afroharzianum* i *T. atrobrunneum*, dok je najotpornija bila *T. pholiotae*. Kombinacije mirođije sa uljima pitome nane i majčine dušice pokazale su nešto slabije dejstvo, jer je kod pojedinih vrsta zabeleženo aditivno delovanje. Najslabija je bila kombinacija ulja mirođije i pitome nane sa FiCi indeksima od 0,19 do 1,13. Najosetljivija vrsta prema ovoj kombinaciji ulja je bila *T. simmonsii*, a najotpornija *T. pholiotae*. Vrednosti FiCi indeksa za kombinaciji mirođija i majčina dušica su bili u opsegu od 0,37 do 1,06. Vrsta *T. pleuroticola* je bila najosetljivija prema ovoj kombinaciji, dok je najotpornija bila *T. guizhouense*. Generalno, najosetljivije vrste prema sve tri kombinacije ulja bile su *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. simmonsii*, dok je najotpornija bila vrsta *T. pholiotae*.

Tabela 21. Delovanje tri kombinacije etarskih ulja prema vrstama roda *Trichoderma*, prouzrokovateljima zelene plesni jestivih gljiva

Vrsta	FiCi EU M + EU MD	Medusobno delovanje	FiCi EU M + EU DN	Medusobno delovanje	FiCi EU M + EU PN	Medusobno delovanje
<i>T. aggressivum*</i>	0,49	sinergističko	0,31	sinergističko	0,50	sinergističko
<i>T. atrobrunneum</i>	0,56	aditivno	0,19	sinergističko	0,62	aditivno
<i>T. afroharzianum</i>	0,63	aditivno	0,19	sinergističko	0,75	aditivno
<i>T. guizhouense</i>	1,06	aditivno	0,25	sinergističko	0,48	sinergističko
<i>T. cf. harzianum</i>	0,56	aditivno	0,38	sinergističko	0,38	sinergističko
<i>T. simmonsii</i>	0,50	sinergističko	0,50	sinergističko	0,19	sinergističko
<i>T. pholiotae</i>	1,00	aditivno	0,62	aditivno	1,13	aditivno
<i>T. pleuroticola</i>	0,37	sinergističko	0,33	sinergističko	0,54	aditivno
<i>T. pleuroti</i>	0,49	sinergističko	0,34	sinergističko	0,56	aditivno

FiCi-frakcioni inhibicioni koncentracioni indeks; EU-etarsko ulje; M-mirođija; MD-majčina dušica; DN-divlja nana; PN-pitoma nana; * *T. aggressivum* f. *europaeum*

5.10. Osetljivost izolata *Trichoderma* spp. prema fungicidima

Osetljivost svih testiranih izolata *Trichoderma* spp. prema fungicidima prochlorazu (16 izolata: 12 iz ovih istraživanja i 4 iz kolekcije Univerziteta u Segedinu) i metrafenonu (22 izolata: 12 iz ovih istraživanja, 6 iz kolekcije Instituta za pesticide i 4 iz kolekcije Univerziteta u Segedinu) prikazana je u Tabelama 22 i 23. Ispitivani izolati su na osnovu EC₅₀ vrednosti grupisani na: visoko osetljive umereno osetljive i rezistentne (Gea et al., 1996; Grogan et al., 2000), dok su na osnovu vrednosti faktora rezistentnosti (RF) grupisani na: umereno osetljive, umereno rezistentne i visoko rezistentne (Gout, 1994). Svi testirani izolati pokazali su visok nivo osetljivosti prema oba fungicida.

Svi testirani *Trichoderma* spp. izolati pokazali su visok nivo osetljivosti prema fungicidu metrafenonu sa EC₅₀ vrednostima od 0,03 (KM11, KG6 i T10) do 2,91 µg/ml (T57) (Tabela 22). Vrednosti EC₅₀ za pojedine vrste su bile: *T. pleuroti* 0,03 - 0,65 µg/ml; *T. pleuroticola* 0,03 - 0,17 µg/ml; *T. pholiotae* 0,03 µg/ml; *T. aggressivum* f. *aggressivum* 0,04 - 0,99 µg/ml; *T. atrobrunneum*

1,26 µg/ml; *T. simmonsii* 2,91 µg/ml; *T. guizhouense* 0,09 - 0,25 µg/ml; *T. afroharzianum* 0,05 µg/ml i *T. cf. harzianum* 0,05 µg/ml. Najosetljivije vrste prema fungicidu metrafenonu bile su *T. pholiotae*, *T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum* sa EC₅₀ vrednostima 0,03 odnosno 0,05 µg/ml. Vrednosti RF su bile od 1 do 42, pri čemu je većina izolata svrstana u osjetljive. U grupu umereno rezistentnih svrstani su izolati: KM12, 23033, KM6, 12454 i T57, dok su izolati T76 i T54 svrstani u rezistentne. Najrezistentniji je bio izolat T54 sa vrednošću RF 42.

Tabela 22. Parametri osjetljivosti *Trichoderma* spp. izolata prema fungicidu metrafenonu

Vrsta	Izolat	EC ₅₀ (µg/ml) ¹ CI 95%	EC ₉₀ (µg/ml) ² CI 95%	b CI 95%	H	RF	
<i>T. aggressivum f. europaeum</i>	T76	0,99 (0,38-6,37)	339,04 (31,15-44×10 ³)	0,51 (0,42-0,60)	2,31	24,75	
	T77	0,04 (0,03-0,07)	6,38 (1,89-50,07)	0,58 (0,50-0,66)	0,32	1,00	
	T85	0,11 (0,04-0,99)	4925,55 (64,6-11×10 ⁹)	0,28 (0,21-0,35)	1,51	2,75	
<i>T. atrobrunneum</i>	T54	1,26 (0,41-12,63)	802,0 (51,35-42×10 ⁴)	0,45 (0,36-0,54)	0,77	42,00	
<i>T. pholiotae</i>	T10	0,03 (0,01-0,05)	50,7 (5,66-6888,7)	0,39 (0,31-0,47)	1,61	1,00	
<i>T. guizhouense</i>	T52	0,09 (0,06-0,17)	9,04 (2,29-140,88)	0,64 (0,53-0,75)	2,82	3,00	
	T58	0,25 (0,15-0,55)	16,95 (4,76-137,21)	0,70 (0,61-0,79)	0,61	1,56	
	T59	0,16 (0,08-0,47)	85,16 (10,99-4938)	0,47 (0,39-0,55)	0,23	1,00	
	T57	2,91 (0,42-5679)	302367,98 (607-6,9×10 ¹⁵)	0,26 (0,18-0,34)	0,26	18,19	
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	0,05 (0,04-0,06)	0,76 (0,45-1,53)	1,07 (0,98-1,16)	0,57	1,25	
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	0,04 (0,03-0,06)	0,47 (0,26-1,16)	1,23 (1,10-1,36)	2,11	1,00	
<i>T. pleurotica</i>	KG6	0,03 (0,02-0,04)	2,73 (1,19-431,54)	0,77 (0,61-0,93)	2,14	1,00	
	KM4	0,05 (0,03-0,06)	0,45 (0,29-0,98)	1,31 (1,23-1,39)	0,69	1,00	
	KM5	0,06 (0,04-0,08)	1,10 (0,53-4,73)	0,99 (0,81-1,17)	1,55	1,20	
	KM12	0,17 (0,09-0,42)	41,70 (7,52-968,12)	0,54 (0,46-0,62)	0,30	3,40	
	T7	0,06 (0,03-0,13)	32,34 (4,01-7686,95)	0,47 (0,36-0,58)	0,03	2,00	
	23033	0,17 (0,08-0,68)	300,55 (20,94-13×10 ⁴)	0,39 (0,31-0,47)	0,78	5,67	
	<i>T. pleuroti</i>	KM6	0,12 (0,07-0,26)	25,85 (5,38-431,54)	0,55 80,47-0,639	1,60	4,00
		KM8	0,07 (0,04-0,12)	11,53 (2,97-120,64)	0,57 (0,49-0,65)	0,45	2,33
		KM11	0,03 (0,02-0,05)	1,50 (0,70-4,71)	0,77 (0,71-0,85)	2,45	1,00
		T6	0,09 (0,05-0,27)	127,78 (12,09-21×10 ⁴)	0,41 (0,33-0,49)	1,16	1,80
12454		0,65 (0,20-11,02)	3801,71 (87,6-103×10 ⁶)	0,34 (0,26-0,42)	0,14	13,00	

EC₅₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 50% porasta micelije; EC₉₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 90% porasta micelije; CI - interval poverenja; b - koeficijent regresije; H – heterogenost; RF – faktor rezistentnosti

Svi testirani *Trichoderma* spp. izolati su pokazali još veću osetljivost prema fungicidu prochlorazu, sa EC₅₀ vrednostima od 0,004 (KG6 i KM8) do 0,14 µg/ml (12454) (Tabela 23). Vrednosti EC₅₀ za pojedine vrste su bile: *T. pleuroti* 0,004 - 0,14 µg/ml; *T. pleurotica* 0,004 - 0,01 µg/ml; *T. simmonsii* 0,01 µg/ml, *T. guizhouense* 0,02 - 0,05 µg/ml; *T. afroharzianum* 0,01 µg/ml i *T. cf. harzianum* 0,02 µg/ml. Vrednosti RF su bile od 1 do 28, pri čemu je većina vrsta bila svrstana u grupu osetljivih. U umereno rezistentne svrstani su izolati: T6, T7, 23033 i T59, dok je u rezistentne svrstan jedino izolat 12454. Najosetljiviji izolati su bili: KM8, KG6, KG10 i T57 (RF=1). Najosetljivije vrste prema fungicidu prochlorazu su bile *T. pleurotica* sa prosečnom vrednošću EC₅₀ 0,01 µg/ml, kao i *T. afroharzianum* i *T. simmonsii* predstavljeni sa po jednim izolatom.

Tabela 23. Parametri osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata prema fungicidu prochlorazu

Vrsta	Izolat	EC ₅₀ (µg/ml) ¹ CI 95%	EC ₉₀ (µg/ml) ² CI 95%	b CI 95%	H	RF
<i>T. simmonsii</i>	T57	0,01 (0,01-0,01)	0,17 (0,11-0,31)	0,95 (0,86-1,04)	1,52	1,00
<i>T. guizhouense</i>	T58	0,02 (0,02-0,03)	0,71 (0,38-1,76)	0,71 (0,38-1,76)	0,43	2,00
	T59	0,05 (0,04-0,07)	0,63 (0,40-1,17)	1,17 (0,97-1,27)	1,28	5,00
<i>T. afroharzianum</i>	KG10	0,01 (0,00-0,02)	0,33 (0,20-0,69)	0,33 (0,20-0,69)	0,05	1,00
<i>T. cf. harzianum</i>	KG13	0,02 (0,01-0,03)	1,16 (0,54-3,67)	1,16 (0,54-3,67)	0,36	2,00
<i>T. pleurotica</i>	KG6	0,004 (0,002-0,006)	0,17 (0,10-0,36)	0,17 (0,10-0,36)	1,84	1,00
	KM4	0,01 (0,00-0,01)	0,17 (0,10-0,36)	0,17 (0,10-0,36)	1,46	2,00
	KM5	0,01 (0,01-0,02)	0,31 (0,19-0,61)	0,96 (0,87-1,05)	1,43	2,00
	KM12	0,005 (0,003-0,009)	0,10 (0,06-0,18)	1,02 (0,87-1,17)	0,16	1,25
	T7	0,03 (0,02-0,04)	1,84 (0,80-6,59)	1,84 (0,80-6,59)	1,27	7,50
<i>T. pleuroti</i>	23033	0,03 (0,03-0,05)	0,47 (0,30-0,85)	0,47 (0,30-0,85)	2,54	7,50
	KM6	0,01 (0,01-0,01)	0,17 (0,11-0,32)	0,17 (0,11-0,32)	0,84	2,50
	KM8	0,004 (0,002-0,006)	0,16 (0,08-0,52)	0,78 (0,66-0,90)	2,06	1,00
	KM11	0,005 (0,003-0,007)	0,10 (0,06-0,19)	0,99 (0,89-1,09)	1,17	1,25
	T6	0,02 (0,01-0,03)	0,31 (0,20-0,56)	0,31 (0,20-0,56)	0,72	4,00
	12454	0,14 (0,11-0,18)	0,84 (0,54-1,66)	0,84 (0,54-1,66)	0,03	28,00

EC₅₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 50% porasta micelije; EC₉₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 90% porasta micelije; CI - interval poverenja; b - koeficijent regresije; H – heterogenost; RF – faktor rezistentnosti

5.11. Selektivna toksičnost antifungalnih jedinjenja za jestive gljive

Selektivna toksičnost antifungalnih jedinjenja prikazuje se kroz indeks selektivnosti, koji se izračunava kao odnos EC₅₀ vrednosti za patogenu gljivu (*Trichoderma* spp.) i odgovarajuće vrednosti za domaćina (jestivu gljivu). Ukoliko je vrednost indeksa selektivnosti manja, utoliko je selektivnost

antifungalnog jedinjenja veća, odnosno to jedinjenje je dovoljno toksično za ciljanog patogena, a u isto vreme ne ispoljava toksičan efekat na rast i razvoj jestive gljive.

Osetljivost jestivih gljiva ispitana je *in vitro* primenom makrodilucione metode (Slike 16-18). U Tabeli 24 prikazani su parametri osetljivosti prema etarskom ulju mirođije i fungicidima metrafenonu i prohlorazu za tri jestive gljive domaćina: šampinjon(soj A15), bukovaču (soj P80) i šiitake (soj 237). Najosetljiviji domaćin, prema sva tri testirana jedinjenja, bio je šampinjon. Sve tri jestive gljive pokazale su visoku osetljivost prema etarskom ulju mirođije sa EC₅₀ vrednostima od 0,06 do 0,74 µg/ml, dok su najotpornije bile prema fungicidu metrafenonu sa EC₅₀ od 0,66 do 5,93 µg/ml. Osetljivost je zabeležena i prema fungicidu prohlorazu sa EC₅₀ od 0,1 do 1,91 µg/ml.

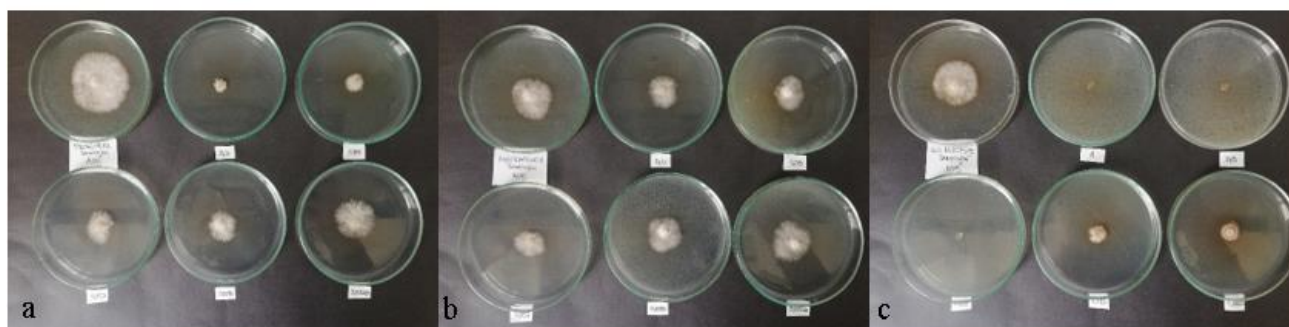
Tabela 24. Osetljivost jestivih gljiva prema antifungalnim jedinjenjima

Antifungalno jedinjenje	Parametar osetljivosti	Šampinjon A15	Bukovača P80	Šiitake 237
Etarsko ulje mirođije	EC ₅₀ (µg/ml)	0,06	0,74	0,34
	CI 95%	(0,04-0,08)	(0,50-1,56)	(0,30-0,38)
	EC ₉₀ (µg/ml)	2,08	7,60	0,80
	CI 95%	(0,81-12,71)	(2,88-62,82)	(0,69-0,94)
	b	0,83	1,26	3,46
Fungicid metrafenon	CI 95%	(0,70-0,96)	(1,02-1,50)	(3,11-3,81)
	H	0,35	0,28	3,06
	EC ₅₀ (µg/ml)	0,66	5,93	5,93
	CI 95%	(0,22-7,17)	(1,58-114,5)	(1,42-137,7)
	EC ₉₀ (µg/ml)	1529,04	3195,78	994,39
Fungicid prohloraz	CI 95%	(59,4-4×10 ⁶)	(149,4-3,7×10 ⁶)	(59,26-611×10 ³)
	b	0,38	0,47	0,57
	CI 95%	(0,30-0,46)	(0,37-0,55)	(0,46-0,68)
	H	0,28	1,33	0,54
	EC ₅₀ (µg/ml)	0,02	1,37	1,91
Fungicid prohloraz	CI 95%	(0,01-0,04)	(0,59-6,56)	(0,79-10,3)
	EC ₉₀ (µg/ml)	39,31	83,03	61,03
	CI 95%	(4,34-6730,38)	(13,7-2709,76)	(11,19-1706)
	b	0,37	0,72	0,85
	CI 95%	(0,30-0,44)	(0,60-0,84)	(0,71-0,99)
	H	1,12	1,68	0,09

EC₅₀ – efektivna koncentracija koja inhibira 50% porasta micelije; EC₉₀– efektivna koncentracija koja inhibira 90% porasta micelije; CI - interval poverenja; b - koeficijent regresije; H – heterogenost; np – nema podataka

5.11.1. Indeksi selektivnosti za šampinjon

Selektivna toksičnost etarskog ulja mirođije i fungicida metrafenona i prohloraza preko indeksa selektivnosti prikazana je u Tabeli 25. Najbolju selektivnost za šampinjon pokazao je fungicid metrafenon sa indeksom selektivnosti od 0,95, dok je indeks selektivnosti za fungicid prohloraz iznosio 11,4. Etarsko ulje mirođije pokazalo se kao najtoksičnije antifungalno jedinjenje za šampinjon u *in vitro* uslovima sa visokim indeksom selektivnosti od čak 23,09.



Slika 16. Osetljivost šampinjona prema prohlorazu (a), metrafenonu (b) i etarskom ulju mirođije (c)

Tabela 25. Selektivna toksičnost testiranih antifungalnih jedinjenja za *Trichoderma* spp. i šampinjon

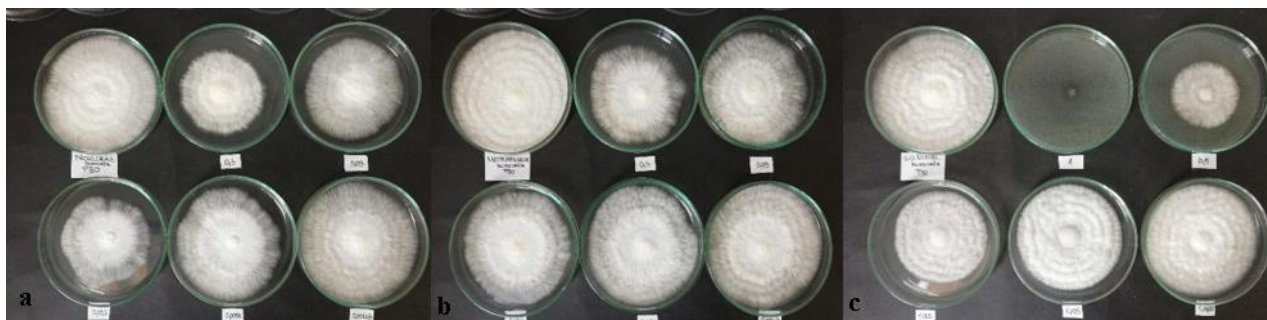
Antifungalno jedinjenje	EC ₅₀ (mg/l) ¹		Indeks selektivnosti ⁴
	<i>Trichoderma</i> spp. ²	Šampinjon (A15) ³	
Prohloraz	0,28	0,02	11,4
Metrafenon	0,63	0,66	0,95
Etarsko ulje mirođije	2,54	0,11	23,09

¹ Efektivna koncentracija koja inhibira 50% porasta micelije; ² Srednja vrednost efektivne koncentracije za šest izolata;

³ Procenjena vrednost za šampinjon; ⁴ Odnos srednje EC₅₀ *Trichoderma* izolata i procenjene vrednosti za šampinjon

5.11.2. Indeksi selektivnosti za bukovaču

Najbolju selektivnost za bukovaču ispoljio je fungicid prohloraz, čiji je indeks selektivnosti iznosio svega 0,01. Zatim sledi fungicid metrafenon sa indeksom selektivnosti od 0,09. Selektivna toksičnost za etarsko ulje mirođije nije bila zadovoljavajuća, jer je indeks selektivnosti i ovde bio dosta viši, tačnije 6,51 (Tabela 26).



Slika 17. Osetljivost bukovače prema prohlorazu (a), metrafenonu (b) i etarskom ulju mirođije (c)

Tabela 26. Selektivna toksičnost testiranih antifungalnih jedinjenja za *Trichoderma* spp. i bukovaču

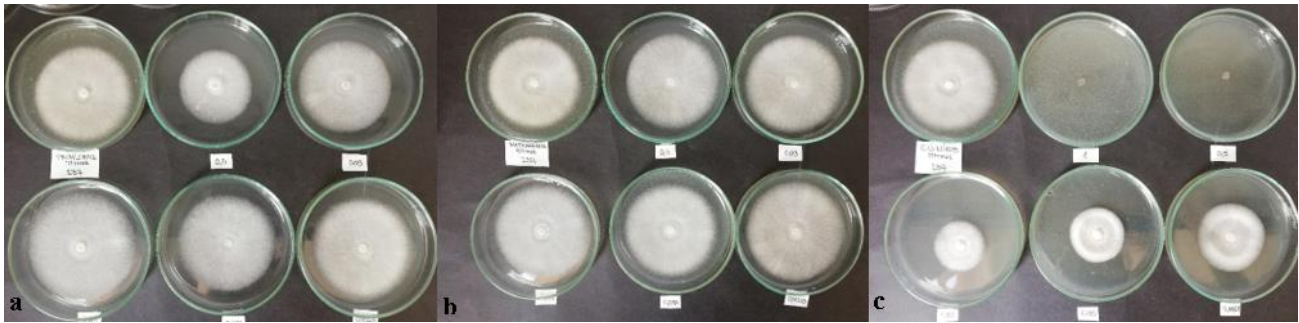
Antifungalno jedinjenje	EC ₅₀ (mg/l) ¹		Indeks selektivnosti ⁴
	<i>Trichoderma</i> spp. ²	Bukovača (P80) ³	
Prohloraz	0,02	1,92	0,01
Metrafenon	0,53	5,93	0,09
Etarsko ulje mirođije	2,54	0,39	6,51

¹ Efektivna koncentracija koja inhibira 50% porasta micelije; ² Srednja vrednost efektivne koncentracije za šest izolata;

³ Procenjena vrednost za šampinjon; ⁴ Odnos srednje EC₅₀ *Trichoderma* izolata i procenjene vrednosti za bukovaču

5.11.3. Indeksi selektivnosti za šitake

Fungicid prohloraz, sa indeksom selektivnosti 0,02, pokazao se kao najselektivnije antifungalno jedinjenje za jestivu gljivu šitake. Zadovoljavajuću selektivnost pokazao je i fungicid metrafenon, čiji je indeks selektivnosti bio 0,21, dok selektivnost za etarsko ulje mirođije nije bila zadovoljavajuća ni za ovu jestivu gljivu (Tabela 27). Međutim, indeks selektivnosti od 5,38 bio je najniži u poređenju sa drugim domaćinima, pa se može reći da je šitake najotporniji domaćin prema etarskom ulju mirođije u *in vitro* uslovima.



Slika 18. Osetljivost šitake prema prohlorazu (a), metrafenonu (b) i etarskom ulju mirođije (c)

Tabela 27. Selektivna toksičnost testiranih antifungalnih jedinjenja za *Trichoderma* spp. i šitake

Antifungalno jedinjenje	EC ₅₀ (mg/l) ¹		Indeks selektivnosti ⁴
	<i>Trichoderma</i> spp. ²	Šitake (237) ³	
Prohloraz	0,04	1,91	0,02
Metrafenon	1,24	5,93	0,21
Etarsko ulje mirođije	1,83	0,34	5,38

¹ Efektivna koncentracija koja inhibira 50% porasta micelije; ² Srednja vrednost efektivne koncentracije za šest izolata;

³ Procenjena vrednost za šampinjon; ⁴ Odnos srednje EC₅₀ *Trichoderma* izolata i procenjene vrednosti za šitake

5.12. *In vivo* delovanje antifungalnih jedinjenja u oglednom gajilištu šampinjona

Ispitivanje efikasnosti antifungalnih jedinjenja (etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi azadiraktina i fungicida prohloraza) u suzbijanju prouzročivača zelene plesni *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 proučeno je na bazi procene intenziteta pojave oboljenja (simptoma bolesti), tačnije pojave smeđih pega na karpoforama šampinjona. Intenzitet pojave simptoma bolesti određen je izračunavanjem procenta zaraženih karpofora šampinjona u odnosu na ukupan broj ubranih karpofora šampinjona. Efikasnost jedinjenja određena je na osnovu intenziteta bolesti u inokulisanoj kontroli i tretmanima. Takođe, analiziran je i uticaj antifungalnih supstanci na prinos šampinjona, tj. biološku efektivnost (BE) izraženu u procentima. Biološka efektivnost izračunata je kao odnos sveže mase ubranih karpofora šampinjona i suve mase kompostiranog supstrata u vreme zasejavanja micelijom šampinjona (**Chrysai-Tokousbalides et al.**, 2007).

Uticaj etarskog ulja mirođije na prinos izražen sa BE i njegova efikasnost u smanjenju simptoma bolesti bila je razmatrana u individualnoj primeni u odabranoj dozi (100%) ili u kombinaciji sa kontrolnim fungicidom prohlorazom u odnosu 20:80%. Etarsko ulje mirođije testirano je i na nižoj koncentraciji (20% od odabrane testirane doze) da bi se utvrdila priroda međusobnog dejstva fungicida i etarskog ulja u kombinovanom tretmanu.

Ispitivanje suzbijanja *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 u oglednom gajilištu izvršeno je u dva nezavisno postavljena eksperimenta u trajanju od po 70 dana. Prvo ispitivanje izvršeno je u periodu od 26.12.2019. do 09.03.2020. godine, dok je ponovljeni ogled bio u periodu od 16.09.2020. do 03.12.2020. godine. Plodonošenje i berba su trajali 33 dana u prvom i oko 40 dana u ponovljenom eksperimentu. Prvi simptomi u vidu smeđih pega na šeširima šampinjona pojavili su se 9. dana u oba ponavljanja, dok su beličaste kolonije prečnika 2-3 cm uočene 19. dana u prvoj postavci i 14. dana u drugoj postavci od početka plodonošenja. Beličaste kolonije su nakon jednog ili dva dana dobile karakterističnu zelenu boju sa sporulisanjem patogene gljive (Slika 19). Učestalost pojave simptoma se povećavala tokom vremena, prema kraju ogleda.

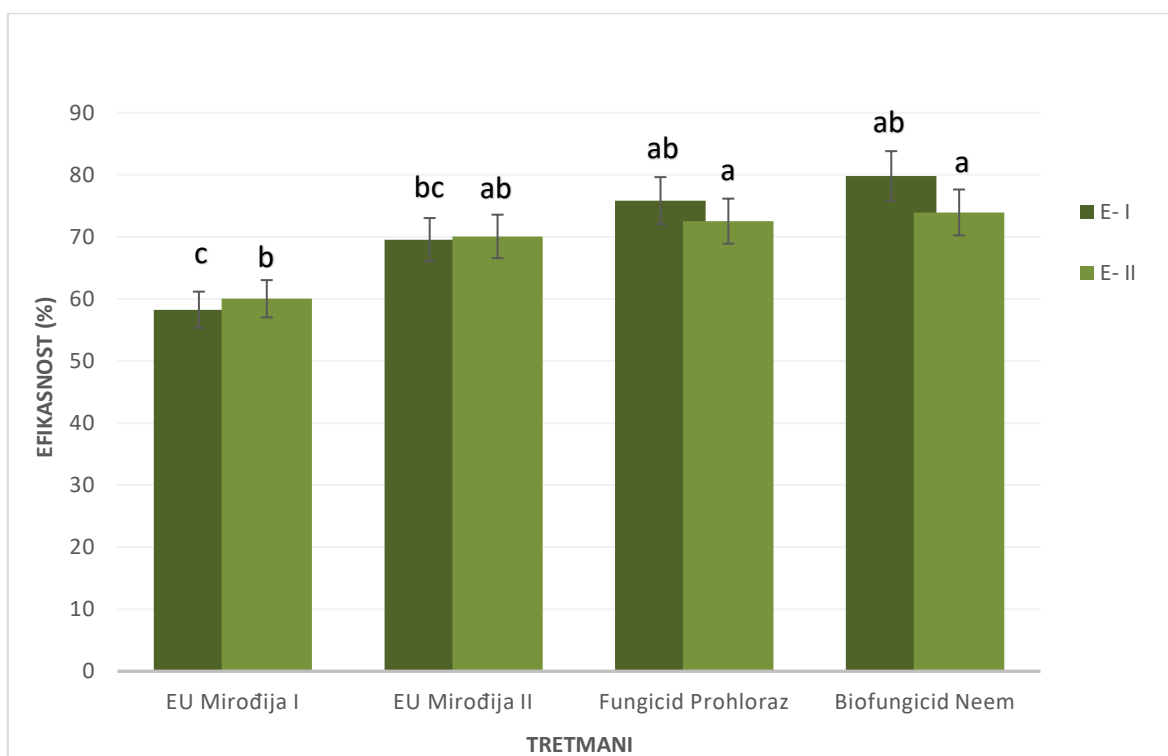


Slika 19. Zelena plesan u oglednom gajilištu: bela kolonija na pokrivci i karpoforama (a-b); zelena kolonija na pokrivci (c-d) i smeđe pege na karpoforu šampinjona (e-f)

5.12.1. Efikasnost etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi azadiraktina i fungicida prochloraza u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum*

Efikasnost antifungalnih jedinjenja u suzbijanju prouzrokovala zelene plesni ocenjena je na osnovu broja obolelih karpofora šampinjona tj. učestalosti simptoma. Efikasnost (E) je izračunata na osnovu poređenja vrednosti pojave simptoma u netretiranoj inokulisanoj kontroli (Ic) i tretiranim varijantama (It).

Najveća efikasnost postignuta je primenom fungicida prochloraza u standardnoj dozi primene (75,83%) i biofungicida na bazi azadiraktina u standardnoj dozi primene (79,82%). Etarsko ulje mirođije (varijanta mirođija II) u dozi primene od 2% nije ispoljilo statistički značajno veću efikasnost (69,75%) u poređenju sa nižom dozom primene ovog ulja (varijanta mirođija I) od 1% (58,26%), ali se nije statistički značajno razlikovalo od primene fungicida prochloraza i biofungicida azadiraktina. Tretman nižom dozom primene etarskog ulja mirođije (1%) je ispoljilo najmanju efikasnost u prvom ponavljanju *in vivo* eksperimenta. Nije bilo statistički značajnih razlika u efikasnosti između fungicida prochloraza i biofungicida na bazi azadiraktina i etarskog ulja mirođije u dozi 2%, dok se efikasnost etarskog ulja u nižoj dozi (varijanta mirođija I – 1%) statistički značajno razlikovalo od svih testiranih jedinjenja osim varijante veće doze primene. U drugom ponovljenom eksperimentu, najveću efikasnost, takođe bez statistički značajnih razlika su ispoljili fungicid prochloraz (72,53%), biofungicid na bazi azadiraktina (73,93%) i etarsko ulje mirođije u većoj dozi primene (varijanta mirođija II – 2%) (70,07%). Etarsko ulje mirođije u nižoj dozi primene – 1% (varijanta mirođija I) je ispoljilo najmanju efikasnost (60,03%) i statistički se značajno razlikovalo od ostalih testiranih jedinjenja osim u odnosu na primenu ovog ulja u većoj dozi. Etarsko ulje u većoj dozi primene - mirođija II ispoljilo je visoku efikasnost - 70,07%. Poređenjem ponavljanih eksperimenata, nešto bolji rezultati postignuti su u ponovljenom (drugom) eksperimentu (razlike od 0,52 do 6,11%), čime je potvrđeno da su sva testirana jedinjenja ispoljila zadovoljavajuću efikasnost, naročito etarsko ulje mirođije jer je i u nižoj dozi primene pokazalo efikasnost veću od 50% (Grafikon 17).



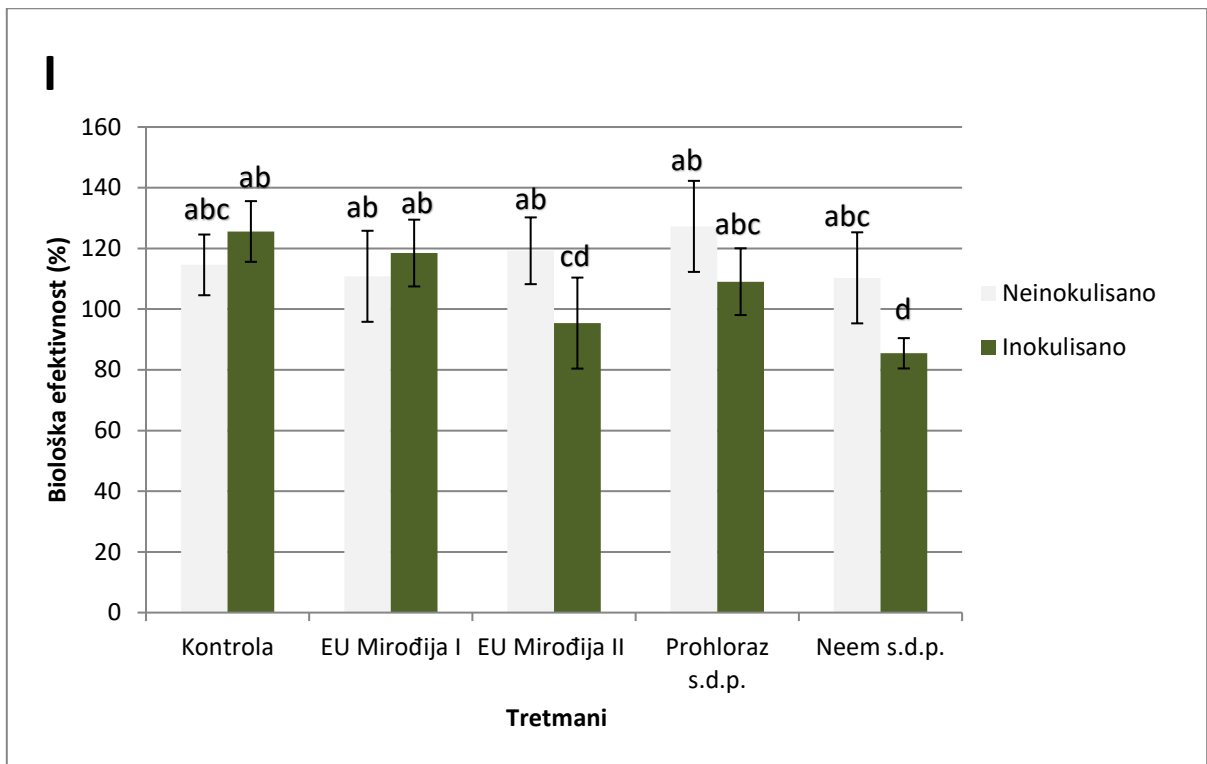
Grafikon 17. Efikasnost antifungalnih jedinjenja u suzbijanju *T. aggressivum f. europaeum* T77 nakon veštačke inokulacije šampinjona u dva nezavisna eksperimenta: (**E-I**: df - stepen slobode = 3; F = 0,43; p = 0,73 i **E-II**: df - stepen slobode = 3; F = 2,63; p = 0,08). Vrednosti obeležene istim slovom unutar serije se statistički značajno ne razlikuju prema *Fischer LSD* testu ($P < 0,5$).

5.12.2. Uticaj antifungalnih jedinjenja na prinos šampinjona

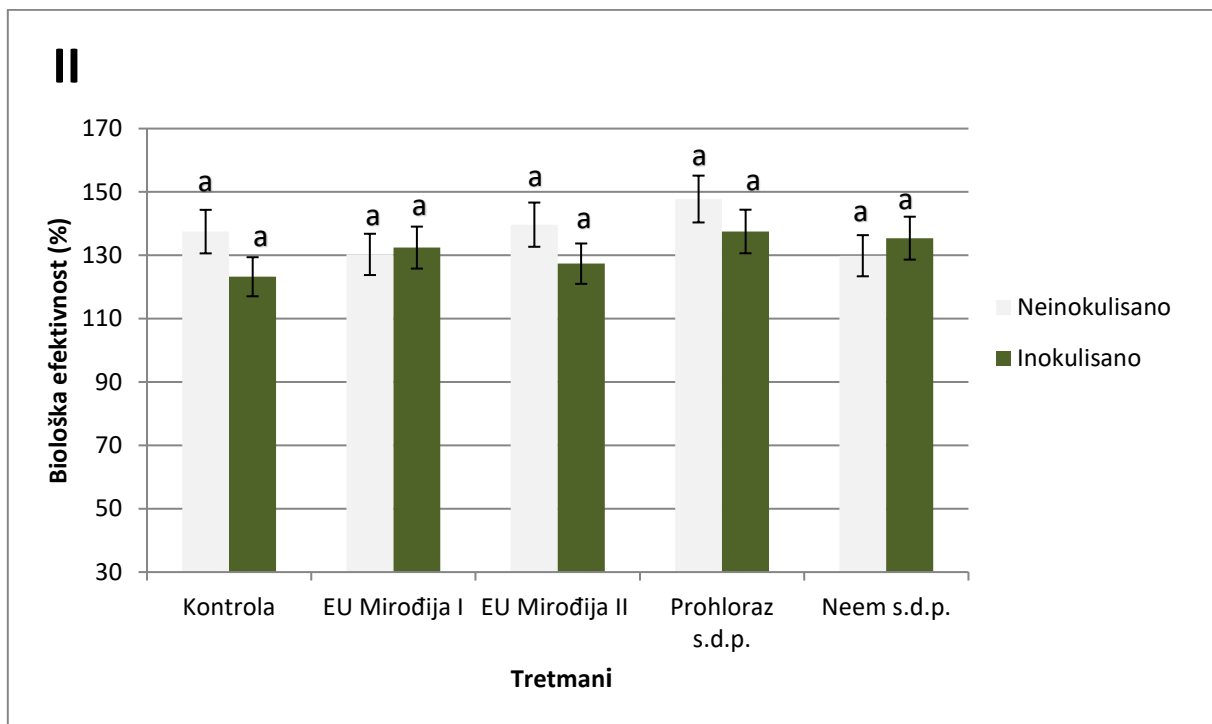
U prvom postavljenom eksperimentu zabeleženi su visoki prinosi od preko 100% u većini tretmana (Grafikon 18). Najbolji prinos uočen je u inokulisanoj kontroli (125,58%) i u neinokulisanom tretmanu sa fungicidom (127,26%), dok je najniži zabeležen u inokulisanom tretmanu sa biofungicidom azadiraktinom (85,44%). Etarsko ulje primenjeno u nižoj dozi (mirođija I) sa prinosisima od 118,47% u inokulisanom tretmanu uticalo je znatno bolje na prinos od etarskog ulja mirođije primenjenog u većoj dozi (mirođija II), kod kog je u inokulisanom tretmanu zabeležen prinos od 95%. Prinosi u neinokulisanim tretmanima su bili ujednačeni, dok su za prinose u inokulisanim tretmanima statistički značajno najniži prinosi zabeleženi u tretmanu sa biofungicidom azadiraktinom i sa etarskim uljem mirođije u većoj dozi primene (mirođija II).

U ponovljenom eksperimentu su zabeleženi još bolji prinosi, sa vrednostima od preko 120% (Grafikon 19). Između inokulisanih i neinokulisanih tretmana, kao i svih pojedinačnih tretmana, nije bilo statistički značajnih razlika. Najveći prinos zabeležen je u neinokulisanom tretmanu: etarsko ulje mirođija II (139,67%) i fungicid prohloraz (147,76%), dok je najniži prinos zabeležen u inokulisanom tretmanu sa etarskim uljem mirođija II (127,36%).

Bolji rezultati za prinos i efikasnost u suzbijanju prouzrokovala bolesti zabeleženi su u ponovljenom eksperimentu, gde je delovanje svih testiranih antifungalnih jedinjenja bilo ujednačeno bez statistički značajnih razlika među tretmanima u prinosu.



Grafikon 18. Biološka efektivnost – uticaj na prinos antifungalnih jedinjenja u prvom ponavljanju eksperimenta (df - stepen slobode = 9; $F = 2,64$; $p = 0,02$). Vrednosti obeležene istim slovom unutar serije se statistički značajno ne razlikuju prema *Fischer LSD* testu ($P < 0,5$).



Grafikon 19. Biološka efektivnost – uticaj na prinos antifungalnih jedinjenja u drugom ponavljanju eksperimenta (df - stepen slobode = 9; $F = 0,53$; $p = 0,85$). Vrednosti obeležene istim slovom unutar serije se statistički značajno ne razlikuju prema *Fischer LSD* testu ($P < 0,5$).

5.12.3. Interakcija etarskog ulja mirođije i fungicida prohloraza u primeni *in vivo*

Analiza prirode međusobnog dejstva etarskog ulja mirođije testiranog u dve doze primene sa kontrolnim fungicidom prohlorazom prikazana je kroz određivanje sinergističkog faktora (SF). Sinergistička reakcija ($SF > 1$) ustanovljena je između etarskog ulja mirođije primenjenog u obe doze i fungicida prohloraza u slučaju ispitivanja biološke efektivnosti – uticaja na prinos, dok je u ispitivanju efikasnosti u suzbijanju prouzrokovala bolesti ispoljeno aditivno dejstvo ($SF = 1$) (Tabela 28). U slučaju uticaja primenjenih kombinacija na prinos (BE), etarsko ulje (primenjeno u većoj dozi (mirođija II) u kombinaciji sa fungicidom prohlorazom sa $SF = 1,3$ ispoljilo je vrlo blisku vrednost sinergizma u odnosu na kombinacije etarsko ulje primenjeno u manjoj dozi (mirođija I) i fungicida ($SF = 1,2$). U slučaju uticaja na efikasnost u suzbijanju patogena, etarsko ulje u nižoj dozi (mirođija I) u kombinaciji sa fungicidom prohlorazom imalo je vrlo slabu antagonističku reakciju ($SF = 0,9$), dok je za kombinaciju veće doze etarskog ulja (mirođija II) i fungicida prohloraza zabeležen aditivni efekat ($SF = 1$).

Tabela 28. Interakcija etarskog ulja mirođije i fungicida prohloraza u uticaju na prinos šampinjona (BE) i efikasnost u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* T77 u oglednom gajilištu šampinjona

Tretman	Biološka efektivnost (BE %)		SF	Efikasnost u suzbijanju prouzrokovala bolesti (E %)		SF
	Uočena BE	Očekivana BE		Uočena E	Očekivana E	
Prohloraz 80%						
+	115,43	98,14	1,2	58,36	62,81	0,9
EU mirođija I 20%						
Prohloraz 80%						
+	120,6	93,49	1,3	61,95	64,03	1,0
EU mirođija II 20%						

SF- sinergistički faktor; BE – biološka efikasnost; E – efikasnost u suzbijanju prouzrokovala bolesti; EU – etarsko ulje

Najniži prinos šampinjona zabeležen je u tretmanu etarskog ulja mirođija I u dozi 20% od prvobitne doze primene (90,82%) i u tretmanu kombinacije etarsko ulje mirođija I 20% + prohloraz 80% (doza primene 80% od standardne doze primene) sa 85,44%. Najviši prinos zabeležen je u tretmanima sa etarskim uljem mirođija II primenjenim: u prvobitnoj dozi primene od 2% (139,67%), u dozi od 20% od prvobitne doze primene (130,95%) i u kombinaciji mirođija II 20% + prohloraz 80% (121,31%). Prikaz očekivanih i uočenih vrednosti za BE prikazan je u Prilogu 5 (Grafikon P5-1a). Najveća efikasnost u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* zabeležena je u tretmanima sa fungicidom (prohloraz 100% = 84,49%; prohloraz 80% = 88,08%) i sa kombinovanom primenom etarskog ulja mirođije 20% od prvobitnih doza primene i prohloraza 80% od standardne doze primene (mirođija I 20% + prohloraz 80% = 87,3%; mirođija II 20% + prohloraz 80% = 83,91%). Treba napomenuti da je efikasnost pojedinačnih ulja bila veća u primenama 20% od prvobitnih doza primene, a najbolja u kombinovanim tretmanima Prilogu 5 (Grafikon P5-1b). Etarsko ulje mirođija I primenjeno u manjoj dozi (1%) delovalo je bolje na prinos šampinjona od etarskog ulja mirođija II primenjenog u većoj dozi (2%), ali je efikasnost u suzbijanju prouzrokovala bolesti bila veća u tretmanima sa etarskim uljem primenjenim u dozi od 2% (mirođija II). Fungicid prohloraz primenjen u dozi 80% od standardne doze primene ispoljio je veću efikasnost u suzbijanju bolesti od fungicida primenjenog u standardnoj dozi, ali je delovanje na prinos bilo bolje u tretmanu sa fungicidom primenjenim u standardnoj dozi primene.

6. DISKUSIJA

6.1. *Trichoderma* spp. – prouzrokovajući zelene plesni jestivih gljiva

Proizvodnju jestivih gljiva ugrožavaju različiti patogeni među kojima se poslednjih decenija izdvajaju brojne vrste iz roda *Trichoderma* izazivajući pojavu bolesti zelene plesni. Bolest zelene plesni uočena je na najznačajnijim jestivim gljivama koje se u industrijskom obimu gaje u svetu, poput šampinjona, bukovače i šitake (Hatvani et al., 2007; Komon-Zelazowska et al., 2007; Kosanović et al., 2013; Wang et al., 2016; Innocenti et al., 2019; Allaga et al., 2021).

Bolest se manifestuje pojavom simptoma pegavosti i truleži na karpoforama jestivih pečuraka i prorastanjem supstrata za rast sve tri gajene gljive. Prvi znaci bolesti se javljaju uglavnom u vreme prorastanja micelije kroz supstrat u vidu guste, u početku bele mase micelije, koja nakon sporulacije postaje tamnozeleno. Pege i nekroze boje rđe se javljaju kada spore patogena dospeju na šešire i drške karpofora jestivih gljiva (Kredics et al., 2010; Kosanović et al., 2013).

Prve značajne epifitocijske pojave zelene plesni šampinjona uočene su devedesetih godina 20. veka u Evropi (Velika Britanija i Irska) (Seaby, 1987; Doyle, 1991) i Severnoj Americi (SAD i Kanadi) (Rinker, 1993; Romaine et al., 1996), kada je pojava bolesti izazvala gubitke prinosa od 30 do 100%. Nakon toga, bolest se brzo proširila u druge zemlje (Geels, 1997; Hermosa et al., 1999; Mamoun et al., 2000). Iz svih zaraženih gajilišta izolovana je vrsta *T. harzianum*. Međutim, na osnovu morfologije, odgajivačkih karakteristika i patogenosti, utvrđeno je da su bolest izazvala tri biotipa poreklom iz Britanije (Th1, Th2 i Th3) i jedan poreklom iz Severne Amerike (Th4) (Seaby, 1987), koji su kasnije identifikovani kao nove vrste i forme. Biotip Th2 sa Britanskih ostrva identifikovan je kao *T. aggressivum* f. *europaeum*, a biotip Th4 iz Severne Amerike kao *T. aggressivum* f. *aggressivum* (Samuels et al., 2002). Tokom poslednje dekade, agresivna forma *T. aggressivum* f. *europaeum* se pojavila i u gajilištima Srbije (Kosanović et al., 2013). U gajilištima šampinjona istovremeno mogu biti prisutne i neke druge manje agresivne vrste roda *Trichoderma*: *T. longibrachiatum*, *T. ghanense*, *T. atroviride*, *T. koningii* i *T. virens* (Hatvani et al., 2007; Kosanović et al., 2013).

Zelena plesan bukovače je prvobitno uočena u Severnoj Americi, koju je izazvala vrsta *T. viride* (Sharma and Vijay, 1996), ali su prvi značajni gubici zabeleženi u Severnoj Koreji (Yu, 2002), gde je većina izolata pripadala dvema kasnije identifikovanim novim vrstama: *T. pleuroti* i *T. pleurotica* (Park et al., 2006). Početkom 21. veka, značajni gubici kao posledica bolesti zelene plesni zabeleženi su i u gajilištima bukovače širom Evrope (Kredics et al., 2006; Hatvani et al., 2007, 2012; Gea., 2009; Blaszczyk et al., 2013; Innocenti et al., 2019), gde je većina izolata pripadala prethodno navedenim novoidentifikovanim vrstama. Pored ove dve najdominantnije vrste, Hatvani et al. (2007) su iz supstrata bukovače i šampinjona izolovali i druge manje zastupljene vrste: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. ghanense*, *T. asperellum* i *T. atroviride*. Innocenti et al. (2019) su iz supstrata bukovače, pored *T. pleuroti* i *T. pleurotica*, izolovali i vrstu *T. guizhouense*, dok su Allaga et al. (2021) identifikovali *T. atrobrunneum*, *T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. simmonsii* i *T. harzianum* kompleks kao vrste koje se takođe mogu naći u gajilištima bukovače u Španiji, Srbiji i Severnoj Makedoniji. Iz uzoraka supstrata prekrivenog tamnozelenim kolonijama iz gajilišta bukovače u Srbiji i Severnoj Makedoniji u okviru ovih istraživanja su prvi put izolovane i identifikovane *T. pleuroti*, *T. pleurotica* i vrste iz *T. harzianum* kompleksa (*T. cf. harzianum*). Vrsta *T. pleuroti* nije identifikovana među izolatima iz gajilišta u Srbiji.

Zelena plesan, izazvana različitim vrstama roda *Trichoderma*, može takođe biti kompetitor ili parazitirati miceliju šitake i tako smanjiti prinos i ove jestive gljive. Vrste koje su identifikovane u gajilištima šitake su *T. harzianum* i *T. polysporum* (Komatsu, 1976; Tokimoto and Komatsu, 1979), zatim *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride*, *T. pleurotica* i *T. oblongisporum* (Jiang et al., 1995; Wang et al., 2016). Iz zaraženog komposta šitake u Kini, čak 68% izolata identifikovane su kao vrste *T. harzianum* kompleksa, što ukazuje da je ova grupa vrsta najznačajniji prouzrokovatelj

zelene plesni šiitake u odnosu na ostale izolovane vrste (Lee et al., 2008; Wang et al., 2016). Iz karpofora šiitake sa smeđim pegama iz gajilišta u Srbiji izolovane su i identifikovane samo vrste iz *T. harzianum* kompleksa (THSC) - *T. guizhouense* i *T. simmonsii*. Allaga et al. (2021) su u okviru *T. harzianum* kompleksa identifikovali *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense*, *T. simmonsii* i *T. pollinicola* kao dominantne vrste izolovane iz gajilišta šiitake u Srbiji i Mađarskoj.

6.1.1. Molekularne karakteristike

Rezultati molekularnih ispitivanja zasnovanih na analizi ITS regiona *Trichoderma* spp. izolata poreklom iz gajilišta šiitake i bukovače iz Srbije i bukovače iz Severne Makedonije, ukazuju da su vrste iz *T. harzianum* kompleksa (KG10, KG13, T57, T58 i T59), *T. pleuroti* (KM6, KM8 i KM11) i *T. pleurotica* (KM4, KM5, KM12 i KG6) dominantni prouzrokovaci zelene plesni bukovače i šiitake u ovim zemljama. U literaturi se navodi da su glavni prouzrokovaci zelene plesni bukovače vrste *T. pleuroti* i *T. pleurotica* (Komon-Zelazowska et al., 2007; Hatvani, 2008; Hatvani et al., 2007, 2012), što je u saglasnosti sa ovim rezultatima. Ove dve vrste se često javljaju istovremeno, ali je moguće i da samo jedna od njih dominira u određenom gajilištu ili oblasti. Među uzorcima iz gajilišta bukovače iz Severne Makedonije identifikovane su vrste *T. pleuroti* (KM6, KM8, KM11) i *T. pleurotica* (KM4, KM5, KM12). Među izolatima iz gajilišta bukovače u Srbiji nije izolovana vrsta *T. pleuroti*, pa je uz identifikovane pripadnike *T. harzianum* kompleksa (KG10, KG13) dominantna samo vrsta *T. pleurotica* (KG6). Preovladavanje samo jedne patogene vrste od dve najznačajnije na bukovačama zabeležena je i u istraživanjima koja su sproveli Komon-Zelazowska et al. (2007), gde se *T. pleuroti* navodi kao dominantna u gajilištima bukovače u Mađarskoj, a vrsta *T. pleurotica* kao većinski rasprostranjena u gajilištima bukovače u Italiji. Može se zaključiti da je preovladavanje *T. pleuroti* u Srbiji posledica uvoza zasejanog supstrata za gajenje bukovače iz Mađarske, gde takođe dominira ova patogena vrsta.

Blaszczyk et al. (2013) su utvrdili na osnovu analize *tef-1α* lokusa da su izolati *T. pleuroti* iz Poljske identični izolatima ove vrste iz Mađarske, a izolati *T. pleurotica* iz Poljske izolatima ove vrste iz Italije. Prema navodima iz literature, vrste iz kompleksa *T. harzianum* se takođe često javljaju u gajilištima bukovače, pored ove dve agresivne vrste ovog roda. Međutim, pojedini autori smatraju da one nemaju velikog štetnog uticaja na proizvodnju bukovače (Innocenti et al., 2019), dok drugi smatraju upravo suprotno (Woo et al., 2004; Allaga et al., 2021).

U gajilištu šiitake u Srbiji, vrste iz *T. harzianum* kompleksa (T57, T58, T59) su jedine identifikovane, što je potvrđeno i u nekim prethodnim istraživanjima u Južnoj Koreji i Kini (Lee et al., 2008; Kim et al., 2012; Wang et al., 2016).

Molekularnom analizom *tef-1α* genskog regiona izolata iz *T. harzianum* kompleksa poreklom iz Srbije, utvrđeno je prisustvo sledećih vrsta izolovanih iz gajilišta šampinjona: *T. atrobrunneum* (T54), *T. guizhouense* (T52), *T. pholiotae* (T10); bukovače: *T. afroharzianum* (KG10); šiitake: *T. guizhouense* (T58 i T59) i *T. simmonsii* (T57). Izolat KG13 (*T. cf. harzianum* sa bukovače) nije mogao biti identifikovan do nivoa vrste, a pretpostavlja se da je prisustvo mikovirusa uzrok takvog rezultata i da su potrebne dodatne analize kako bi se to potvrdilo.

Među izolatima *T. harzianum* kompleksa iz gajilišta bukovače je identifikovana jedino vrsta *T. afroharzianum*. Među izolatima *T. harzianum* kompleksa iz gajilišta šiitake identifikovane su vrste *T. guizhouense* i *T. simmonsii*, dok su među izolatima iz gajilišta šampinjona identifikovane *T. atrobrunneum*, *T. pholiotae* i *T. guizhouense*. Allaga et al. (2021) navode da se među izolatima iz gajilišta šiitake mogu naći sledeće vrste iz *T. harzianum* kompleksa u Srbiji: *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense*, *T. simmonsii* i Mađarskoj: *T. simmonsii* i *T. pollinicola*. Autori navode dominantne vrste u okviru *T. harzianum* kompleksa u gajilištima bukovače u Srbiji: *T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. simmonsii*, Španiji: *T. afroharzianum*, Severnoj Makedoniji: *T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. harzianum*, *T. simmonsii*, Hrvatskoj: *T. guizhouense*. U gajilištima šampinjona u Hrvatskoj i Mađarskoj u okviru istog kompleksa izdvojili su samo vrstu *T. harzianum* (Allaga et al., 2021).

Prisustvo vrsta *T. atrobrunneum*, *T. simmonsii* i *T. guizhouense* među prouzrokovacima zelene plesni jestivih pečuraka zabeleženo je i u nekim ranijim istraživanjima u Poljskoj, Italiji i Srbiji

(Oskeira et al., 2015; Innocenti et al., 2019; Grujić et al., 2019). Analizom izolata iz gajilišta pečuraka u Poljskoj, Oskeira et al. (2015) su na osnovu multilokusa potvrdili prisustvo sledećih vrsta iz *T. harzianum* kompleksa među izolatima iz gajilišta šampinjona: *T. harzianum sensu stricto*, *T. atrobrunneum* i *T. simmonsii*, a Blaszczyk et al. (2013) su analizom ITS/*tef-1α* u gajilištima bukovače odredili: *T. harzianum* i *T. atroviride*. Chaverri et al. (2015) smatraju da je za identifikaciju vrsta unutar ovog kompleksa dovoljna analiza *tef-1α* regiona. Međutim, preporuka pojedinih autora je uključivanje analize višestrukih molekularnih markera (*cal1*-kalmodulin, *rpb2*-RNA polimeraza II, *chi118-5*-hitinaza18-5) za sigurniju i precizniju identifikaciju vrsta u okviru *T. harzianum* kompleksa (Druzhinina et al., 2010; Chaverri et al., 2015; Allaga et al., 2021). Upotreba analize više lokusa pokazala se uspešnom i u istraživanjima Oskeira et al. (2015), gde je identifikovano čak 100 od 104 *Trichoderma* spp. izolata.

Filogenetska analiza četiri izolata iz *T. harzianum* kompleksa (T10, T52, T54 i T57) urađena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu sekvenci *tef-1α* genskog regiona. Nakon filogenetske analize jasno su se izdvojile četiri vrste u okviru *T. harzianum* kompleksa: *T. atrobrunneum* (T54), *T. guizhouense* (T52), *T. simmonsi* (T57) i *T. pholiotae* (T10). Izolat T57 sa još tri izolata poreklom iz Italije i Austrije grupisao se unutar *T. simmonsi* grupe, zolat T54 se izdvojio u zasebnu granu sa izolatom poreklom iz Kine unutar grupe *T. atrobrunneum*. Izolat T52 se grupisao sa još tri izolata poreklom iz Španije i Hrvatske unutar grupe *T. guizhouense*, dok se izolat T10 izdvojio sa još tri izolata poreklom iz Kine u zasebnu granu kao vrsta *T. pholiotae* u okviru iste grupe.

Za identifikaciju i filogenetsku analizu vrsta iz *T. harzianum* kompleksa najviše informacija pruža upravo amplifikacija *tef-1α* genskog regiona. Pored ovog gena za filogenetsku analizu od značaja su još kalmodulin (*cal*), a-aktin (*act*) i ITS region (Chaverri et al., 2015). Isti autori navode da su najveću filogenetsku sličnost vrste iz *T. harzianum* kompleksa pokazale sa klasterom u okviru kog su svrstane *T. amazonicum*, *T. pleuroti*, *T. pleuroticola* i klasterom u okviru kog su vrste *T. aggressivum*, *T. alni*, *T. compactum*, *T. parepimyces* i *T. tawa* (Chaverri et al., 2015).

Vrsta *T. harzianum* navodi se kao najbliži predak agresivnih formi vrste *T. aggressivum*, dominantnog patogena šampinjona (Ospina-Giraldo et al., 1999). Bliska filogenetska veza između *T. harzianum* i *T. aggressivum* zabeležena je i u radovima Kullnig-Gradinger et al. (2002) i Kredics et al. (2010). Kredics et al. (2010) smatraju da su dve agresivne forme *T. aggressivum* nastale adaptacijom postojećih populacija *T. harzianum* na uslove sredine u gajilištu šampinjona. Agresivne vrste iz gajilišta bukovače, *T. pleuroti* i *T. pleuroticola* iako međusobno različite po mnoštvu svojstava, filogenetski su blisko srodne *Harzianum* grani iz *Hypocrea/Trichoderma* grupe, koja obuhvata *T. aggressivum*, prouzrokovača zelene plesni šampinjona, što takođe ukazuje na poreklo od populacija iz *T. harzianum* kompleksa nastalim prilagođavanjem na uslove u supstratu za gajenje bukovače (Blaszczyk et al., 2013). Nova vrsta *T. pholiotae* formira grupu sa vrstama *T. asiaticum*, *T. guizhouense*, *T. pseudoasiaticum* i *T. simille*, gde se izdvaja kao posebna grana između *T. pseudoasiaticum* i *T. guizhouense* u okviru *Harzianum* sekcije (Cao et al., 2022), što se poklapa sa rezultatima ovih istraživanja u kojima se izolat *T. pholiotae* T10 izdvojio u posebnu granu u okviru klastera gde je smeštena *T. guizhouense* grupa.

6.1.2. Morfološke i ekološke karakteristike

Kolonije *Trichoderma* spp. se brzo razvijaju i obrazuju belu vazdušastu miceliju, u početku žuto-zelene boje, koja se za kratko vreme sa sporulacijom menja u tamnozelenu boju. Micelija obrazuje uspravne, bezbojne i piramidalno razgranate konidiofore u koncentričnim krugovima, kao i elipsoidne ili loptaste konidije, zelene boje i dimenzija $1,8 - 5,4 \times 1,7 - 5,4 \mu\text{m}$. Takođe, mogu obrazovati i loptaste hlamidospore u skladu sa navodima Seaby (1996) i Chaverri et al. (2015). Svi ispitivani izolati iz ovih istraživanja su tokom prva tri dana inkubacije na PDA podlozi obrazovali belu vazdušastu miceliju, koja je kasnije poprimila zelenu boju kao rezultat sporulacije. Tokom sporulacije praćene do petog dana na PDA podlozi pri 20°C, svi izolati su na fjalidama obrazovali bledezelene elipsoidne do ovalne konidije, glatkih zidova.

Iz uzoraka uzetih iz gajilišta bukovače identifikovane su *T. pleuroti*, *T. pleuroticola* i vrste *T. harzianum* kompleksa (*T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum*), dok su iz gajilišta šiiitake identifikovane samo vrste *T. harzianum* kompleksa (*T. guizhouense* i *T. simmonsii*). U okviru *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona identifikovane su tri vrste: *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense* i *T. pholiotae*.

Vrsta *T. pleuroti* poseduje morfološke karakteristike tipične za rod *Gliocladium*, a vrsta *T. pleuroticola* karakteristične za sekciju *Pachybasium*. **Sobieralski et al.**, (2012) navode da *T. pleuroti* pri temperaturi 24 – 25°C na PDA podlozi obrazuje kolonije od 72 do 75 mm nakon pet dana inkubacije (stopa rasta 14,4-15 mm/dan). Za izolate *T. pleuroti* iz ovih istraživanja zabeležen je brži porast kolonija, od 57 do 69 mm pri 25°C nakon 72 h na PDA (stopa rasta 19-23 mm/dan). Takođe, **Sobieralski et al.** (2012) navode da druga vrsta, *T. pleuroticola*, nakon pet dana inkubiranja pri temperaturi od 24 – 25°C na PDA podlozi obrazuje kolonije prečnika 83 do 88 mm (stopa rasta 16,6-17,6 mm/dan). Nešto brži porast kolonija od 61 do 70 mm pri 25°C nakon 72 h (stopa rasta 20,3-23 mm/dan) na PDA utvrđen je i za izolate *T. pleuroticola* iz ovih istraživanja.

Komon-Zelazowska et al. (2007) navode za vrstu *T. pleuroti* dimenzije konidija 3 - 4 × 4 – 13 µm, tj. prosečne 3,6 × 2,1 µm, dok su u ovom radu dimenzije spora bile (1,8) – 2,9 – (5,4) × (1,7) – 2,6 – (5,1) µm, odnosno prosečne 2,9 × 2,6 µm. Isti autori navode dimenzije konidija druge vrste *T. pleuroticola* 3,0 – 4,2 × 4,2 – 9,5 µm, prosečne 3,7 × 2,8 µm, dok su u ovom radu utvrđene dimenzije konidija (1,8) – 3,0 – (5,4) × (1,9) – 2,9 – (5,4) µm i prosečne 3,0 × 2,9 µm. Srednje vrednosti odnosa dužine i širine konidija bile 1,1 za *T. pleuroti* i 1,0 za *T. pleuroticola*. Obe vrste obrazuju i hlamidospore u skladu sa navodima **Komon-Zelazowska et al.** (2007).

Vrsta *T. pleuroti* je izolovana samo iz gajilišta bukovače i do sada nije pronađena van njega. Zbog toga se pretpostavlja da ona može biti endofit biljaka koje se koriste za pripremu supstrata – pšenice, pirinča, pamuka (**Komon-Zelazowska et al.**, 2007). Za razliku od prethodne vrste koja je pronađena samo u gajilištu bukovače, ova vrsta se može naći i van njega (**Komon-Zelazowska et al.**, 2007; **Hatvani et al.**, 2008; **Kredics et al.**, 2009).

Praćenjem brzine porasta kolonije ove dve vrste, nisu zabeležene statistički značajne razlike u porastu iako je brzina porasta micelije *T. pleuroti* bila 0,83 mm/h, a *T. pleuroticola* 0,75 mm/h. Zaključak da nema značajne statističke razlike u porastu micelije ovih vrsta na PDA nakon pet dana zabeležili su i **Sobieralski et al.** (2012).

Pored razlika u morfološkim, ekološkim i metaboličkim karakteristikama, vrste *T. pleuroti* i *T. pleuroticola* se mogu razlikovati i u pogledu delovanja na bukovaču, pa su tako pojedini autori ukazali na veću osetljivost vrste *T. pleuroticola* prema gajenoj gljivi (**Komon-Zelazowska et al.**, 2007; **Sobieralski et al.**, 2012), dok su nasuprot tome **Innocenti et al.** (2019) zabeležili veću agresivnost vrste *T. pleuroticola*. Obe vrste se mogu prenositi insektima, jer su spore patogena pronađene u telima pojedinih vrsta insekata (**Innocenti and Montanari**, 2014). Pored toga, smatra se da je supstrat jedan od značajnijih vidova održavanja i širenja obe vrste.

Ove dve vrste se u gajilištima mogu naći istovremeno ili može dominirati samo jedna vrsta, pa je tako zabeleženo da je u Italiji dominantnija vrsta *T. pleuroticola*, a da se u Mađarskoj češće javlja vrsta *T. pleuroti* (**Komon-Zelazowska et al.**, 2007). U ovim istraživanjima beleži se podjednako prisustvo obe vrste u Severnoj Makedoniji, dok u Srbiji nije zabeležena vrsta *T. pleuroti*.

U okviru *T. harzianum* kompleksa, vrsta *T. simmonsii* obrazovala je konidije sa dimenzijama (2,6) – 3,3 – (3,6) × (1,9) – 2,6 – (4,1) µm (prosečnim 3,3 × 2,6 µm), vrsta *T. afroharzianum* sa dimenzijama (2,4) – 3,0 – (4,0) × (2,2) – 2,9 – (3,9) µm (prosečnim 3,0 × 2,9 µm) i vrsta *T. guizhouense* sa dimenzijama (2,3) – 2,9 – (3,6) × (1,9) – 2,6 – (3,5) µm (prosečnim 2,9 × 2,6 µm), dok su **Kosanović et al.** (2013) za vrste *T. atrobrunneum* izmerili prosečne dimenzije konidija od 3,0 × 2,5 µm i *T. pholiotae* od 3,1 × 2,5 µm. Odnosi dužine i širine konidija bili su 1,1 za vrste *T. simmonsii* i *T. guizhouense* i 1,0 za vrstu *T. afroharzianum*. Odnosi dužine i širine za vrste *T. atrobrunneum* i *T. pholiotae* bili su 1,1 odnosno 1,2 (**Kosanović et al.**, 2013).

Chaverri et al. (2015) navode da vrsta *T. afroharzianum* ima porast kolonije na PDA od 50 – 60 mm pri 25°C nakon 72 h (stopa rasta 16,67-20 mm/dan), da stvara žuti pigment u podlozi, posebno na višim temperaturama (>35°C) i da pri 30°C može imati slatkast miris u skladu sa nalazima

za izolat ove vrste analiziran u okviru ove disertacije (stopa rasta 22,17 mm/dan). Takođe, navode da vrsta formira konidije dimenzija (2,0-) 2,7 – 3,5 (-4,5) × (2,0-) 2,5 – 3,2 (-4,2) μm (prosečne 3,1 × 2,8 μm) sa odnosom dužine i širine od (0,9-) 1,0 – 1,2 (-1,5) u skladu sa nalazima u ovom radu. Kao značajna karakteristika navodi se i to da formira najduže fjalide u kompleksu vrsta i da retko može obrazovati hlamidospore. Ova gljiva je zastupljena širom sveta i može se izolovati iz zemljišta, korena drveća i jestivih gljiva (**Chaverri and Samuels**, 2013).

Za vrstu *T. atrobrunneum* je karakteristično da formira konidije dimenzija (2,0-) 2,7 – 3,8 (-4,0) × (2,0-) 2,5 – 3,0 (-3,5) μm (3,0 × 2,7 μm) sa odnosom dužine i širine od (0,9-) 1,0 – 1,1 (-1,5). Na PDA i pri 25°C nakon 72 h ima porast od 35 – 45 mm (stopa rasta 11,67-15 mm/dan), dok pri 35°C svega 8 - 30 mm, što je svrstava u one sa najsporijim rastom na visokim temperaturama u kompleksu (**Chaverri et al.**, 2015). Zastupljena je u Evropi i Severnoj Americi (umerena klimatska podneblja) i može se izolovati iz zemljišta, treseta, kore drveća i jestivih gljiva (**Chaverri and Samuels**, 2013). Iste karakteristike su utvrđene i kod izolata *T. atrobrunneum* T54 iz Srbije (stopa rasta 13,9 mm/dan) (**Kosanović et al.**, 2013).

Vrsta *T. pholiotae* formira konidije dimenzija (2,6) - 3,8 - (4,2) x (2,5) - 3,1- (3,9) x (1,9) – 2,5 - (3,2) μm (prosečne 3,8 × 3,1 μm) sa odnosom dužine i širine od 1,2. Na PDA podlozi nakon 72 h obrazuje koloniju prečnika 67 – 68 mm pri 25°C, 70 - 72 mm pri 30°C i 8 -10 mm pri 35°C, što ukazuje da je optimalna temperatura rasta ove vrste pri 30°C (**Cao et al.**, 2022). **Kosanović et al.** (2013) navode da su prosečne dimenzije konidija za izolat *T. pholiotae* T10 bile 3,1 × 2,5 μm (odnos dužine i širine do 1,5) i da je najveći prečnik kolonije (116,4 mm) zabeležen pri 30°C, a najmanji pri 35°C (1 mm). Koloniju karakterišu zelene koncentrične zone nastale usled sporulacije gljive, žućkasti pigment u podlozi i prijatan i blagi voćni miris (**Cao et al.**, 2022). Slične karakteristike su utvrđene i kod izolata *T. pholiotae* T10 iz Srbije, kao i identična optimalna temperatura rasta (30°C) (**Kosanović et al.**, 2013). **Cao et al.** (2022) navode da ova vrsta ima veliku filogenetsku sličnost sa vrstama *T. asiaticum*, *T. guizhouense*, *T. pseudoasiaticum* i *T. simile*. Isti autori kao razlike navode da vrsta *T. pholiotae* ima deblje fjalide i loptastije konidije, vrsta *T. asiaticum* kraće fjalide, dok vrsta *T. simile* ima nižu optimalnu temperaturu rasta (25°C) (**Cao et al.**, 2022).

Za razliku od vrsta *T. atrobrunneum* i *T. pholiotae* koje najsporije rastu pri višim temperaturama u odnosu na druge vrste roda *Trichoderma*, vrsta *T. guizhouense* najsporije raste pri nižim temperaturama (<15°C). Porast *T. guizhouense* na PDA i 25°C nakon 72 h je 40 – 70 mm (stopa rasta 13,33-23,3 mm/dan), a dimenzije konidija (2,0-) 2,5 – 3,2 (-4,0) × (2,0-) 2,5 – 3,0 (-3,5) μm (prosečne 2,9 × 2,8 μm) sa odnosom dužine i širine od (0,8-) 1,0 – 1,2 (-1,5) (**Chaverri et al.**, 2015) u skladu sa karakteristikama izolata iz ovog rada (stopa rasta 21 mm/dan). Vrsta je zastupljena širom sveta (kosmopolit) i može se izolovati iz zemljišta, kore drveća i jestivih gljiva (**Chaverri and Samuels**, 2013).

Porast vrste *T. simmonsii* na PDA i 25°C nakon 72 h je 55 – 65 mm (stopa rasta 18,33-21,67 mm/dan) i pri 35°C može stvarati žuti pigment u podlozi. Dimenzije konidija za *T. simmonsii* iznose (2,5-) 2,7 – 3,2 (-3,7) × (2,2-) 2,5 – 3,0 (-3,5) μm (prosečne 3,0 × 2,7 μm) sa odnosom dužine i širine od 1,0 – 1,2 (-1,4) i ove karakteristike se podudaraju sa osobinama izolata obrađenim u ovom radu (stopa rasta 22 mm/dan). Ponekad može obrazovati hlamidospore (**Chaverri et al.**, 2015). Uglavnom je zastupljena u Evropi i Severnoj Americi (umerena klimatska podneblja) i može se izolovati iz kore drveća i drveća u fazi raspadanja, kao i jestivih gljiva (**Chaverri and Samuels**, 2013).

Optimalna temperatura za rast vrsta iz *T. harzianum* kompleksa (*T. simmonsii* i *T. guizhouense*) i vrstu *T. pleuroti* bila je 30°C, što je u saglasnosti sa rezultatima **Kosanović et al.** (2013) za izolate *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona (*T. atrobrunneum* i *T. pholiotae*). Optimalna temperatura za rast *T. pleurotica* bila je pri 25°C, a isti optimum beleži se za vrstu *T. aggressivum* f. *europaeum* (**Kosanović et al.**, 2013).

6.2. Virulentnost izolata *Trichoderma* spp.

Primenom metode koju su opisali **Bonnen and Hopkins** (1997), ispitivanjem virulentnosti izolata *T. pleuroti*, *T. pleurotica* i *T. harzianum* kompleksa (*T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum*)

sa bukovače, zabeležena je slaba virulentnost na karpoforama bukovače – 0 ili 1 na skali od 0 do 5, dok je za izolate *T. harzianum* kompleksa (*T. guizhouense* i *T. simmonsii*) sa šiitake zabeležena visoka virulentnost – 5 na skali od 0 do 5. Korišćenjem iste metode i skale, **Kosanović et al.** (2013) su takođe odredili stepen virulentnosti za vrste *Trichoderma* (*T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. harzianum* kompleksa) izolovanih iz gajilišta šampinjona, zabeleživši vrednosti između 3 i 5.

Rezultati ispitivanja virulentnosti patogena ukazuju da su vrste iz *T. harzianum* kompleksa dosta virulentnije prema karpoforama od agresivnijih formi *Trichoderma* vrsta koje se smatraju kompetitorima micelije gajenih pečuraka u supstratu, što je u saglasnosti sa istraživanjima koja su sprovedi **Kosanović et al.** (2013). Bukovača je ispoljila znatno slabiju reakciju od šiitake i šampinjona na inokulaciju sporama *Trichoderma* vrsta, a kao mogući razlog takvog uticaja na ocenu virulentnosti navodi se izvor izolacije *Trichoderma* spp. izolata. Znaci i prisustvo zelene plesni bukovače uglavnom se ispoljavaju kroz kolonizaciju supstrata micelijom patogena, koja značajno ugrožava i smanjuje prinos bukovače, bez vidljivih simptoma na karpoforama, pa su tako svi izolati *Trichoderma* spp. izolovani iz supstrata za gajenje bukovače. Nasuprot izolatima sa bukovače, *Trichoderma* izolati sa šiitake uglavnom su izolovani iz karpofora, na kojima su se ispoljili evidentni simptomi bolesti.

Proverom unakrsne virulentnosti izolata vrsta iz *T. harzianum* kompleksa (*T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. cf. harzianum*, *T. guizhouense*, *T. pholiotae* i *T. simmonsii*) koje se mogu javiti kod sva tri domaćina, visoku virulentnost na karpoforama šampinjona ispoljili su svi testirani izolati *T. harzianum* kompleksa sa bukovače i šiitake (*T. afroharzianum*, *T. cf. harzianum*, *T. guizhouense* i *T. simmonsii*) (5 na skali od 0 do 5). Prethodno su **Kosanović et al.** (2013) za izolate *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona zabeležili vrednosti od 3 do 5. Na šesirima karpofora šiitake izolati *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona (*T. atrobrunneum*, *T. guizhouense* i *T. pholiotae*) ispoljili su visoku virulentnost, dok su izolati sa bukovače ((*T. afroharzianum*, *T. cf. harzianum*) bili virulentniji od njih. Na šesirima bukovače svi izolati *T. harzianum* kompleksa sa šampinjona i šiitake (*T. atrobrunneum*, *T. guizhouense*, *T. pholiotae* i *T. simmonsii*) ispoljili su slabu virulentnost (1 ili 2 na skali od 0 do 5), pa se zaključuje da značajnu ulogu za određivanje stepena virulentnosti patogena imaju izvor izolacije i mesto ispoljavanja simptoma bolesti zelene plesni na domaćinu, odnosno specijalizaciju patogenih vrsta na različite supstrate i domaćine.

6.3. Kvantitativni i kvalitativni sastav etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja

Primenom GC-FID i GC-MS tehnika izvršena je hemijska analiza sastava proučavanih etarskih ulja (majčine dušice, pitome nane, divlje nane, bosiljka, tuje, jele, bora, kleke, hajdučke trave, kantariona i mirođije). Razlike u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu etarskih ulja zabeležene su između vrsta iz iste porodice biljaka, pa čak i između različitih biljnih organa iste biljke. Najveći prinos zabeležen je za etarsko ulje mirođije (2,02% v/w), dok je najniži prinos zabeležen za ulje kantariona (0,08% v/w). Broj identifikovanih komponenti bio je u opsegu od 16 (ulje mirođije) do čak 81 (ulje hajdučke trave). Prinos i broj komponenti etarskog ulja tuje izolovanog iz iglica bili su 0,58% v/w i 36, dok su iz ulja izolovanog iz ploda bili 0,64% v/w i 33. Razlike u broju komponenti i prinosu zabeleženi su i kod ulja bosiljka, gde su u ulju izolovanom iz cveta bili 1,24% v/w i 48, a u ulju iz lista 1,80% v/w i 44. Varijabilnost u sastavu etarskog ulja u biljnom materijalu jedne iste biljke, kao i različitih primeraka jedne iste vrste potvrdili su u istraživanjima **Kalemba and Kunicka** (2003), dok su **Dajić-Stevanović et al.** (2009) potvrdili promenljivost komponenti etarskog ulja čak i kod biljaka koje su verovatno poreklom od istih roditelja (rasle na istom području). Variranja u prinosu na dnevnom i sezonskom nivou su takođe ekperimentalno potvrđena (**Vokk et al.**, 2011). Na osnovu dosadašnjih ispitivanja, smatra se da su variranja u kvalitativnom sastavu etarskih ulja pod genetičkom kontrolom, a da su variranja u kvantitativnom sastavu pod kontrolom spoljašnjih faktora (**Valmaa et al.**, 2007; **Bakkali et al.**, 2008).

Iz familije biljaka Lamiaceae, za testiranja u ovom radu, izabrane su četiri biljne vrste (majčina dušica, pitoma nana, divlja nana i bosiljak). Etarsko ulje majčine dušice (*Thymus serpyllum* L.) dobijeno je iz cveta i lista biljke. Prinos ulja iznosio je 1,80% v/w, a ukupan broj detektovanih komponenti bio je 41. Dominantne komponente u ovom ulju bile su geraniol (32,43%), karvakrol

(16,97%), timol (11,59%) i p-cimen (11,58%). Najveći deo ulja sastoji se od monoterpena (ugljovodonici - 21,08%, oksidovani monoterpeni - 39,54%), a zatim slede fenoli (28,56%), seskviterpenski ugljovodonici (9,17%), oksidovani seskviterpeni (0,57%) i ostala jedinjenja (alkoholi - 1,01%). Timol (36,12-49,10%) i p-cimen (18,99-21,15%) su glavne komponente izdvojene iz etarskog ulja majčine dušice poreklom iz Srbije u brojnim publikacijama (**Nikolić et al.**, 2014; **Pecarski et al.**, 2014; **Soković et al.**, 2007, 2009). Ove dve komponente kao najdominantnije navode se i u sastavu ulja majčine dušice poreklom iz Maroka (**Ouedrihiri et al.**, 2016). Sa druge strane, **Petrović i sar.** (2014) ukazuju da su u ulju iz Srbije glavne komponente (E)-nerolidol (24,2%) i timol (7,26%), dok su **Stanisavljević i sar.** (2012) detektovali glavne komponente β -kariofilen (27,7%) i murolen (10,5%). **Rus et al.** (2015) navode da su glavne komponente ulja gajene i samonikle majčine dušice iz Rumunije bili karvakrol i p-cimen, **Hussain et al.** (2013) navode da je karvakrol (44,4%) bio najprisutnija komponenta u ulju poreklom iz Pakistana, a **Nikolić et al.** (2014) timol (38,5%) u ulju poreklom iz Grčke. U ulju majčine dušice poreklom iz Grčke, pored dominantne komponente timola, prisutni su i p-cimen (8,9%), γ -terpinen (7,2%) i bornil acetat (7%) (**Nikolić et al.**, 2014), dok su u ulju iz Pakistana pored karvakrola, prisutni i o-cimen (14%), α -terpeniol (6,47%), α -pinen (6,06%) i β -kariofilen (5,25%) (**Hussain et al.**, 2013).

Etarsko ulje pitome nane (*Mentha piperita* L.) dobijeno je iz cveta i lista biljke sa prinosom od 1,15% v/w i ukupno 48 detektovanih komponenti. Glavne komponente ovog ulja su bile mentol (36,80%) i menton (26,21%). Oksidovani monoterpeni (86,29%) su bili ubedljivo najzastupljenija grupa u ulju pitome nane, a zatim slede seskviterpenski ugljovodonici (7,43%), monoterpenski ugljovodonici (2,73%), oksidovani seskviterpeni (1,33%) i ostala jedinjenja (1,69%). Mnogi istraživači su potvrdili u svojim publikacijama da su mentol i menton glavne komponente etarskog ulja pitome nane poreklom iz Srbije (**Nikolić i sar.**, 2013; **Šarić et al.**, 2014; **Đurović-Pejčev et al.**, 2014). Do istog nalaza došli su i **Mogosan et al.** (2017) analizom etarskog ulja pitome nane poreklom iz Rumunije. Međutim, pojedini autori iz Srbije pored mentona i mentola, ukazuju i na značajno prisustvo mentil acetata (**Dražić i Ristić**, 2000; **Soković et al.**, 2007, 2009; **Samoljik et al.**, 2012), ali i izomentona (**Zeković et al.**, 2009). **Kazemi et al.** (2012) navode da su glavne komponente etarskog ulja pitome nane iz Irana bile takođe menton, mentol i mentil acetat. Geoklimatski uslovi veoma utiču na sastav i sadržaj dominantnih komponenti etarskog ulja. Tako su u ulju pitome nane iz Grčke utvrđene dominantne komponente karvon (50,6%) i 1,8-cineol (10,9%) (**Alexopoulos et al.**, 2011), dok su karvon (49,27%) i limonen (37,18%) preovladavale u ulju ove biljke iz Brazila (**De Sousa Barros et al.**, 2015). Dominantne komponente ulja iz Južne Koreje su bile piperitin oksid (28,3%), limonen (14,4%), mentol (12,1%) i 1,8-cineol (11,6%) (**Hyun et al.**, 2015), a linalol (41,4%) i linalol acetat (39,5%) u ulju pitome nane iz Maroka (**Asbahani et al.**, 2015).

Etarsko ulje divlje nane (*Mentha spicata* L.) izdvojeno je iz lista i cveta biljke. Prinos ulja bio je 1,02% v/w, a ukupan broj detektovanih komponenti je 43. Ulje divlje nane najviše sadrži oksidovane monoterpene: 1,8-cineol (22,05%), linalol (19,23%) i mentil acetat (14,21%), i monoterpenski ugljovodonič limonen (9,42%). U ovom ulju uopšteno dominiraju monoterpeni (ugljovodonici - 26,21% i oksidovani monoterpeni - 68,21%), dok seskviterpeni obuhvataju oko 4% (ugljovodonici - 3,79% i oksidovani seskviterpeni - 0,26%). Glavna komponenta u ulju divlje nane poreklom iz Grčke bio je 1,8-cineol (ostrvo Zakiontos), uz jedinjenja trans piperitenon oksid i piperitenon oksid (**Cook et al.**, 2007). **Cook et al.** (2007) navode da se su na različitim lokacijama i u različitim delovima biljke zastupljeni različiti sadržaji dominantnih komponenti, pa je tako prisustvo 1,8-cineola u ulju dobijenom iz cele biljke divlje nane bilo od 10,8 do 37,9%. Ovo jedinjenje je bilo glavna komponenta ulja iz cele biljke (37,9%) i iz lista (40,5%) na jednoj od tri ispitivane lokacije, dok je u ulju dobijenom iz cveta biljke na sve tri lokacije dominirao piperitenon oksid (32,1 - 46,3%). U dostupnim publikacijama o sastavu etarskog ulja divlje nane (*M. spicata*) poreklom iz Srbije, navodi se da su glavne komponente bile karvon (~49,5%) i menton (~21,9%) (**Soković et al.**, 2007, 2009), a takođe i u uljima ove biljke poreklom iz Rumunije (**Mogosan et al.**, 2017) i Irana (**Kazemi et al.**, 2012). Karvon je najdominantnija komponenta i u ulju divlje nane (*M. spicata*) iz Brazila (**De Sousa Barros et al.**, 2015), Južne Koreje (**Hyun et al.**, 2015), Maroka (**Asbahani et al.**, 2015) i Turske (**Figueredo et al.**, 2012; **Starović et al.**, 2016). Sa druge strane, u etarskom ulju druge

vrste divlje nane (*Mentha pulegium* L.) poreklom iz Maroka dominiraju pulegon (73%) i izomenton (13,4%) (Asbahani et al., 2015), dok su u ulju iste biljke poreklom iz Grčke dominantni 1,8-cineol (17,5%) i linolal acetat (18,9%) (Alexopoulos et al., 2011). U etarskom ulju divlje nane treće biljne vrste (*Mentha longifolia* L.) iz Brazila dominiraju piperitenon oksid (60,79%) i limonen (13,81%), dok u ulju iste biljne vrste iz Irana dominiraju pulegon (~47%) i 1,8-cineol (~12,5%) (Qasemi et al., 2021; Kelidari et al., 2022). Primetne razlike u sastavu i sadržaju komponenti pomenutih etarskih ulja, kao što je već napomenuto ranije, mogu se pre svega objasniti različitim geoklimatskim uslovima u kojima biljke rastu.

Etarsko ulje bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) izolovano iz lista imalo je prinos 1,80% v/w i ukupno 44 detektovane komponente. Ulje je bilo najbogatije u sadržaju linalola (35,58%) i metil kavikola (32,39%). U ovom ulju su zastupljeni oksidovani monoterpeni (41,06%) i fenilpropanoidi (34,28%), zatim seskviterpensi ugljovodonici (13,34%), oksidovani seskviterpeni (5,61%) i monoterpeni ugljovodonici (5,21%). U ulju bosiljka izolovanom iz cveta, linalol (48,9%) i metil kavikol (17,79%) su takođe dominantne komponente, a oksidovani monoterpeni (54,10%) najzastupljenija vrsta jedinjenja. U poređenju sa uljem iz lista, ulje iz cveta sadrži znatno manje fenilpropanoida (18,33%), dok su sadržaji seskviterpenskih ugljovodonika (17,13%), oksidovanih seskviterpena (6,85%) i monoterpenskih ugljovodonika (3,23%) slični. Prinos ulja iz cveta bio je nešto niži od ulja iz lista - 1,24% v/w, a ukupan broj detektovanih komponenti nešto veći - 48. U publikacijama različitih autora navodi se da su glavne komponente ulja bosiljka poreklom iz Srbije linalol i metil kavikol (Jelačić i sar., 2011; Radulović et al., 2013; Beatović et al., 2015). Drugi autori, Soković et al. (2007), Zeković et al. (2015) i Pavlič et al. (2018), su utvrdili da je ubedljivo najdominantnija komponenta ovog ulja bio samo linalol. Stanojević et al. (2017), pored linalola i metil kavikola, navode i druge značajne komponente ovog ulja: 1,8-cineol, geraniol, eugenol, kamfor, kamfen i α -pinen. Metil kavikol i linalol su glavne komponente ulja bosiljka poreklom iz Hrvatske (Liber et al., 2011), Indije (Verma et al., 2012) i Turske (Figueredo et al., 2012). Međutim, Calin-Sanchez et al. (2012) su zabeležili da je u ulju bosiljka iz Poljske glavna komponenta eugenol (20,1%).

Pored ulja četiri biljke iz familije Lamiaceae, odrađena je hemijska analiza etarskih ulja četiri zimzelene biljke (tuje, jele, bora i kleke). Etarsko ulje tuje (*Thuja orientalis* L.) izdvojeno je i iz iglica i iz ploda biljke. U oba ulja dominiraju monoterpeni ugljovodonici α -pinen (41,75% - ulje iglica i 43,75% - ulje ploda) i β -3-karen (26,4% - ulje iglica i 34,83% - ulje ploda). Uopšteno, monoterpeni ugljovodonici su najdominantniji u oba ulja (81,6% - ulje iglica i 93,86% - ulje ploda), zatim slede seskviterpensi ugljovodonici (12,15% - iglice i 3,41% - plod, oksidovani monoterpeni (1,88% - iglice i 1,3% - plod) i oksidovani seskviterpeni (3,36% - iglice i 1,27% - plod). Razliku u sastavima ulja iz iglica i iz ploda predstavlja i aldehid 2E-heksenal, prisutan samo u ulju iz iglica. Prinos ulja iz iglica bio je 0,58% v/w, a ukupan broj detektovanih komponenti 36. U ulju iz ploda prinos je bio 0,64% v/w i ukupno je određeno 33 komponente. α -pinen i β -3-karen su bile glavne komponente i u ulju tuje poreklom iz Italije (Benelli et al., 2012), dok su Loizzo et al. (2008), pored glavne komponente α -pinena, odredili i značajno zastupljene komponente δ -3-karen i α -kedrol u etarskom ulju iz Libana. U etarskom ulju tuje iz Poljske određena je glavna komponenta α -tujon (50,14%) (Tsiri et al., 2009), koja u ulju iz biljaka iz Srbije u ovim istraživanjima nije uopšte detektovana, pa se opet zaključuje da sadržaj i sastav etarskih ulja u velikoj meri zavise od geoklimatskih uslova.

Etarsko ulje jele (*Abies alba* Mill.) izolovano je iz iglica biljke. Prinos ulja je bio 0,35% v/w, dok je ukupan broj detektovanih komponenti iznosio 36. Dominantne komponente su bile α -pinen (19%), p-menta-2,4(8)-dien (15,99%), triciklen (11,61%), terpinen-4-ol (12,5%) i kamfen (10,58%). Uopšteno, u ovom ulju dominiraju monoterpeni (monoterpeni ugljovodonici - 72,98% i oksidovani monoterpeni - 25,18%), dok su seskviterpeni i ostala jedinjenja prisutna u procentima manjim od 1. Monoterpeni su ubedljivo najzastupljenija grupa jedinjenja i u ulju jele iz Francuske sa glavnim komponentama kamfenom (20,6%) i α -pinenom (19%) (Duquesnoy et al., 2007) i Koreje gde su glavne komponente bile bornil acetat (30,31%) i kamfen (19,81%) (Yang et al., 2009). U ulju jele poreklom iz Grčke i Francuske, komponenta limonen (68,3%) je bila najdominantnija (Kouks et al., 2001; Duquesnoy et al., 2007).

Etarsko ulje bora (*Pinus sylvestris* L.) izolovano je iz iglica biljke. Prinos ulja je bio 0,42% v/w, a ukupan broj detektovanih komponenti 47. Glavne komponente su α -pinen (37,48%), β -pinen (16,35%) i germakren D (13,35%). U sastavu ulja bora dominiraju monoterpeni ugljovodonici (59,98%) i seskviterpeni ugljovodonici (32,60%), dok oksidovani monoterpeni čine 4,21%, a oksidovani seskviterpeni svega 2,88%. **Tognolini et al.** (2006) navode da su α -pinen i β -pinen najdominantnije komponente belog bora poreklom iz Italije, dok je α -pinen glavna komponenta u dva analizirana etarska ulja belog bora poreklom iz Belorusije (**Shpak et al.**, 2007). Ulje bora poreklom iz Grčke najbogatije je β -felandrenom (29,14%), a pored njega sadrži značajno i α -pinen (19,44%) i β -pinen (17,27%) (**Koukos et al.**, 2001). **Koukos et al.** (2001) takođe navode da je u ulju izdvojenom iz crnog bora zabeležen visok sadržaj limonena (34,18%), α -pinena (1,38%), β -pinena (15,45%) i citronelola (14,97%).

Etarsko ulje kleke (*Juniperus communis* L.) izdvojeno je iz ploda biljke. Prinos ulja bio je 1,52% v/w, a ukupan broj detektovanih komponenti 63. Izdvojene su glavne komponente: α -pinen (32,06%), mircen (15,09%) i sabinen (14,2%). Monoterpeni ugljovodonici su dominantni sa 71,16%, a seskviterpeni ugljovodonici obuhvataju 22,31% sadržaja. Oksidovani monoterpeni su zastupljeni sa 3,55%, a oksidovani seskviterpeni sa svega 1,42%, dok ostala jedinjenja obuhvataju oko 0,7% sadržaja. Sabinen, mircen i α -pinen su dominantne komponente ulja kleke poreklom iz Srbije u publikacijama različitih autora (**Glišić et al.**, 2007; **Milojević et al.**, 2010; **Matović et al.**, 2011). Na primeru ovog ulja je takođe pokazan veliki uticaj geoklimatskih uslova na sastav etarskih ulja iste biljne vrste. Tako **Orav et al.** (2010) navode da je α -pinen glavna komponenta ulja kleke poreklom iz Estonije, dok **Cabral et al.** (2012) u ulju poreklom iz Portugalije i **Ottavioli et al.** (2009) u ulju iz Francuske navode da je sabinen bio glavna komponenta. Ulje kleke iz Portugalije, pored sabinena, značajno sadrži i α -pinen, limonen i 4-terpinenol (**Cabral et al.**, 2012), a ulje iz Francuske je bogato još limonenom i β -felandrenom (**Ottavioli et al.**, 2009). U ulju kleke poreklom iz Crne Gore, **Damjanović et al.** (2006) navode da su glavne komponente α -pinen, sabinen, germakren D i germakren B.

Etarsko ulje hajdučke trave (*Achillea millefolium* L.) izdvojeno je iz lista i cveta biljke. Prinos ulja bio je 0,21% v/w, a detektovana je čak 81 komponenta. Glavne komponente ovog ulja su β -pinen (17,99%), 1,8-cineol (10,3%), β -kariofilen (9,33%) i kamfor (7,99%). Monoterpeni ugljovodonici čine 30,90% sadržaja ulja, oksidovani monoterpeni 33,3%, seskviterpeni ugljovodonici 15,03%, oksidovani seskviterpeni (12,33%), dok ostala jedinjenja čine oko 8% sadržaja (od čega samo kamazulen čini 5,45%). **Haziri et al.** (2010) navode da je ulje hajdučke trave sa Kosova bogato u sadržaju 1,8-cineola (22%) i kamfora (21%). Kamfor (9,5-16,04%) je bio dominantna komponenta i u ulju poreklom iz Irana, pored kamazulena (48,9%) (**Alinezhad et al.**, 2011) i borneola (47,23%) (**Rahimmaleka et al.**, 2009). **Rahimmaleka et al.** (2009) ukazuju na znatne razlike u sastavu ulja različitih uzoraka hajdučke trave iz Irana, pa se za pojedine navodi da su najbogatija u sadržaju germakrena D (23,93-45,86%), dok su druga bogata α -kapienom (39,07%), spatulenolom (10,92%) i β -eudesmolom (9,34%). Ulje poreklom iz Australije najviše sadrži β -kariofilen (15,9%), 1,8-cineol (12%), bornil acetat (9,9%) i terpinen-4-ol (8,2%) (**Jadhav et al.**, 2013).

Etarsko ulje kantariona (*Hypericum perforatum* L.) je takođe izdvojeno iz lista i cveta biljke. Prinos ulja je bio znatno nizak, svega 0,08% v/w i ukupno je detektovano 65 komponenti. Dominantne komponente u ovom ulju bile su β -kariofilen (22,97%), 2-metil oktan (11,44%), (E)- β -farnesen (10,96%) i α -pinen (10,74%). Seskviterpeni ugljovodonici su najzastupljeniji u sadržaju sa 49,6%. Monoterpeni ugljovodonici čine 14,15%, oksidovani seskviterpeni 13,9%, oksidovani monoterpeni 1,58%, a ostala jedinjenja 20,69%. **Dorđević** (2015) i **Glišić i sar.** (2006) su potvrdili da su etarska ulja kantariona poreklom iz Srbije bogata β -kariofilenom, 2-metil oktanom i α -pinenom. Navedene tri komponente su u značajnom procentu prisutne i u ulju kantariona poreklom iz Grčke (**Pavlović et al.**, 2006), dok se u ulju iz Italije značajne β -kariofilen i germakren D (**Maggi et al.**, 2009).

Etarsko ulje mirođije (*Anethum graveolens* L.) izdvojeno je iz lista i semena biljke. Prinos ulja bio je dosta visok - 2,02% v/w, odnosno najviši u poređenju sa svim ostalim testiranim uljima. Broj detektovanih komponenti bio je najniži u odnosu na ostala testirana ulja, svega 16. Glavne

komponente ovog ulja su karvon (56,4%), limonen (22,83%) i α -felandren (14,02%). Osim 2E-decenala (0,07%), alifatičnog aldehida, sve ostale identifikovane komponente su pripadale grupi monoterpena. Oksidovani monoterpeni su zastupljeni sa 61,76% u sadržaju ulja, a monoterpenski ugljovodonici sa 37,96%. Analizom tri etarska ulja mirođije poreklom iz Srbije potvrđeno je da su monoterpeni najdominantniji u sastavu, gde su takođe karvon (51,7-54,5%) i limonen (40,6-43,1%) bile glavne komponente (Aćimović i sar., 2014). Karvon i limonen glavne su komponente i u uljima poreklom iz Južne Koreje (Yeom et al., 2012) i Uzbekistana (Yill et al., 2009). Međutim, u ulju poreklom iz Grčke, najznačajnije komponente su bile α -felandren sa 58,87% i metil eugenol sa 29,36% (Evergetis et al., 2013). Komponenta α -felandren (18,36%) bila značajna i u ulju poreklom iz Irana (Kazemi et al., 2012), dok Yill et al. (2006) navode da je etarsko ulje mirođije poreklom iz Kine najbogatije alkanima (trikosan - 9,14%, pentakosan - 27,96%, oktakosan - 13,81% i nonakosan - 6,85%). Zabeležene su i razlike u sadržaju i sastavu ulja mirođije izdvojenog iz lista i izdvojenog iz semena, pa su tako Radulescu et al. (2010) naveli dominantne komponente u ulju lista α -felandren (62,7%) i dil-etar (16,4%), a u ulju semena karvon (75,2%) i limonen (13,72%). Said-Al-Ahl et al. (2015) naveli su glavne komponente u ulju lista α -felandren (46,33%), p-cimen (17,88%), limonen (13,72%) i β -felandren (11,01%), a u ulju semena karvon (62,48%), limonen (14,61%) i dil-apiol (19,21%).

6.4. Antifungalno delovanje etarskih ulja prema *Trichoderma* spp. *in vitro*

Antifungalno delovanje 11 etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja poreklom iz Srbije: divlje nane, pitome nane, majčine dušice, bosiljka, jele, bora, tuje, kleke, hajdučke trave, kantariona i mirođije, određeno je primenom različitih *in vitro* metoda.

Fungicidno delovanje kontaktnom mikrodilucionom metodom prema svim vrstama *Trichoderma* ispoljila su etarska ulja mirođije i majčine dušice, dok su etarska ulja divlje i pitome nane ispoljila fungicidni efekat samo prema vrstama izolovanim iz gajilišta bukovače i šitake. Najbolje inhibitorno delovanje ispoljilo je ulje mirođije, a zatim slede ulja biljaka iz familije Lamiaceae (majčina dušica, divlja nana, pitoma nana i bosiljak). Prema vrstama *T. harzianum* kompleksa izolovanim iz gajilišta šampinjona (*T. guizhouense*, *T. pholiotae* i *T. atrobrunneum*), zabeleženo je ujednačeno delovanje svih ulja, a najosetljivija je bila vrsta *T. atrobrunneum*. Testiranjem izolata sa šitake utvrđena je veća osetljivost vrste *T. guizhouense* u poređenju sa *T. simmonsii*. Delovanje svih testiranih ulja bilo je ujednačeno i prema izolatima sa bukovače (*T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum*). Primenom fumigantnih metoda minimalne inhibitorne koncentracije (odnosno 100% inhibitorno delovanje) zabeležene su samo za etarska ulja četiri biljke iz familije Lamiaceae (divlju nanu, pitomu nanu, majčinu dušicu i bosiljak). Etarsko ulje mirođije ispoljilo je inhibitorno delovanje samo prema sporama određenih vrsta (*T. guizhouense*, *T. atrobrunneum* i *T. aggressivum* f. *europaeum*). Najbolje fumigantno delovanje prema sporama svih testiranih vrsta ispoljilo je etarsko ulje bosiljka, prema kojem je vrsta *T. pleuroticola* bila najosetljivija.

Potvrdu zadovoljavajućeg antifungalnog delovanja etarskih ulja biljaka iz familije Lamiaceae prema *Trichoderma* spp. izolovanih iz gajilišta šampinjona publikovali su brojni autori (Soković and Van Griensven, 2006; Soković et al., 2009; Đurović-Pejčev et al., 2014; Luković et al., 2020), a takođe je zabeležena i prema drugim fito- i mikopatogenima (Tanović et al., 2006; Soković et al., 2009; Abdolahi et al., 2010; Todorović et al., 2016; Gea et al., 2019b; Luković et al., 2019a, b).

U ispitivanjima fumigantnog antifungalnog delovanja šest etarskih ulja iz Srbije (bosiljak, pitoma nana, kantarion, orah, hajdučka trava i kleka) prema *T. aggressivum* f. *europaeum* koja su sprovedli Đurović-Pejčev et al. (2014), najbolje delovanje ispoljila su etarska ulja bosiljka i pitome nane sa MIC od 0,02 μ l/ml vazdušne faze, odnosno 0,04 μ l/ml vazdušne faze, a najslabije hajdučke trave, dok ulje kleke nije ispoljilo nikakvo delovanje. Autori su utvrdili da je samo ulje pitome nane ispoljilo fungicidno delovanje prema *T. aggressivum* f. *europaeum* (MFC 0,64 μ l/ml vazdušne faze). Etarska ulja različitih vrsta roda *Mentha* iz Srbije ispoljila su zadovoljavajuće antimikrobno delovanje, posebno ulja divlje (*M. spicata*) i pitome nane (*M. piperita*), prema *T. viride* pri

koncentraciji od 0,25 µg/ml, kao i prema vrsti *T. harzianum*, zatim *L. fungicola* var. *fungicola* i mikopatogenoj bakteriji *Pseudomonas tolaasi* izolovanih iz gajilišta šampinjona (**Soković and Van Griensven**, 2006; **Soković et al.**, 2009). Isti autori navode i da etarska ulja majčine dušice iz Crne Gore i origana (*Origanum vulgare* L.) iz Srbije i Crne Gore ispoljavaju jako antifungalno delovanje prema *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. harzianum* i *T. atroviride*, ali i drugim patogenima. Dva uzorka etarskog ulja nane, od ukupno 22 testirana ulja poreklom iz Albanije i Nemačke, ispoljila su najjaču aktivnost prema *Verticillium dahliae* (**Luković et al.**, 2019a) i *Cryphonectria parasitica* (**Luković et al.**, 2019b). Nasuprot ovim rezultatima, prema fito- i mikopatogenim bakterijama bolju aktivnost su ispoljila ulja origana, limuntrave i zimzelena iz Nemačke (**Todorović et al.**, 2016), dok je za ulje nane prema *P. tolasii* zabeležena MIC od 0,32 µl/ml vazdušne faze.

Tanović et al. (2006) su izdvojili ulja majčine dušice, origana i karanfilića iz Srbije, od ukupno 18 testiranih, kao najefikasnija prema prouzročivačima paučinaste plesni, mokre i suve truleži šampinjona (*Cladobotryum* spp., *M. pernicioso* i *L. fungicola* var. *fungicola*) primenom fumigantne metode. **Gea et al.** (2019b) su utvrdili da su etarska ulja majčine dušice (ED₅₀=35,5 µl/ml) i planinskog čubra (*Satureja montana* L.) (ED₅₀=35,5 µl/ml) iz Španije ispoljila zadovoljavajuće kontaktno delovanje prema *C. mycophilum*, a njihova efikasnost je bila zadovoljavajuća i u oglednom gajilištu.

Inhibitorno delovanje etarskog ulja bosiljka prema *Botrytis cinerea* na 0,5 µg/ml sa inhibicijom micelije od 42,5% potvrdili su **Abdolah et al.** (2010), dok je prema istom patogenu zabeleženo da ulje nane (*M. pulegium*) inhibira porast micelije 58,5% na 250 µg/ml (**Bouchra et al.**, 2003). **Mimica-Dukić and Božin** (2007) navode da etarska ulja iz familije Lamiaceae poseduju visoku antimikrobnu aktivnost potvrđenu preko inhibicije različitih gljiva i bakterija, pa su tako etarska ulja divlje nane, pitome nane, majčine dušice i bosiljka pokazala snažno delovanje i prema *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus* i *Fusarium moniliforme*.

Hatvani et al. (2012) su testiranjem delovanja komponenti etarskih ulja i drugih prirodnih jedinjenja na porast micelije patogena *T. pleuroti*, *T. pleuroticola* sa bukovače i *T. harzianum* sa šampinjona i domaćina bukovače i šampinjona, utvrdili da timol, mentol i ferulinska kiselina ispoljavaju jaku inhibiciju prema ovim patogenima pri niskim koncentracijama (0,08 - 1,25 µg/ml). Međutim, ova jedinjenja u velikoj meri inhibiraju i rast domaćina, pa se preporučuju dalja istraživanja u oglednim gajilištima.

Kao što je već ranije napomenuto, etarsko ulje mirođije imalo je najbolju antifungalnu aktivnost prema svim testiranim vrstama roda *Trichoderma*. Antifungalna aktivnost je potvrđena fumigantnom i kontaktnim metodama, pri čemu se zaključilo da etarsko ulje mirođije bolje deluje kontaktno. Primetno je da su MIC vrednosti zabeležene u makrodilucionoj kontaktnoj metodi bile veće u odnosu na dobijene mikrodilucionom kontaktnom metodom, ali uzimajući u obzir veću zapreminu primene, način pripreme emulzije i mogući gubitak dela isparljivih antifungalnih sastojaka etarskog ulja, tom uvećanju se ne može pripisati veća značajnost. Uz manji utrošak ulja primenom kontaktnih metoda postiže se znatno bolji efekat u poređenju sa metodom fumigacije, gde je potrebno obezbediti znatno veće količine ulja kako bi se postiglo zadovoljavajuće delovanje. Nasuprot ovim rezultatima, **Ma et al.** (2015) navode da etarsko ulje semena mirođije bolje inhibira porast micelije i klijanje sklerocija patogena *Sclerotinia sclerotiorum* primenom fumigantne metode na 0,125 µl/ml nego primenom kontaktne metode (1 µl/ml).

Pored antifungalnog delovanja etarskog ulja, isti autori su testirali i antifungalno delovanje dve glavne komponente ulja mirođije, karvon i limonen, pojedinačno i u kombinaciji. Ustanovili su da komponenta karvon znatno bolje inhibira porast *S. sclerotiorum* i da se pri kombinovanju ove dve komponente ispoljava sinergistička reakcija (**Ma et al.**, 2015).

Literaturni podaci za antifungalno delovanje etarskog ulja mirođije na mikopatogene jestivih gljiva nisu pronađeni, ali je zabeležena umerena do značajna aktivnost ovog ulja prema brojnim drugim fitopatogenima (**Tian et al.**, 2012; **Arıcı and Sanli**, 2014; **Ma et al.**, 2015; **Chahal et al.**, 2016; **Karimi et al.**, 2016; **Kaur et al.**, 2020; **Benlembarek et al.**, 2022). **Benlembarek et al.** (2022) su zabeležili umerenu aktivnost ulja mirođije prema *Fusarium gramineum* i *Alternaria alternata*, dok su **Tian et al.** (2012) naveli da ulje mirođije ispoljava jaku aktivnost prema *Aspergillus oryzae*,

Aspergillus niger, *A. flavus* i *A. alternata*. Značajnu aktivnost ulja mirođije prema *A. alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, kao i prema *Colletotrichum nymphaeae* zabeležili su **Chahal et al.** (2016) i **Karimi et al.** (2016).

Delimično inhibitorno delovanje samo prema određenim vrstama *Trichoderma* ispoljila su etarska ulja hajdučke trave i četiri zimzelene biljke (jela, kleka, tuja i bor), dok je za etarsko ulje kantariona zabeleženo stimulatívno delovanje na porast micelije svih testiranih vrsta. Etarsko ulje hajdučke trave najbolju aktivnost ispoljilo je prema vrstama sa šampinjona (*T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. pholiotae* i *T. guizhouense*). Etarsko ulje bora nije ispoljilo inhibitorni efekat prema testiranim vrstama iz *T. harzianum* kompleksa (*T. atrobrunneum*, *T. pholiotae*, *T. simmonsii*, *T. guizhouense*, *T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum*), dok etarsko ulje tuje nije ispoljilo inhibitorni efekat samo prema vrstama sa šampinjona (*T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. pholiotae* i *T. guizhouense*). Etarsko ulje kleke nije inhibiralo jedino rast vrste *T. guizhouense* izolovane sa šampinjona. Najbolja antifungalna aktivnost među zimzelenim biljkama zabeležena je za etarsko ulje jele.

Etarska ulja četiri zimzelene biljke ispoljila su zadovoljavajući fumigantni efekat samo prema *T. cf. harzianum*, dok je kantarion ispoljio stimulatívno delovanje na porast micelije svih vrsta. Fumigantno inhibitorno delovanje etarskog ulja hajdučke trave bilo je najslabije prema *T. atrobrunneum* (48,35%), a najjače prema *T. pleuroti* (97,5%) pri najvećoj testiranoj koncentraciji, 0,32 µl/ml vazdušne faze. **Durović-Pejčev et al.** (2014) su zabeležili da etarsko ulje hajdučke trave poreklom iz Srbije može u potpunosti inhibirati porast micelije *T. aggressivum* f. *europaeum* pri 0,64 µl/ml vazdušne faze. **Woods-Panzaru et al.** (2009) navode da etarska ulja druge dve vrste *Achillea* (*A. clavенаe* i *A. alpine*) mogu ispoljiti i određena antibakterijska svojstva. Jaka fungistatična aktivnost ekstrakata hajdučke trave zabeležena je prema *A. alternata*, *B. cinerea*, *Colletotrichum coccides* i *Fusarium oxysporum* (**Kursa et al.**, 2022), kao i prema *A. niger* i *Penicillium hirsutum* (**Fierascu et al.**, 2015).

Antimikrobno delovanje etarskog ulja kantariona poreklom iz Srbije (Vranje, Ljubovija i Divčibare) ispitali su **Saroglou et al.** (2007), **Durović-Pejčev et al.** (2014) i **Luković et al.** (2020). **Saroglou et al.** (2007) su utvrdili da etarsko ulje kantariona iz Vranja ispoljava antibakterijsko delovanje prema *P. tolasii*, dok su **Durović-Pejčev et al.** (2014) utvrdili da etarsko ulje kantariona iz Ljubovije ima značajan antifungalni efekat prema *T. aggressivum* f. *europaeum* pri koncentraciji od 0,08 µl/ml vazdušne faze. Pri fumigantnoj metodi zabeležen je procenat inhibicije porasta micelije <40% pri 0,32 µl/ml vazdušne faze, a u kombinacijama ulja kantariona sa uljima koja su ispoljila jako delovanje u pojedinačnim ispitivanjima zabeležena je smanjena aktivnost tih ulja (divlja nana, pitoma nana, bosiljak, majčina dušica) (**Luković et al.**, 2020). U okviru ovih istraživanja zabeleženo je da se kolonija micelije izolata *Trichoderma* vrsta izložena delovanju etarskog ulja kantariona dosta brzo razvijala, gde je za kratko vreme prerasla celu površinu i započela rast van izdižući poklopac Petri kutije. Pored bujne micelije, zabeležena je i obilna sporulacija testiranih izolata, što ukazuje da ovo ulje na njih deluje stimulatívno. Stimulatívno delovanje etarskog ulja kantariona može biti predmet nekih daljih istraživanja, jer se pojedine vrste roda *Trichoderma* uspešno koriste u biološkoj kontroli i njihov uspešniji i brži razvoj bio bi od velikog značaja u toj oblasti.

Durović Pejčev et al. (2014) su u svojim istraživanjima zabeležili da etarsko ulje kleke nije ispoljilo inhibitorni efekat prema *T. aggressivum* f. *europaeum* ni pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji od 0,64 µl/ml vazdušne faze, dok su **Tanović et al.** (2006) zabeležili inhibitorni efekat ulja kleke prema *L. fungicola* i *Cladobotryum* spp. pri 0,32 µl/ml vazdušne faze, kao i prema *M. pernicioza* pri 0,16 µl/ml vazdušne faze. Za *L. fungicola* i *M. pernicioza* zabeležen je i fungicidni efekat pri 0,32 i 0,16 µl/ml vazdušne faze. U istom radu navedeni su zadovoljavajući rezultati delovanja (µl/ml vazdušne faze) etarskog ulja bora prema *L. fungicola* (MIC=0,08; MFC=0,65), *M. pernicioza* (MIC=0,16; MFC=0,16), kao i za *Cladobotryum* spp. (MIC=0,65; MFC=0,65). Etarska ulja bora i kleke ispoljila su inhibitorni efekat i prema zemljišnim patogenima *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* sp. i *Pythium* sp. pri koncentraciji od 0,65 µl/ml vazdušne faze (**Tanović et al.**, 2007).

Prilikom ispitivanja delovanja 22 etarska ulja poreklom iz Nemačke i Albanije, među kojima su bila i ulja različitih vrsta borova (*Pinus* spp.), jela i kleka, prema parazitnoj gljivi *C. parasitica*,

utvrđeno je da su crni bor i jela ispoljili fungicidni efekat sa MFC vrednostima 0,02 odnosno 0,04 µl/ml vazdušne faze (**Luković et al.**, 2019b). Međutim, u ispitivanjima sprovedenim prema *V. dahliae*, nije zabeležen inhibitorni efekat za etarsko ulje jele, dok su MIC za ulja belog bora i crnog bora iznosile 0,32 odnosno 0,16 µl/ml vazdušne faze. Za etarsko ulje crnog bora zabeležen je fungicidno delovanje (MFC=0,16) (**Luković et al.**, 2019a). Antibakterijsko delovanje ulja jele i četiri vrste bora (*Pinus* spp.) nije potvrđeno prema patogenoj bakteriji šampinjona *P. tolasii*, dok su za patogenu bakteriju *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* potvrđene MIC za ulja jele (0,02 µl/ml vazdušne faze) i *Pinus* spp. (od 0,02 do 0,32 µl/ml vazdušne faze) (**Todorović et al.**, 2016).

Što se tiče etarskog ulja tuje i njegove glavne komponente tujona, navodi se da mogu imati značajnu ulogu u rešavanju zdravstvenih problema ljudi kroz različita antioksidativna, antiinflamatorna, antivirusna, antibakterijska i antikancerogena svojstva, a pored toga se mogu koristiti i u zaštiti od različitih štetočina, jer je zabeleženo da ispoljavaju određena insekticidna, moluskocidna i nematocidna dejstva (**Srivastava P. et al.**, 2012; **Srivastava A. et al.**, 2022). Antifungalno delovanje ulja tuje zabeleženo je prema humanim patogenim gljivama (**Lie et al.**, 2010), ali i prema nekim fitopatogenima poput *A. alternata* i *Curvularia lunata* (**Guleriaa et al.**, 2007). Prema *C. lunata* značajnu aktivnost ekstrakta lista tuje zabeležili su i **Mishra et al.** (1992). **Sharma and Sharma** (2016) potvrdili su antibakterijsku aktivnost etarskog ulja tuje sa MIC od 1,32 do 2,87 mg/l, kao i antifungalnu aktivnost prema *A. alternata*, *A. niger* i *Penicillium* spp. (MIC od 1,86 do 2,87 mg/l). Takođe, ispitali su i delovanje glavne komponente tujona zabeleživši antimikrobnu aktivnost na nižim koncentracijama (0,76 do 0,86 mg/l za gljive).

Delovanje kombinacija etarskih ulja

Primenom *Checkerboard* metode ispitivano je dejstvo tri kombinacije etarskih ulja, gde je etarsko ulje mirođije kombinovano sa uljima majčine dušice, divlje nane i pitoma nane. Najbolja kombinacija je bila mirođija-divlja nana, koja je prema svim testiranim vrstama ispoljila sinergističko dejstvo sa FiCi indeksima od 0,19 do 0,50, osim prema vrsti *T. pholiotae* (FiCi = 0,62, aditivno dejstvo). Najosetljivija vrsta prema kombinaciji mirođija-divlja nana bila je *T. afroharzianum*, dok je vrsta *T. pholiotae* bila najotpornija. Najslabije delovanje ispoljila je kombinacija mirođija-majčina dušica, ali čak se ni kod ove kombinacije nije ispoljila antagonistička reakcija. Generalno, vrste *T. aggressivum* f. *europaeum* i *T. simmonsii* pokazale su najveću osetljivost prema sve tri testirane kombinacije.

Luković et al. (2020) testirali su 10 kombinacija etarskih ulja majčine dušice, divlje nane, pitome nane, bosiljka i kantariona (mešavina u odnosu 1:1) prema *T. aggressivum* f. *europaeum*, i izvojili su dve kombinacije sa najjačom aktivnošću: divlja nana-pitoma nana i divlja nana-majčina dušica, što je u skladu sa rezultatima ovog rada gde je upravo kombinacija sa divljom nanom pokazala najbolje dejstvo. Ispitivanjem delovanja kombinacije majčina dušica-origano prema gljivama izolovanih sa lekovitog bilja: *A. niger*, *A. flavus*, *A. alternata* i *Fusarium* spp., **Stević et al.** (2014) beleže sinergističku reakciju, za koju se navodi da su odgovorne glavne komponente ova dva ulja - timol i karvakrol, dok je kombinacija ulja ruža-lavanda ispoljila sinergističko dejstvo prema vrstama iz roda *Fusarium* (**Stević**, 2013). Slični rezultati delovanja kombinacije ulja majčina dušica-origano zabeleženi su prema *Aspergillus* spp. i *Penicillium chrysogenum* (**Hossain et al.**, 2016), kao i prema *B. cinerea* i *Penicillium expansum* (**Nikkhah et al.**, 2017).

U svim navedinim publikacijama istaknuto je da je dejstvo kombinacija ulja bilo značajno bolje nego aktivnost pojedinačnih ulja prema patogenima, što je takođe u skladu sa dobijenim rezultatima ovog istraživanja. Podaci o sinergističkom delovanju kombinacija etarskih ulja su od velikog značaja za dalja istraživanja vezana za potencijalnu formulaciju biofungicida na bazi kombinacija ulja, a u praksi je već pokazano da se toksičnost antifungalnog jedinjenja značajno povećava kada se kombinuje sa drugim (**Tripathi and Dubey**, 2004).

6.5. Antifungalno delovanje etarskih ulja prema *Trichoderma* spp. *in vivo*

Efikasnost etarskog ulja mirođije, biofungicida na bazi azadiraktina (komponente etarskog ulja nim drveta *Azadirachta indica* Juss.) i fungicida prochloraza u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* (T77) procenjena je u oglednom gajilištu šampinjona. Efikasnost jedinjenja određena je na osnovu intenziteta bolesti u inokulisanoj kontroli i tretmanima. Najveća efikasnost postignuta je primenom fungicida prochloraza u standardnoj dozi primene i biofungicida na bazi azadiraktina u standardnoj dozi primene (~75%). Etarsko ulje mirođije u dozi primene od 2% (~70%) ispoljilo je veću efikasnost u poređenju sa etarskim uljem mirođije primenjenim u dozi od 1% (~60%).

Ispitivanjem efikasnosti ulja čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia* L.) u gajilištu bukovače (*in vivo*) prema *T. harzianum*, **Angelini et al.** (2008) su uočili da primena ovog ulja na supstrat namenjen za uzgoj bukovače daje rezultate delimične do potpune inhibicije patogena. Etarsko ulje čajnog drveta testirano je i u gajilištu šampinjona prema *T. harzianum* (~30%) (**Kosanović et al.**, 2013) i prema *C. dendroides* (~33%) (**Potočnik et al.**, 2010). Ulje čajnog drveta primenjeno u standardnoj dozi od 1% ispoljilo je manju efikasnost (~30%) u poređenju sa biofungicidom na bazi *Bacillus subtilis* QST 713 (~45%) prema *T. harzianum*, a pored toga je i u kombinaciji sa fungicidom imao manju efikasnost (~15%) nego kombinacija fungicid i *B. subtilis*. (~30%) zbog antagonističke reakcije prochloraza i oba biofungicida (**Kosanović et al.**, 2013). Ipak, ulje čajnog drveta primenjeno u standardnoj dozi od 1% prema *C. dendroides* izazvalo je značajnu redukciju simptoma bolesti paučinaste plesni (14%) (**Potočnik et al.**, 2010).

Gea et al. (2019b) su testirali dva etarska ulja (majčina dušica i planinski čubar) u oglednom gajilištu šampinjona prema *C. mycophilum* u dozama od 0,5 i 1% i zabeležili veću efikasnost oba ulja u većoj dozi primene (1%), tj. ulja majčine dušice 54% i ulja planinskog čubra 86% primenjenih dan pre inokulacije patogena, 10. dana od pokrivanja. Efikasnost ulja majčine dušice i planinskog čubra primenjenih dva dana nakon inokulacije patogena (13. dan od pokrivanja) bila je bolja čak i od kontrolnog fungicida metrafenona, koji je do tada važio za najefikasnije antifungalno jedinjenje u suzbijanju ovog patogena (**Carrasco et al.**, 2017). Utvrđeno je da etarska ulja majčine dušice i biljke *Lippia rehmanni* primenjena 0,4% suzbijaju potpuno pojavu simptoma prouzrokovala mokre truleži šampinjona kod inokulacije *M. perniciosa* 10⁴ spora/ml, bez štetnog uticaja na prinos domaćina (**Regnier and Combrinck**, 2010).

Delovanje etarskog ulja mirođije *in vivo* ispitivano je prema pojedinim zemljišnim patogenima: *Ralstonia solani*, *Streptomyces scabies* i *S. sclerotiorum* (**Arici and Sanli**, 2014; **Ma et al.**, 2015). **Ma et al.** (2015) došli su do zaključka da ulje mirođije pokazuje značajan fungicidni potencijal prema *S. sclerotiorum* i moglo bi se primenjivati nakon poljskih ispitivanja, posebno u usevima uljane repice. **Arici and Sanli** (2014) navode da bi se uz ulje mirođije mogla koristiti još ulja origana i žalfije za suzbijanje *R. solani* i *S. scabies* u krompiru, jer su pri najvišim koncentracijama od 1000 mg/l u oglednom polju ispoljili značajnu efikasnost od ukupno šest testiranih ulja.

Efekat antifungalnih jedinjenja je analiziran i kroz uticaj na prinos šampinjona, takozvana biološka efektivnost (BE). Biološka efektivnost izračunata je kroz odnos sveže mase ubranih karpofora šampinjona i suve mase supstrata u vreme zasejavanja micelijom šampinjona (**Chrysai-Tokousbalides et al.**, 2007). U većini tretmana je zabeležena je BE veća od prinosa u netretiranoj kontroli, što ukazuje da su testirana jedinjenja delovala pozitivno na prinos šampinjona. Najniži prinos šampinjona zabeležen je pri tretmanu preparatom na bazi azadiraktina. **Kosanović et al.** (2013) su ustanovili da se primenom ulja čajnog drvena smanjuje prinos 47% u odnosu na netretiranu kontrolu, gde su najveća smanjenja prinosa zabeležena u tretmanima sa preparatom na bazi *B. subtilis* QST 713 (pojedinačnim 52% i u kombinaciji sa fungicidom 55%). Negativan uticaj etarskih ulja na prinos šampinjona nije zabeležen ni u *in vivo* ispitivanjima koja su sproveli **Gea et al.** (2019b) i **Regnier and Combrinck** (2010). U tekućem radu, nije bilo statistički značajne promene prinosa primenom etarskog ulja mirođije u odnosu na netretiranu kontrolu i određeno je sinergističko dejstvo u zajedničkom delovanju ulja sa fungicidom prochlorazom na prinos.

Interakcija etarskog ulja i fungicida

Ispitivanjem prirode međusobnog dejstva u istovremenoj primeni ulja mirođije i fungicida prohloraza (kroz sinergistički faktor - SF), etarsko ulje mirođije (u dozi primene 1% - SF=0,92; u dozi primene 2% - SF=1) ispoljilo je aditivno dejstvo u odnosu na efikasnost u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum*. U odnosu na istovremeno međusobno dejstvo na prinos šampinjona, etarsko ulje mirođije ispoljilo je sinergističku reakciju primenjeno u obe testirane doze (1 i 2%) u kombinaciji sa fungicidom prohlorazom (SF>1). **Kosanović et al.** (2013) su analizom prirode interakcije biofungicida sa fungicidom prohlorazom zabeležili antagonističku reakciju u odnosu na efikasnost u suzbijanju *T. harzianum* i na prinos šampinjona za oba testirana biofungicida. Autori navode da je kombinacija prohloraza sa uljem čajnog drveta (SF=0,2) ispoljila veći stepen antagonizma od kombinacije prohloraza sa *B. subtilis* QST 713 (SF=0,4). Ustanovili su da nasuprot rezultatima za efikasnost u kojima je kombinacija *B. subtilis* QST 713 i prohloraza ispoljila manji stepen antagonizma u poređenju sa kombinacijom etarskog ulja čajnog drveta i fungicida, ista kombinacija je na prinos (SF=0,5) ispoljila veći stepen antagonizma od kombinacije ulja i prohloraza (SF=0,8).

6.6. Osetljivost izolata *Trichoderma* spp. prema fungicidima

Primena fungicida u zaštiti jestivih gljiva, i pored svih otežavajućih faktora, je i dalje najčešći i najefikasniji oblik suzbijanja prouzrokovaca zelene plesni gajenih pečuraka. Prohloraz, fungicid iz grupe imidazola (DMI), je jedini fungicid koji se zvanično preporučuje za suzbijanje svih patogena prema Protokolu EPPO organizacije za upotrebu u zaštiti jestivih pečuraka u EU. Nedavno je uveden i fungicid metrafenon iz grupe benzofenona za suzbijanje *Cladobotryum* spp. i *Lecanicillium* spp. u Španiji, Francuskoj, Belgiji, UK i SAD (**Carrasco et al.**, 2017; **Anonymous**, 2020). U gajilištima šampinjona u Srbiji korišćeni su fungicidi mankozeb, karbendazim, benomil, tiofanat-metil i prohloraz, koji su se u brojnim ispitivanjima i praksi proizvođača svojevremeno pokazali efikasnim, iako nisu bili registrovani za zaštitu pečuraka od bolesti u Srbiji (**Potočnik**, 2009). Većina ovih fungicida je povučena sa tržišta, pa se danas u prometu za zaštitu pečuraka u Srbiji može naći jedino metrafenon. Pored malog broja dostupnih fungicida, veliki problem predstavlja razvoj rezistentnosti patogena koja se beleži prema njima (**Grogan and Gaze.**, 2000; **Gea et al.**, 2005; **Grogan**, 2006), ali i činjenica da je uvođenje novih fungicida u zaštitu pečuraka veoma teško, jer agrohemijske kompanije retko ulažu sredstva u razvoj novih fungicida namenjenih za primenu u malim usevima (**Chrysayi-Tokousbalides et al.**, 2007).

Zbog navedenih razloga, jedan od ciljeva ove disertacije bio je i ispitivanje *in vitro* osetljivosti izolata *Trichoderma* spp. prema fungicidima prohlorazu i metrafenonu primenom makrodilucione metode i probit analizom. Izolati su na osnovu EC₅₀ vrednosti grupisani kao: visoko osetljivi, umereno osetljivi i rezistentni (**Gea et al.**, 1996; **Grogan et al.**, 2000). Na osnovu RF vrednosti svrstani su u: umereno osetljive, umereno rezistentne, rezistentne i visoko rezistentne (**Gout**, 1994).

Svi testirani *Trichoderma* spp. izolati su bili visoko osetljivi prema oba fungicida sa EC₅₀ vrednostima od 0,03 (*T. pleuroti* KM11, *T. pleuroticola* KG6 sa bukovače i *T. pholiotae* T10 sa šampinjona) do 2,91 µg/ml (*T. simmonsii* T57 sa šitake) za fungicid metrafenon i od 0,004 (*T. pleuroticola* KG6 i *T. pleuroti* KM8 sa bukovače) do 0,14 µg/ml (*T. pleuroti* SZMC 12454 sa bukovače) za fungicid prohloraz. Najveće vrednosti faktora rezistentnosti (RF) za pojedine izolate su bile 42 za fungicid metrafenon i 28 za fungicid prohloraz, pri čemu je većina vrsta bila svrstana u grupu osetljivih.

Na osnovu ovog kriterijuma, najosetljivije vrste prema fungicidu metrafenonu bile su *T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum* sa EC₅₀ vrednostima od 0,05 µg/ml, dok su prema fungicidu prohlorazu najosetljivije bile *T. pleuroticola*, *T. afroharzianum* i *T. simmonsii* sa prosečnim EC₅₀ vrednostima od 0,01 µg/ml. Osetljivost *Trichoderma* spp. izolata iz gajilišta šampinjona prema prohlorazu utvrdili su i **Kosanović et al.** (2013), gde je EC₅₀ vrednost za *T. aggressivum* f. *europaeum* iznosila 0,4 µg/ml, a za *T. harzianum* (THSC) 0,7 µg/ml. Ispitivani izolati ovih *Trichoderma* vrsta

pokazali su najveću osetljivost upravo prema fungicidu prohlorazu, ali i visoku osetljivost prema karbendazimu, iprodionu i hlorotalonilu, dok su prema tiofanat-metilu i trifloksistrobinu bili rezistentni (**Kosanović et al.**, 2013). **Innocenti et al.** (2019) potvrdili su efikasnost prohloraza i prema *Trichoderma* izolatima iz gajilišta bukovače, tačnije prema *T. pleuroti* pri koncentraciji od 0,25 µl/ml i prema *T. pleurotica* pri koncentraciji od 1,25 µl/ml. **Innocenti et al.** (2019) su u *in vitro* i *in vivo* ogledima zabeležili da je vrsta *T. pleuroti* agresivnija od vrste *T. pleurotica*, što se poklapa sa rezultatima dobijenim u ovom radu, gde se *T. pleurotica* pokazala osetljivijom od *T. pleuroti* na oba testirana fungicida.

Vrste iz *T. harzianum* kompleksa ispoljile su veću osetljivost od *T. pleuroti* i *T. pleurotica* prema oba fungicida. Nasuprot ovim rezultatima, **Hatvani et al.** (2012) su kroz određivanje minimalnih fungicidnih i inhibitornih koncentracija i **Innocenti and Montanari** (2014) kroz poređenje inhibicija porasta kolonija, ustanovili da su vrste *T. pleuroti* i *T. pleurotica* osetljivije od *T. harzianum*. **Kredics et al.** (2010) beleže da su minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za fungicid prohloraz < 6 µg/ml za *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. pleuroti* i *T. pleurotica*, dok su za isti fungicid **Hatvani et al.** (2012) utvrdili MIC od 1,25 µg/ml za *T. pleuroti* i *T. pleurotica* i 5 µg/ml za *T. harzianum* (THSC).

Podataka za toksičnost fungicida metrafenona prema *Trichoderma* spp. je veoma malo, jer je tek nedavno uveden u nekim zemljama za suzbijanje drugih fungalnih patogena jestivih gljiva - *Cladobotryum* spp. i *Lecanicillium* spp. (**Carrasco et al.**, 2017). **Allaga et al.** (2021) navode da fungicid metrafenon inhibira vrste *T. harzianum* kompleksa samo u određenom stepenu, ispitivanjem inhibicije porasta kolonija, što se ne podudara sa ovim istraživanjima gde je ovaj fungicid pokazao zadovoljavajuću toksičnost prema svim *Trichoderma* vrstama uključujući i vrste iz kompleksa *T. harzianum*. U oba istraživanja su bila uključena tri izolata (*T. afroharzianum* KG10, *T. guizhouense* T58 i T59), gde su u krajnjim rezultatima zabeležene značajne razlike, ali se to može objasniti time što su izolati inkubirani u različitim uslovima (**Luković et al.**, 2021; **Allaga et al.**, 2021). **Allaga et al.** (2021) su inkubirali izolate duže (7 dana) i pri višoj temperaturi (25°C) bez poređenja sa kontrolom bez fungicida, što je omogućilo veći porast izolata (u tekućem istraživanju temperatura 20°C, period inkubacije 3 dana) i nepreciznu procenu inhibicije time što nisu koristili probit analizu za određivanja EC₅₀ vrednosti koja je odgovarajuća za poređenje različitih ogleda. Za razliku od fungicida metrafenona, **Allaga et al.** (2021) su odredili visoku toksičnost ovog fungicida prema *Trichoderma* spp., u saglasnosti sa drugim istraživanjima (**Kredics et al.**, 2010; **Hatvani et al.**, 2012; **Kosanović et al.**, 2013; **Innocenti and Montanari**, 2014; **Innocenti et al.**, 2019), uključujući i tekuće istraživanje. Takođe, **Allaga et al.** (2021) su jedini koji su testirali osetljivost *Trichoderma* izolata iz gajilišta šitake na fungicide, i ustanovili da je fungicid prohloraz pokazao veću toksičnost od metrafenona, što je rezultat i ovih istraživanja.

6.7. Selektivna toksičnost antifungalnih jedinjenja za jestive gljive

Osetljivost jestivih gljiva prema fungicidima prohlorazu i metrafenonu, kao i etarskom ulju mirođije, ispitivana je primenom makrodilucione metode *in vitro*. Najosetljiviji domaćin, prema sva tri testirana jedinjenja, bio je šampinjon (soj A15). Sve tri jestive gljive pokazale su visoku osetljivost prema etarskom ulju mirođije sa EC₅₀ vrednostima od 0,06 do 0,74 µg/ml, dok su najotpornije bile prema fungicidu metrafenonu sa EC₅₀ od 0,66 do 5,93 µg/ml. Osetljivost je zabeležena i prema fungicidu prohlorazu sa EC₅₀ od 0,1 do 1,91 µg/ml.

Selektivna toksičnost antifungalnih jedinjenja prikazana je kroz indeks selektivnosti, koji se izračunava kao odnos EC₅₀ vrednosti za patogenu gljivu (*Trichoderma* spp.) i odgovarajuće vrednosti za domaćina (jestivu gljivu). Ukoliko je vrednost za indeks selektivnosti manja, utoliko je selektivnost antifungalnog jedinjenja veća, odnosno to jedinjenje je dovoljno toksično za ciljanog patogena, a u isto vreme ne ispoljava toksičan efekat na rast i razvoj jestive gljive. **Chrysi-Tokousbalides et al.** (2007) navode da se antifungalna jedinjenja se indeksom selektivnosti manjim od 0,1 mogu ubrojiti u ona koja imaju zadovoljavajuću selektivnu toksičnost, i u svojim istraživanjima su potvrdili da

fungicidi prochloraz i karbendazim ispoljavaju ta svojstva, jer su njihove vrednosti indeksa selektivnosti za šampinjon i *Trichoderma* spp. bile manje od 0,1.

Osetljivost šampinjona (soj F56) ispitivali su **Potočnik et al.** (2009) i preko indeksa selektivnosti utvrdili da fungicidi karbendazim i prochloraz-Mn imaju najbolju selektivnu toksičnost sa indeksima selektivnosti od 0,01, odnosno 0,06 za šampinjon i *Cladobotryum* spp., dok su **Kosanović et al.** (2013) za iste fungicide zabeležili indekse selektivnosti od 0,02 i 0,05 za *Trichoderma* spp. i šampinjon. Osetljivost šampinjona (soj F56) prema fungicidima razmatrana je još u drugoj polovini 20. veka (**Challenand Elliot**, 1985; **Bonnen and Hopkins**, 1997). Indeksi selektivnosti za bukovaču i šiitake nisu pronađeni u dostupnoj literaturi, ali pojedni autori navode da prilikom ispitivanja osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata prema fungicidima nisu zabeležili negativne efekte na rast i razvoj bukovače (**Woo et al.**, 2004; **Hatvani et al.**, 2012; **Innocenti et al.**, 2019).

U ovim istraživanjima, indeks selektivnosti fungicida prochloraza za *Trichoderma* spp. i bukovaču bio je 0,01, a za šiitake 0,02, dok je indeks selektivnosti fungicida metrafenona za šampinjon bio 0,95. Oba fungicida su svrstana u grupu onih koji imaju zadovoljavajući selektivnu toksičnost, sa tom razlikom da je prochloraz povoljniji za bukovaču i šiitake, a metrafenon za šampinjon. Razlike u vrednostima indeksa selektivnosti koje se primećuju u ovom radu i istraživanjima **Kosanović et al.** (2013) mogu se objasniti time što su ispitivanja rađena sa različitim sojevima šampinjona (F56 i A15).

Etarsko ulje mirođije nije pokazalo zadovoljavajuću selektivnu toksičnost u *in vitro* testovima, jer su indeksi selektivnosti prema sve tri gljive domaćina bili visoki (od 5,38 do 23,09), posebno prema šampinjonu (23,09). Gljive domaćini (EC_{50} od 0,11 do 0,34 $\mu\text{g/ml}$) bile su znatno osetljivije od izolata *Trichoderma* spp. (EC_{50} od 1,83 do 2,54 $\mu\text{g/ml}$) prema etarskom ulju mirođije. Međutim, u *in vivo* eksperimentima – u oglednom gajilištu, primena etarskog ulja mirođije nije negativno uticala ni u pojedinačnoj primeni ni u istovremenoj sa fungicidom prochlorazom na kvantitet karpofora šampinjona, koji se u *in vitro* testovima pokazao kao najosetljiviji domaćin.

Gea et al. (2019b) su ispitali selektivnost pet etarskih ulja (planinski čubar, majčina dušica, beli timijan, španska žalfija i lavanda) za *C. mycophilum* i šampinjon, i svrstali ulja planinskog čubra (0,08) i majčine dušice (0,09) u antifungalna jedinjenja sa zadovoljavajućom selektivnošću. Autori su ustanovili da su preostala tri ulja pokazala dosta veću toksičnost prema domaćinu, a posebno lavanda sa indeksom selektivnosti od 5,35. **Potočnik et al.** (2010) navode da je etarsko ulje čajnog drveta manje toksično u poređenju sa fungicidom prochlorazom prema *C. dendroides* izolatima (EC_{50} od 112,92 do 335,75 $\mu\text{g/ml}$), kao i prema domaćinu šampinjonu (F56) sa EC_{50} od 98 $\mu\text{g/ml}$, dok **Kosanović et al.** (2013) beleže nisku toksičnost ulja čajnog drveta i prema izolatima *Trichoderma* spp. (EC_{50} od 11,90 do 370,76 $\mu\text{g/ml}$). Indeks selektivnosti ulja čajnog drveta za *C. dendroides* i šampinjon (F56) iznosio je 1,96 (**Potočnik**, 2009).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu višegodišnjih istraživanja sprovedenih u okviru ove disertacije dobijeni su rezultati iz kojih se može zaključiti sledeće:

- ☑ Izolacijom patogena iz uzoraka karpofora šiitake i zaraženog supstrata bukovače i proučavanjem molekularnih, morfoloških i ekoloških karakteristika, utvrđeno je da bolest zelene plesni jestivih gljiva u Srbiji i Severnoj Makedoniji izazivaju vrste iz roda *Trichoderma*: *T. pleuroti* (bukovača; Severna Makedonija), *T. pleuroticola* (bukovača; Severna Makedonija, Srbija) i *T. harzianum* kompleks vrsta (THSC) (bukovača, šiitake; Srbija). U okviru *T. harzianum* kompleksa sa jestivih gljiva u Srbiji, identifikovane su sledeće vrste: *T. afroharzianum* (bukovača), *T. cf. harzianum* (bukovača), *T. atrobrunneum* (šampinjon), *T. pholiotae* (šampinjon), *T. guizhouense* (šampinjon, šiitake) i *T. simmonsii* (šiitake). Vrste iz *T. harzianum* kompleksa (*T. cf. harzianum*), *T. pleuroti* i *T. pleuroticola* predstavljaju prve nalaze u Srbiji i Severnoj Makedoniji na bukovači. Vrsta *T. atrobrunneum* predstavlja prvi nalaz na šampinjonu u Srbiji, a vrsta *T. pholiotae* u Evropi.
- ☑ Virulentnost testirana inokulacijom karpofora domaćina, kod *Trichoderma* spp. izolata sa šiitake je bila visoka (5 na skali od 0 do 5), dok je kod izolata sa bukovače bila slaba (0 ili 1 na skali od 0 do 5). Proverom unakrsne virulentnosti izolata *T. harzianum* kompleksa poreklom iz gajilišta sve tri vrste gajenih gljiva i inokulacijom karpofora gljiva koje nisu domaćini, zabeležena je visoka virulentnost svih izolata za šampinjon i šiitake (od 3 do 5), dok je prema bukovači virulentnost bila slaba (od 0 do 2).
- ☑ Optimalna temperatura za rast svih izolata *Trichoderma* spp. bila je između 25 i 30°C. Optimalna temperatura za rast *T. pleuroti* i vrsta iz *T. harzianum* kompleksa iznosila je 30°C, dok je za vrstu *T. pleuroticola* bila 25°C.
- ☑ Praćenjem brzine porasta kolonije na PDA i pri temperaturi od 22°C, utvrđeno je da vrsta *T. pleuroti* ima najbrži porast od 0,83 mm/h, odnosno 19,27 mm/dan, a da vrsta *T. atrobrunneum* ima najsporiji porast od 0,50 mm/h, odnosno 12 mm/dan.
- ☑ Prosečne dimenzije konidija izolata *T. harzianum* kompleksa sa šiitake (2,1)-3,0-(3,6) × (1,9)-2,7-(4,1) μm, su bile malo manje od veličine spora izolata sa bukovače (2,4)-3,2-(4,4) × (2,1)-2,9-(4,5) μm. Dimenzije konidija agresivnih vrsta sa bukovače su bile slične, kod *T. pleuroti* izolata (1,8)-2,7-(5,4) × (1,7)-2,6-(5,1) μm i izolata *T. pleuroticola* (1,8)-3,0-(5,4) × (1,7)-2,9-(5,4) μm. U okviru *T. harzianum* kompleksa, prosečne dimenzije konidija su bile slične, a najveće kod *T. simmonsii* (2,6)-3,3-(3,6) × (1,9)-2,9-(4,1) μm, zatim *T. afroharzianum* (2,4)-3,0-(4,0) × (2,2)-2,9-(3,9) μm i najmanje kod *T. guizhouense* (2,3)-2,9-(3,6) × (2,0)-2,6-(3,7) μm.
- ☑ Primenom GC-FID i GC-MS tehnika utvrđeno je da su dominantne komponente u sastavu 11 etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja poreklom iz Srbije: majčina dušica – geraniol (32,43%), karvakrol (16,97%) i timol (11,59%); pitoma nana – mentol (36,80%) i menton (26,21%); divlja nana – 1,8-cineol (22,5%), linalol (19,23%) i mentil acetat (14,21%); bosiljak – linalol (35,38-48,9%) i metil kavikol (17,79-32,92%); tuja – α-pinen (41,75-73,75%) i β-3-karen (26,6-34,83%); kleka – α-pinen (32,06%), mircen (15,09%) i sabinen (14,20%); jela – p-menta-2,4(8)-dien (15,99%), triciklen (11,61%) i kamfen (10,58%); bor - α-pinen (37,48%) i β-pinen (16,35%); hajdučka trava - β-pinen (17,99%), 1,8-cineol (10,39%), β-kariofilen (9,33%) i kamfor (7,99%); kantarion – β-kariofilen (22,97%), 2-metil oktan (11,44%), (E)-

β -farnesen (10,96%) i α -pinene (10,74%) i mirođija – karvon (56,4%), limonen (22,83%) i α -felandren (10,74%).

- ☑ Primenom kontaktne mikrodilucione metode, fungicidno delovanje prema svim vrstama roda *Trichoderma* (*T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense*, *T. phliotae*, *T. simmonsii*, *T. pleuroti*, *T. pleurotica* i *T. cf. harzianum*), ispoljila su etarska ulja mirođije i majčine dušice. Etarska ulja divlje i pitome nane ispoljila se fungicidni efekat samo prema vrstama izolovanim iz gajilišta bukovače i šiitake (*T. afroharzianum*, *T. guizhouense*, *T. simmonsii*, *T. pleuroti*, *T. pleurotica* i *T. cf. harzianum*). Najbolje kontaktno inhibitorno delovanje ispoljilo je ulje mirođije, zatim slede ulja biljaka iz familije Lamiaceae (majčina dušica, divlja nana, pitoma nana i bosiljak). Delimično kontaktno inhibitorno delovanje ispoljila su etarska ulja hajdučke trave i četiri zimzelene biljke (jela, kleka, tuja i bor), dok je za etarsko ulje kantariona zabeleženo stimulatívno delovanje.
- ☑ Kontaktno delovanje etarskog ulja mirođije potvrđeno je i primenom makrodilucione kontaktne metode (MIC<4 $\mu\text{g/ml}$; MFC>4 $\mu\text{g/ml}$), dok je probit analizom utvrđen visok nivo osetljivosti *Trichoderma* spp. izolata prema ovom ulju (EC₅₀ = 0,96 - 3,44 $\mu\text{g/ml}$).
- ☑ Delovanje gasovite faze testiranih ulja na spore i miceliju odabranih vrsta određeno je primenom makrodilucione fumigantne metode. Najveću aktivnost su pokazala etarska ulja biljaka familije Lamiaceae sa potpunom inhibicijom klijanja spora i porasta micelije svih testiranih vrsta roda *Trichoderma* (*T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. guizhouense*, *T. pleuroti*, *T. pleurotica*, *T. phliotae*, *T. simmonsii* i *T. cf. harzianum*), kao i etarsko ulje mirođije sa potpunom ili delimičnom inhibicijom klijanja spora i porasta micelije. Najbolje fumigantno delovanje ispoljilo je etarsko ulje bosiljka, prema kom je vrsta *T. pleurotica* bila najosetljivija i u metodi sa sporama (MIC=0,04 $\mu\text{g/ml}$ vazdušne faze) i u metodi sa isečkom micelije (MIC=0,08 $\mu\text{g/ml}$ vazdušne faze).
- ☑ Ispitivanjem delovanja kombinacija etarskog ulja mirođije sa tri različita ulja (mirođija-majčina dušica, mirođija-pitoma nana i mirođija-divlja nana), kombinacija sa divljom nanom je pokazala najveću antifungalnu aktivnost, jer je prema svim testiranim vrstama ispoljila sinergističko delovanje (FiCi = 0,19 - 0,50), osim prema vrsti *T. phliotae*.
- ☑ Ispitivanjem osetljivosti izolata *Trichoderma* spp. prema fungicidima prohlorazu i metrafenonu primenom makrodilucione metode i probit analizom, utvrđeno je da su svi testirani izolati *Trichoderma* spp. bili visoko osetljivi prema oba fungicida sa EC₅₀ vrednostima od 0,03 do 2,91 $\mu\text{g/ml}$ za fungicid metrafenon i od 0,004 do 0,14 $\mu\text{g/ml}$ za fungicid prohloraz. Najveće vrednosti faktora rezistentnosti (RF) su bile 42 za fungicid metrafenon i 28 za fungicid prohloraz, pri čemu je većina vrsta bila svrstana u grupu osetljivih.
- ☑ Najbolju selektivnu toksičnost za bukovaču (0,01) i šiitake (0,02) pokazao je fungicid prohloraz, dok je metrafenon bio bolji za šampinjon (0,95). Iako je u *in vitro* testovima zabeležena nezadovoljavajuća selektivnost etarskog ulja mirođije zbog toksičnosti za gajene gljive, primena ovog ulja u oglednom gajilištu (*in vivo*) nije imala negativan uticaj na prinos šampinjona.
- ☑ Najveća efikasnost u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* u oglednom gajilištu šampinjona postignuta je primenom fungicida prohloraza i biofungicida na bazi azadiraktina u standardnim dozama primene (~75%). Etarsko ulja mirođije je ispoljilo zadovoljavajuću efikasnost u obe doze, u dozi primene 2% (~70%) i u dozi primene 1% (~60%).

- ☑ Testirana jedinjenja u gajilištu (etarsko ulje mirođije, biofungicid na bazi azadiraktina i fungicid prochloraz) delovala su pozitivno na prinos šampinjona, jer je u većini tretmana zabeležena biološka efektivnost (BE) veća od prinosa u netretiranoj kontroli.
- ☑ Ispitivanjem prirode međusobnog dejstva ulja mirođije i fungicida prochloraza, utvrđeno je njihovo aditivno dejstvo u suzbijanju *T. aggressivum* f. *europaeum* i sinergističko u uticaju na prinos šampinjona.
- ☑ Na osnovu rezultata dobijenih u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima kao i prirode zajedničkog dejstva sa fungicidom, etarsko ulje mirođije se može preporučiti za formulisanje preparata koji bi se koristio kao deo uspešne i ekološki opravdane strategije suzbijanja prouzrokače zelene plesni jestivih gljiva.
- ☑ Rezultati delovanja pojedinačnih ili kombinovanih etarskih ulja majčine dušice, pitome nane, divlje nane i bosiljka *in vitro*, takođe mogu poslužiti za dalja *in vivo* proučavanja, kako bi se mogla koristiti kao dodaci komercijalnim preparatima ili glavne komponente novih formulisanih biopreparata.

8. LITERATURA

- Abbott, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-268.
- Abdel-Kader, M., El-Mougy, N., Lashin, S. (2011): Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root pathogens. *Journal of Plant Protection Research*, 51(3): 306-313.
- Abdolahi, A., Hassani, A., Ghosta, Y., Bernousi, I., Meshkatalsadat, M.H. (2010): Study on the potential use of essential oils for decay control and quality preservation of Tabarzeh table grape. *Journal of Plant Protection Research*, 50(1): 45-52.
- Aćimović, M., Stanković, J., Cvetković, M., Jaćimović, G., Dojčinović, N. (2014): Ispitivanje morfoloških karakteristika mirođije i kvaliteta etarskog ulja ploda. *Letopis naučnih radova*, I: 69-79.
- Adams, R.P. (2004): *Junipers of the world: the genus Juniperus*. Trafford Publication, Canada, Victoria BC.
- Adams, R.P. (2007): Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th edn. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Adie, B., Grogan, H., Archer, S., Mills, P. (2006): Temporal and spatial dispersal of *Cladobotryum* conidia in the controlled environment of a mushroom growing room. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11): 7212-7217.
- Aktumsek, A., Ozturk, C., Kasik, G. (1998): Fatty acid composition of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *Turkish Journal of Biology*, 22(1): 75-79.
- Alexopoulos, A., Kimbaris, A.C., Plessas, S., Mantzourani, I., Theodoridou, I., Stavropoulou, E., Polissiou, M.G., Bezirtzoglou, E. (2011): Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, 17: 399-402.
- Ali Khan, R.A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., Li, Y. (2020): Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 8: 817.
- Alinezhad, S., Kamalzadeh, A., Shams-Ghahfarokhi, M., Rezaee, M.B., Jaimand, K., Kawachi M., Zamani, Z., Tolouei, R., Razzaghi-Abyaneh, M. (2011): Search for novel antifungals from 49 indigenous medicinal plants: *Foeniculum vulgare* and *Platycladus orientalis* as strong inhibitors of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Annals of Microbiology*, 61: 673-681.
- Allaga, H., Zhumakayev, A., Büchner, R., Kocsubé, S., Szűcs, A., Vágvölgyi, C., Kredics, L., Hatvani, L. (2021): Members of the *Trichoderma harzianum* species complex with mushroom pathogenic potential. *Agronomy*, 11(12): 2434.
- Angelini, P., Pagiotti, R., Granetti, B. (2008): Effect of antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* oil on antagonistic potential of *Pleurotus* species against *Trichoderma harzianum* in dual culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 197-202.
- Anonymous (2020): *Grower Resources, Integrated Pest Management, Pesticides, Fungicides*. American Mushroom Institute.
- Arici, S.E., Sanli, A. (2014): Effect of some essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Streptomyces scabies* on potato plants in field conditions. *Annual Research and Review in Biology*, 4: 2027-2036.
- Asbahani, A.E., Jilale, A., Voisin, S.N., Addi, E.H.A., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D.J., Renaud, F.N.R. (2015): Chemical composition and antimicrobial activity of nine essential oils obtained by steam distillation of plants from the Souss-Massa Region (Morocco). *Journal of Essential Oil Research*, 27(1): 34-44.
- Atanasova, L., Druzhinina, I., Jaklitsch, W. (2013): Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. In: Mukherjee, P.K., Singh, U.S., Horwitz, B.A.,

- Schmoll, M., Mukherjee, M. (eds.). *Trichoderma: biology and applications*. CABI, Nosworthy Way, Wallingford, Oxon, UK, pp.10-42.
- Babili, F., El Bouajila, J., Souchard, J.P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C., Valentin, A. (2011): *Oregano*: Chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of Food Science*, 76: 512–518.
- Babri, R.A., Khokhar, I., Mahmood, Z., Mahmud, S. (2012): Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Anethum graveolens* L. *Science International (Lahore)*, 24(4): 453-455.
- Back, C.G., Lee, C.Y., Seo, G.S., Jung, H.Y. (2012): Characterization of species of *Cladobotryum* which cause cobweb disease in edible mushrooms grown in Korea. *Mycobiology*, 40:189-194.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-475.
- Ballettini, M.B., Fiorda, F.A., Maieves, H.A., Teixeira, G.L., Avila, S., Hornung, P.S., Junior, A.M., Ribani, H.R. (2016): Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26: 633-646.
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R.C., Dicko, M.H. (2010): Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15: 7825–7839.
- Beatović, D., Krstić-Milošević, D., Trifunović, S., Šiljegović, J., Glamočlija, J., Ristić, M., Jelačić, S. (2015): Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia: *Records of Natural Products*, 9(1): 62-75.
- Beetz, A., Kustidia, M. (2004): Mushroom cultivation and marketing. Horticulture production guide (www.attra.ncat.org).
- Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Miladi, R., Abdelkafi, S. (2014): *Myrtus communis* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. *Chemistry and Biodiversity*, 11: 571–580.
- Benelli, G., Flamini, G., Canale, A., Luigi Cioni, P., Conti, B. (2012): Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Protection*, 42: 223-229.
- Benlembarek, K., Lograda, T., Ramdani, M., Figueredo, G., Chalard, P. (2022): Chemical composition and biological activities of *Anethum graveolens* L. essential oil from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(4): 728-740.
- Bissett, J. (1984): A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924-931.
- Bissett, J. (1991a): A revision of the genus *Trichoderma*. II. Intrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 60: 2357-2372.
- Bissett, J. (1991b): A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2373-2417.
- Bissett, J. (1991c): A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2418-2420.
- Bissett, J. (1992). *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany*, 70: 639-641.
- Błaszczak, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Fruzynska-Jozwiak, D. (2013): Diversity of *Trichoderma* spp. causing *Pleurotus* green mould diseases in central Europe. *Folia Microbiologica*, 58: 325–333.
- Bonnen, A.M., Hopkins, C. (1997): Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 101(1): 89-96.
- Booth, C. (1971): Fungal culture media. In *methods in microbiology*, Norris J.R. and Ribbons D.W. (eds). Academic Press: London and New York, pp, 49-94.

- Bouchra, C., Achouri, M., Hassani Idrissi, L.M., Hamamouchi, M. (2003): Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. Journal of Ethnopharmacology, 89: 165-169.
- Bowes, B.G. (2010): Trees and forests: A colour guide: Biology, pathology, propagation, silviculture, surgery, biomes, ecology, conservation, vol. 25.
- Bugarški, D., Gvozdrenović, Đ., Takač, A. (1995): Uticaj soja i podloge na razvoj micelije gljive bukovače. Selekcija i semenarstvo, 153-248.
- Cabral, C., Francisco, V., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Sales, F., Batista, M.T., Salgueiro, L. (2012): Essential oil of *Juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak Needles: Chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity. Phytotherapy Research, 26: 1352-1357.
- Caglarirmak, N. (2007): The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. Food Chemistry, 105: 1188-1194.
- Calín-Sánchez, Á., Lech, K., Szumny, A., Figiel, A., Carbonell-Barrachina, Á.A. (2012): Volatile composition of sweet basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by drying method. Food Research International, 48: 217-225.
- Campos, E.V., De Oliveira, J.L., Pascoli, M., De Lima, R., Fraceto, L.F. (2016): Neem oil and crop protection: from now to the future. Frontiers in Plant Science, 7: 1494.
- Cao, Z.J., Qin, W.T., Zhao, J., Liu, Y., Wang, S.X., Zheng, S.Y. (2022): Three new *Trichoderma* species in Harzianum clade associated with the contaminated substrates of edible fungi. Journal of Fungi, 8(11): 1154.
- Carbone, I., Kohn, L.M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91: 553-556.
- Carrasco, J., Navarro, M.J., Santos, M., Gea, F.J. (2017): Effect of five fungicides with different modes of action on mushroom cobweb disease (*Cladobotryum mycophilum*) and mushroom yield. Annals of Applied Biology, 171(1): 62-69.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2006): *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Review, 19: 50-62.
- Chahal, K.K., Monika, K.D., Dalvir, K., Singh, R. (2016): Antifungal potential of dill seeds essential oil and its constituents. Indian Journal of Ecology, 43(2): 903-906.
- Chahal, K.K., Monika, Kumar, A., Bhardwaj, U., Kaur, R. (2017): Chemistry and biological activities of *Anethum graveolens* L. (dill) essential oil: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(2): 295-306.
- Challen, M.P., Elliott, T.J. (1985): The *in vitro* responses to a range of fungicides of two strains of the mushroom *Agaricus bisporus* and the pathogen *Verticillium fungicola*. Mycopathologia, 90: 161-164.
- Chang, S.T. (1999): World production of cultivated and medicinal mushroom in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. in China. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 291-300.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (1984): A new look at cultivated mushrooms. BioScience, 34. 358–362.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (1989): Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press Inc, Boca Raton, 345.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G.J. (2015): Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia, 107: 558–590.
- Chaverri, P., Candoussau, F., Samuels, G.J. (2004): *Hypocrea phyllostachydis* and its *Trichoderma* anamorph, a new bambusicolous species from France. Mycological Progress, 3: 29-36.
- Chaverri, P., Samuels, G.J. (2013): Evolution of habitat preference and nutrition mode in a cosmopolitan fungal genus with evidence of interkingdom host jumps and major shifts in ecology. Evolution, 67: 2823–2837.

- Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B., Wang, Y. (2013): Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 1175–1183.
- Cho, S.B. (2004): What is mushroom (Chapter 1. Introduction to Mushroom, Part I. Mushrooms). In *Oyster mushroom cultivation. Mushroom Growers' Handbook 1*, pp. 1-3.
- Chrysayi-Tokousbalides, M., Kastanias, M.A., Philippoussis, A., Diamantopoulou, P. (2007): Selective fungitoxicity of famaxadone, tebuconazole and trifloxystrobin between *Verticillium fungicola* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection*, 26: 469-475.
- CLSI (2008): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Collins, R.P., Halim, A.F. (1972): Characterisation of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride* (Pers.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20: 437-438.
- Collopy, P.D., Largeteau-Mamoun, M.L., Romaine, C.P., Royse, D.J. (2001): Molecular phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Phytopathology*, 91: 905-912.
- Cook, C.M., Kokkini, S., Lanaras, T. (2007): *Mentha spicata* essential oils rich in 1,8- cineole and 1,2-epoxy-P-menthane derivatives from Zakynthos (Ionian Island, W Greece). *Journal of Essential Oil Research*, 19: 225–230.
- Dajić-Stevanović, Z., Nastovski, T., Ristić, M., Radanović, D. (2009): Variability of essential oil composition of cultivated feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip.) populations. *Journal of Essential Oil Research*, 21(4): 292-294.
- Damjanović, B., Skala, D., Baras, J., Petrović-Djakov, D. (2006): Isolation of essential oil and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. fruits from Montenegro. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 875-880.
- De Barros, J.C., Da Conceição, M.L, Gomes Neto, N.J., Da Costa, A.C.V., Siqueira Junior, J.P., Basílio Junior, I.D., De Souza, E.L. (2009): Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1139–1143.
- De Sousa Barros, A., De Moraes, S.M., Ferreira, P.A. T., Vieira, Í.G.P., Craveiro, A.A., Dos Santos Fontenelle, R.O., De Menezes, J.E.S.A., Da Silva, F.W.F., De Sousa, H.A. (2015): Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76: 557-564.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002): Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101–109.
- Delp, C.J., Dekker, J. (1985): Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPPO Bulletin. European and Mediterranean Plant Protection Organization, OEPP*, 15: 333-335.
- Dennis, C., Webster, J. (1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41-48.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B. (1995): *Basic plant pathology methods*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FO, USA, pp. 359.
- Dinesh, C., Ramesh, B., Manasa, P., Ponnusamy, V. (2013): Comparative study of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation by physical and chemical method of sterilization using two different substrates, *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 4(9): 898-902.
- Doyle, O. (1991): *Trichoderma* green mould update. *Irish Mushroom Review*, 3: 13-17.
- Dražić, S., Ristić, M. (2000): Varijabilnost hemijskih svojstava pitome nane (*Mentha x piperita* L.). „Selekcija i sementarstvo“ (Plant Breeding and Seed Production), VII(1-2): 29-32.
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., Kubicek, C. (2005): An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 813–828.

- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., Kubicek, C. (2006): The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47: 55-64.
- Druzhinina, I., Kubicek, C., Komoń-Żelazowska, M., Mulaw, T.B., Bissett, J. (2010): The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 94.
- Druzhinina, I., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P. (2011): *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 740-750.
- Duke, J.A., Ayensu, E.S. (1985): *Medicinal Plants of China* Reference Publications, Inc. Michigan.
- Dunkić, V., Bezić, N., Vuko, E. (2011): Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. *Natural Product Communications*, 6: 1385–1388.
- Duquesnoy, E., Castola, V., Casanova, J. (2007): Composition and chemical variability of the twig oil of *Abies alba* Miller from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 22: 293-299.
- Dut Jasuja, N., Sharma, S., Choudhary, J., Joshi, S.C. (2015): Essential oil and important activities of *Thuja orientalis* and *Thuja occidentalis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(4): 931-949.
- Dorđević, A.S. (2015): Chemical composition of *Hypericum perforatum* L. essential oil. *Advanced Technologies*, 4(1): 64-68.
- Đurović-Pejčev, R., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Todorović, B., Rekanović, E., Stepanović, M. (2014): Antifungal activity of six plant essential oils from Serbia against *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*. *Pesticides and Phytomedicine*, 29(4): 291-297.
- Eger, G. (1978): Biology and breeding of *Pleurotus*. In *The biology and cultivation of edible mushrooms* (S. T. Chang and W. A. Hayes, Eds.), Academic Press, New York, pp. 497-517.
- Eicker, A., Van Greuning, M. (1991): Troublesome fungi in the cultivation of *Agaricus bisporus* – an updated list of species. In: Van Griensven L.J.L.D. (Ed.), *Genetics and Breeding of Agaricus*, Pudoc, Wageningen, Netherland, pp. 88-96.
- Ellenberg, H.H. (2009): *Vegetation Ecology of Central Europe*. Cambridge University Press, fourth edn.
- El-Mougy, N., El-Gamal, N., Abdel-Kader, M. (2009): Pre-storage application of some essential oils and food preservatives against black mould incidence of garlic cloves during storage. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(11): 1059–1068.
- Evergetis, E., Michaelakis, A., Haroutounian, S.A. (2013): Exploitation of Apiaceae family essential oils as potent biopesticides and rich source of phellandrenes. *Industrial Crops and Products*, 41: 365- 370.
- FAO (2020): FAOSTAT. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. (www.fao.org)
- Fierascu, I., Ungureanu, C., Avramescu, S.M., Fierascu, R.C., Ortan, A., Soare, L.C., Paunescu, A. (2015): *In vitro* antioxidant and antifungal properties of *Achillea millefolium* L. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(4): 10626-10636.
- Figueredo, G., Ünver, A., Chalchat, J. C., Arslan, D., Özcan, M.M. (2012): A research on the composition of essential oil isolated from some aromatic plants by microwave and hydrodistillation. *Journal of Food Biochemistry*, 36: 334-343.
- Finney, D.J. (1971): *Probit Analysis – A statistical treatment of the sigmoid response curve*. University Press, 3rd edition, Cambridge, UK, pp. 1-383.
- Gams, W., Bissett, J. (1998): Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., and Harman, G.E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London, UK, pp. 3-34.
- Gams, W., Van Zaayen, A. (1982): Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I. Taxonomy. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 88: 57-78.
- Gea, F.J. (2009): First report of *Trichoderma pleurotum* on oyster mushroom crops in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 91(2): 504.

- Gea, F.J., Navarro, M.J., Carrasco, J., González, A.J., Suz, L.M. (2012): First report of cobweb on white button mushroom (*Agaricus bisporus*) in Spain caused by *Cladobotryum mycophilum*. *Plant Disease*, 96: 1067.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., Santos, M., Diáñez, F., Carrasco, J. (2021): Control of Fungal Diseases in Mushroom Crops while Dealing with Fungicide Resistance: A Review. *Microorganisms*, 9: 585.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., Santos, M., Diáñez, F., Herraiz-Peñalver, D. (2019b): Screening and evaluation of essential oils from mediterranean aromatic plants against the mushroom cobweb disease, *Cladobotryum mycophilum*. *Agronomy*, 9(10): 656.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., Suz, L.M. (2011): First report of *Cladobotryum mycophilum* causing cobweb on cultivated king oyster mushroom in Spain. *Plant Disease*, 95: 1030.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., Suz, L.M. (2018): First report of cobweb disease caused by *Cladobotryum dendroides* on shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) in Spain. *Plant Disease*, 102: 1030.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., Suz, L.M. (2019a): Cobweb disease on oyster culinary-medicinal mushroom (*Pleurotus ostreatus*) caused by the mycoparasite *Cladobotryum mycophilum*. *Journal of Plant Pathology*, 101: 349-354.
- Gea, F.J., Navarro, M.J., Tello, J.C. (2005): Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycological Research*, 109: 741-745.
- Gea, F.J., Tello J., Navarro M. (2010): Efficacy and effect on yield of different fungicides for control of wet bubble disease of mushroom caused by the mycoparasite *Mycogone perniciosus*. *Crop Protection*, 29: 1021-1025.
- Gea, F.J., Tello J.C., Honrubia M. (1996): *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia*, 136: 133-137.
- Geels, F.P. (1996): Resistance to Sporgon tested among recently isolated strains of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *De Champignoncultuur*, 40(10): 401-406.
- Geels, F.P. (1997): Rondetafel – bijeenkomst over *Trichoderma*. *Champignoncultuur*, 41: 13.
- Glamočlija, J., Soković, M., Vukojević, J., Milenković, I., Van Griensven, L.J.L.D. (2006): Chemical composition and antifungal activities of essential oils of *Satureja thymbra* L. and *Salvia pomifera* ssp. *calcyna* (Sm.) Hayek. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 115-117.
- Glišić, S.B., Milojević, S.Ž., Dimitrijević, S.I., Orlović, A.M., Skala, D.U. (2007): Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(4): 311-320.
- Glišić, S.B., Popadić, S.V., Skala, D.U. (2006): Kantarion (*Hypericum perforatum* L.) – Natkrična ekstrakcija, antimikrobna i antidepresivna aktivnost ekstrakta i pojedinih komponenti. *Hemijska Industrija*, 60(3-4): 61-71.
- Gorunović, M., Lukić, P. (2001): Farmakognozija. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Gouot, J.M. (1994): Characteristics and population dynamics of *Botrytis cinerea* and other pathogens resistant to dicarboximides. In: Delp, C.J. (Ed.), *Fungicide resistance in North America*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MO, USA, pp. 53-55.
- Grlić, Lj. (1990): Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb.
- Grogan, H.M. (2006): Fungicide control of mushroom cobweb disease caused by *Cladobotryum* strains with different benzimidazole resistance profiles. *Pest Management Science*, 62(2): 153-161.
- Grogan, H.M. (2008): Challenges facing mushroom disease control in the 21st century; In *Proceeding of the Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*; Lelley, J.I., Buswell, J.A., Eds.; WSMBMP: Bonn, Germany, pp. 120-127.
- Grogan, H.M., Gaze, R.H. (2000): Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104: 357-364.

- Grogan, H.M., Keeling, C., Jukes, A.A. (2000): *In vitro* response of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* (dry bubble) to prochloraz-manganese. Proceedings from the Crop Protection Conference, In: Pests and Diseases, Brighton, UK, pp. 273-278.
- Grujić, M., Dojnov, B., Potočnik, I., Atanasova, L., Duduk, B., Srebotnik, E., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Vujčić, Z. (2019): Superior cellulolytic activity of *Trichoderma guizhouense* on raw wheat straw. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(12): 194.
- Guleriaa, S., Kumarb, A., Tikua, A.K. (2007): Chemical composition and fungitoxic activity of essential oil of *Thuja orientalis* L. grown in the North- Western Himalaya. *Zeitschrift für Naturforschung*, 63: 211-214.
- Gursky, Z. (1999): Zlatna knjiga lekovitog bilja. Peto dopunjeno izdanje. Nakladni zavod Matice Hrvatske, Zagreb.
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hamzehzarghani, H. (2009): Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences*, 6(5): 744-748.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (2004): Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 12: 1-5.
- Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Nagy, A., Nagy, E., Vagvolgyi, C., Kredics L. (2007): Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*, 97: 532-537.
- Hatvani, L., Kocsubé, S., Manczinger, L., Antal, Z., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C.P., Nagy, A., Vágvolgyi, C., Kredics, L. (2008): The green mould disease global threat to the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*): a review. In *Science and cultivation of edible and medicinal fungi: Mushroom Science XVII, Proceeding of the 17th Congress of the International Society for Mushroom Science* (pp. 485-495). Cape Town, South Africa.
- Hatvani, L., Sabolić, P., Kocsubé, S., Kredics, L., Vágvolgyi, C., Kaliterna, J., Ivić, D., Đermić, E., Kosalec, I. (2012): The first report on mushroom green mold in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63: 481-487.
- Haziri, A.I., Aliaga, N., Ismaili, M., Govori-Odai, S., Leci, O., Faiku, F., Arapi, V., Haziri, I. (2010): Secondary metabolites in essential oil of *Achillea millefolium* (L.) growing wild in east part of Kosovo. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(1): 32-34.
- Heinrich, M., Frei Haller, B., Leonti, M. (2014): A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: The eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *Journal of Natural Products*, 77: 678-689.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Mingues, J.M., Castro, C., Monte, E., Garcia-Acha, I. (2000): Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1890-1898.
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Monte, E. (1999): Isolation of *Trichoderma harzianum* Th 2 from commercial mushroom compost in Spain. *Plant Disease*, 83: 591.
- Höferl, M., Stoilova, I., Schmidt, E., Wanner, J., Jirovetz, L., Trifonova, D., Krastev, L., Krastanov, A. (2014): Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. *Antioxidants*, 3(1): 81-98.
- Hossain, F., Follet, P., Dang Vu, K., Harich, M., Salmieri, S., Lacroix, M. (2016): Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food Microbiology*, 53(Part B): 24-30.
- Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S. (2000): Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 248-253.

- Hussain, A.I., Anwar, F., Chatha, S.A.S., Latif, S., Sherazi, S.T.H., Ahmad, A., Worthington, J., Sarker, S.D. (2013): Chemical composition and bioactivity studies of the essential oils from two *Thymus* species from the Pakistani flora. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 185-192.
- Hyun, H.B., Boo, K.H., Kang, H.R., Cho, S.K. (2015): Analysis of mint essential oils from Jeju Island, Korea by gas chromatography-mass spectrometry and headspace-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 58(2), 175-181.
- Index Fungorum (2023): www.indexfungorum.org
- Innocenti, G., Montanari, M. (2014): *Trichoderma* green mould disease: a case study in a *Pleurotus ostreatus* farm. Preliminary data. *Micologia Italiana*, 1-2-3: 49–57.
- Innocenti, G., Montanari, M., Righini, H., Roberti, R. (2019): *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz. *Plant Pathology*, 68: 392–398.
- ISO (2014): Essential oils - General rules for packaging, conditioning and storage. International Organization for Standardization, ISO/TS 210:2014.
- Jadhav, S., Shah, R., Bhawe, M., Palombo, E.A. (2013): Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, 29: 125-130.
- Jaklitsch, W.M. (2011): European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Divers*, 48(1):1–250.
- Jaklitsch, W.M., Komon, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2005): *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*. *Mycologia*, 97: 1365–1378.
- Jaklitsch, W.M., Lechat, C., Voglmayr, H. (2014): The rise and fall of Sarawakus (Hypocreaceae, Ascomycota). *Mycologia*: 106(1): 133-144.
- Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.S., Druzhinina, I.S. (2006): *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56: 135–177.
- Jaklitsch, W.M., Voglmayr, H. (2015): Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1-87.
- Jasqueline, C., Navas, D., Batard, E., Miegerville, F., Le Mabecque, D., Kergueris, F., Bugnon, D., Potel, G., Caillon, J. (2005): *In vitro* and *in vivo* synergistic activities of linezolid combined with subinhibitory concentrations of imipenem against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 45-51.
- Jelačić, S.Ć., Beatović, D.V., Prodanović, S.A., Tasić, S.R., Moravčević, Đ.Ž., Vujošević, A.M., Vučković, S.M. (2011): Hemijski sastav etarskog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum* L. Lamiaceae). *Hemijska Industrija*, 65(4): 465-471.
- Jiang, H.F., Wang, F.L., Tan, Q. (1995): A preliminary study on *Trichoderma* spp. and dominant *T. species* in *Lentinula edodes* growing. *Acta Agriculturae Shanghai*, 11: 85-90.
- Jianu, C., Misca, C., Pop, G., Rusu, L.C., Ardelean, L. (2012): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from dill (*Anethum graveolens* L.) grown in Western Romania. *Revista de Chimie (Bucharest)*, 63(6): 641-645.
- Kaiser, C., Van der Merwe, R., Bekker, T.F., Labuschagne, N. (2005): *In-vitro* inhibition of mycelial growth of several phytopathogenic fungi, including *Phytophthora cinnamomi* by soluble silicon. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 28: 70-74.
- Kalembe, D., Kunicka, A. (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- Karatzas, A.K., Bennit, J., Smid, E.J., Kets, E.P. (2000): Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Bacteriology*, 89: 296-301.
- Karatzas, A.K., Kets, E.P., Smid, E.J., Bennik, M.H. (2001): The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 463–469.

- Karimi, K., Arzanlou, M., Pertot, L. (2016): Antifungal activity of the dill (*Anethum graveolens* L.) seeds essential oil against strawberry anthracnose under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 49: 554-566.
- Kaur, V., Kaur, R., Bhardwaj, U. (2020): A review on dill essential oil and its chief compounds as natural biocide. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(3): 1-20.
- Kazemi, M., Rostami, H., Shafiei, S. (2012): Antibacterial and antifungal activity of some medicinal plants from Iran. *Journal of Plant Sciences*, 7(2): 55-66.
- Kelidari, H.R., Alipanah, H., Roozitalab, G., Ebrahimi, M., Osanloo, M. (2022): Anticancer effect of solid-lipid nanoparticles containing *Mentha longifolia* and *Mentha pulegium* essential oils: *In vitro* study on human melanoma and breast cancer cell lines. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(2): 2128-2137.
- Kim, C.S., Park, M.S., Kim, S.C., Maekawa, N., Yu, S.H. (2012): Identification of *Trichoderma*, a competitor of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* species in Korea. *Plant Pathology Journal*, 28: 137-148.
- Kimura, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G.J., Kubicek, C.P. (1998): Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the r DNA cluster. *Fungal Genetics and Biology*, 24: 298-309.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalper, J.A. (2001): Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. CABI Bioscience, Wallingford.
- Kišgeci, J., Jelačić, S., Beatović, D. (2009): Lekovito, aromatično i začinsko bilje. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet. Beograd.
- Knop, D., Yarden, O., Hadar, Y. (2015): The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 1025–1038.
- Komatsu, M. (1976): Studies on *Hypocrea*, *Trichoderma* and allied fungi antagonistic to shiitake, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Report of the Tottori Mycological Institute, 13: 1-113.
- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2007): Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7415-7426.
- Kopchinskiy, A., Komon, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2005): *TrichoBLAST*: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea* powered by sequence diagnosis and similarity search tool. *Mycological Research*, 109: 658-660.
- Kosanović, D., Potočnik, I., Duduk, B., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E. (2013): *Trichoderma* species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol. *Annals of Applied Biology*, 163: 218-230.
- Koso, Š. (1991): Gajenje gljive bukovače. Nolit, Beograd.
- Kostić, I., Marković, T., Krnjajić, S. (2012): Sekretorne strukture aromatičnih biljaka sa posebnim osvrtom na strukture sa etarskim uljima, mesta sinteze ulja i njihove važnije funkcije. *Lekovite sirovine*, 32: 3-25
- Koukos, P.K., Papadopoulou, K.I., Papagiannopoulos, A.D., Patiaka, D.Th. (2001): Essential oils of the twigs of some conifers grown in Greece. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 58: 437-438.
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G. (2008): Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1): 63–84.
- Kovačević, N. (2004): Osnovi farmakognozije. Treće izdanje. Institut za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srpska školska knjiga, Beograd.
- Kredics, L., García Jimenez, L., Naeimi, S., Czifra, D., Urbán, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Hatvani, L. (2010): A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied*

- Microbiology and Microbial Biotechnology, pp. 295-305. Ed A. Méndez-Vilas. Badajoz, Spain: Formatex.
- Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Szekers, A., Nagy, A., Vagvolgyi, C., Nagy, E. (2006): Green mold disease of oyster mushroom in Hungary and Transylvania. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 53: 306-307.
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., Druzhinina, I. (2014): Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats (Chapter 1). In: *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M.G. (eds.), pp. 3-24, Elsevier BV. USA.
- Kredics, L., Kocsubé, S., Nagy, L., Komoń-Zelazowska, M., Manczinger, L., Sajben, E., Nagy, A., Vágvölgyi, C., Kubicek, C., Druzhinina, I., Hatvani, L. (2009): Molecular identification of *Trichoderma* species associated with *Pleurotus ostreatus* and natural substrates of the oyster mushroom. *FEMS Microbiology Letters*, 300: 58–67.
- Kubicek, C.P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. (2003): Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 310-319.
- Kuete, V. (2010): Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Medica*, 76: 1479-1491.
- Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., Kubicek, C.P. (2002): Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multiple approach. *Mycological Research*, 106(7): 757-767.
- Kursa, W., Jamiolkowska, A., Skwaryło-Bednarz, B., Kowalski, R., Wyrstek, J., Patkowska, E., Kopacki, M. (2022): *In vitro* efficacy of herbal plant extracts on some phytopathogenic fungi. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 21(6): 79–90.
- Lee, H.M., Bak, W.C., Lee, B.H., Park, H., Ka, K.H. (2008): Breeding and Screening of *Lentinula edodes* species resistance to *Trichoderma* spp. *Mycobiology*, 4: 270-272.
- Leroux, P., Gredt, M. (1972): Etude de l'action in vitro des fongicides, methode de l'incorporation ou milieu. Laboratoire de Phytopharmacie – INRA, French Institute for agronomy research, Versailles, France, pp. 1-10.
- Liber, Z., Carović-Stanko, K., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satović, Z. (2011): Chemical characterization and genetic relationships among *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Chemistry and Biodiversity*, 8: 1978-1989.
- Lie, H., Wang, Y., Su, C., Liang, F., Su, W., Hui, M., Shaw, P., Luo, Y. (2010): Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Thuja sutchuenensis*, a critically endangered species endemic to China. *Natural Product Communications*, 5(10): 1673-1676.
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., Muthumeenakshi, S. (1998): Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In *Trichoderma and Gliocladium*. Edited by Kubicek, C.P. and Harman, G.E. London; Bristol, PA: Taylor & Francis, pp. 35-74.
- Liu, T., Chu, L., Zhou, T. (2002): Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricot and plums. *Horticultural Science*, 37: 151-156.
- Liu, X.C., Li, Y.P., Li, H.Q., Deng, Z.W., Zhou, L., Liu, Z.L., Du, S.S. (2013): Identification of repellent and insecticidal constituents of the essential oil of *Artemisia rupestris* L. aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel. *Molecules*, 18: 10733–10746.
- Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundisa, R., Stattia, G.A., Menichinia, F., Lamprontic, I., Gambarid, R., Cinatle, J., Wilhelm Doerre, H. (2008): Phytochemical analysis and *in vitro* antiviral activities of the essential oils of seven lebanon species. *Chemistry and Biodiversity*, 5: 461-470.
- Luković, J., Đurović-Pejčev, R., Đorđević, T., Milijašević-Marčić, S., Duduk, N., Vico, I., Potočnik, I. (2020): Antifungal and synergistic activity of five plant essential oils from Serbia against *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Samuels & W. Gams. *Pesticides and Phytomedicine*, 35(3): 173-181.
- Luković, J., Milijašević-Marčić, S., Hatvani, L., Kredics, L., Szűcs, A., Vágvölgyi, C., Duduk, N., Vico, I., Potočnik, I. (2021): Sensitivity of *Trichoderma* strains from edible mushrooms to the

- fungicides prochloraz and metrafenone. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 56(1): 54-63.
- Luković, J., Potočnik, I., Rekanović, E., Milijašević-Marčić, S., Todorović, B., Kostić, M., Radulović, Z. (2019b): Toxicity of plant essential oils to *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, the causal agent of chestnut blight. *Pesticides and Phytomedicine*, 34(2): 89-96.
- Luković, J., Stepanović, M., Todorović, B., Milijašević-Marčić, S., Duduk, N., Vico, I., Potočnik, I. (2018): Antifungal activity of cinnamon and clove essential oils on button mushroom pathogens: *Cladobotryum dendroides* and *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola*. *Pesticides and Phytomedicine*, 33(1): 19-26.
- Luković, J., Todorović, B., Milijašević-Marčić, S., Rekanović, E., Kostić, M., Đurović-Pejčev, R., Potočnik, I. (2019a): Antifungal activity of plant essential oils against *Verticillium dahliae* Klebahn, the causal agent of Verticillium wilt of pepper. *Pesticides and Phytomedicine*, 34(1): 39-46.
- Lumbsden, R.D., Lewis, J.A., Fravel, D.R. (1993): Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In Hall, F.R. and Barry, J.W. (eds). *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. American Chemical Society, Washington, pp. 166-188.
- Ma, B., Ban, X., Huang, B., He, J., Tian, J., Zeng, H., Chen, Y., Wang, Y. (2015): Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing Sclerotinia rot of rapeseed. *PLoS One*, 10(7): 1-15.
- Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M.M., Tirillini, B., Sagratini, G., Papa, F., Vittori, S. (2010): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in Central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chemistry and Biodiversity*, 7: 447-466.
- Mahboubi, M. (2021): *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(2): 75-81.
- Maksimović, P. (1995): Proizvodnja i korišćenje šampinjona. Nolit, Beograd.
- Maksimović, P. (2002): Gajenje gljive šitake. Nolit, Beograd.
- Mamoun, M.L., Savoie, J.M., Oliver, J.M. (2000): Interactions between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia*, 92: 233-240.
- Marik, T., Urbán, P., Tyagi, C., Szekeres, A., Leitgeb, B., Vágvölgyi, M., Manczinger, L., Druzhinina, I.S., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2017): Diversity profile and dynamics of peptaibols produced by green mould *Trichoderma* species in interactions with their hosts *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Chemistry and Biodiversity*, 14(6): 1-21.
- Marin, P. (2003): Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. NNK international, Beograd.
- Marković, T. (2011): Etarska ulja i njihova bezbedna primena. Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd.
- Martin, A.M., Queiroz, E.F., Marston, A., Hostettmann, K. (2006): Labdane diterpenes from *Juniperus communis* L. berries. *Phytochemical Analysis*, 17(1): 32-35.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Riuz-Duenas, F.J., Ferrerira, P., Camerero, S., Guillen, F., Martinez, M., Gutierrez, A., Del Rio, H.C. (2005): Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204.
- Matović, M., Bojović, B., Jušković, M. (2011): Composition of essential oils from three classes of juniper fruit from Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(26): 6160-6163.
- Mattila, P., Kanko, K., Earola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahterist, L. (2001): Contents of vitamins, mineral elements, some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 2343-2348.
- Mihajlović, M., Rekanović, E., Hrustić, J., Tanović, B., Potočnik, I., Stepanović, M., Milijašević-Marčić, S. (2013): *In vitro* and *in vivo* toxicity of several fungicides and Timorex gold biofungicide to *Pythium aphanidermatum*. *Pesticides and Phytomedicine*, 28(2): 117-123.

- Milijašević-Marčić, S., Stepanović, M., Todorović, B., Duduk, B., Stepanović, J., Rekanović, E., Potočnik, I. (2016): Biological control of green mould on *Agaricus bisporus* by a native *Bacillus subtilis* strain from mushroom compost. *European Journal of Plant Pathology*, 148(3): 509-519.
- Milojević, S.Ž., Glišić, S B., Skala, D.U. (2010): The batch fractionation of *Juniperus communis* L. essential oil: Experimental study, mathematical simulation and process economy. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 16(2): 183-191.
- Mimica-Dukić, N., Božin, B. (2007): Essential oils from Lamiaceae species as promising antioxidant and antimicrobial agents. *Natural Product Communications*, 2(4): 445-452.
- Mishra, M., Malik, S., Tiwari, S.N. (1992): Allelopathic effect of certain botanicals against six fungal pathogens of rice. *Proceedings of first National Symposium on Allelopathy in Agroecosystems (Agriculture and Forestry)*, 191-193.
- Mišan, A., Arsić, I., Đorđević, S., Tadić, S., Psodorov, Đ. (2013): Funkcionalna hrana i lekovito bilje, monografija, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad.
- Mogosan, C., Vostinaru, O., Oprean, R., Heghes, C., Filip, L., Balica, G., Moldovan, R.I. (2017): A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of *Mentha* cultivated in Romania. *Molecules*, 22(2): 263.
- Monte, E. (2001): Understanding *Trichoderma*: Between Biotechnology and Microbial Ecology. *International Journal of Microbiology*, 4: 1-4.
- Muthumeenakshi, S., Brown, A.E., Mills, P.R. (1998): Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North America and British Isles. *Mycological Research*, 102(4): 385-390.
- Mycobankdatabase (2022): www.mycobank.org
- Nabigol, A., Morshedi, H. (2011): Evaluation of the antifungal activity of the Iranian thyme essential oils on the postharvest pathogens of strawberry fruits. *African Journal of Biotechnology*, 10(48): 9864-9869.
- Nagy, A., Manczinger, L., Tombácz, D., Hatvani, L., Györfi, J., Antal, Z., Sajben, E., Vágvölgyi, C., Kredics, L. (2012): Biological control of oyster mushroom green mould disease by antagonistic *Bacillus* species. *International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section Bulletin*, 78: 289-293.
- Nakatsu, T., Lupo, A., Chin, J., Kang, R. (2000): Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21: 571-631.
- Nanba, H. (1993): Maitake mushroom-the king mushroom. *Mushrooms News*, 41(2): 22-25.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., De Feo, V. (2017): Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4): 86.
- Nguefack, J., Leth, V., Dongmo, L., Torp, J., Zollo, A., Nyasse, S. (2008): Use of three essential oils as seed treatments against seed-borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 4(5): 554-560.
- Nikkhah, M., Hashermi, M., Habibi Najafi, M.B., Farhoosh, R. (2017): Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *Journal of Food Microbiology*, 257: 285-294.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Marković, T., Marković, D., Perić, T., Soković, M. (2013): Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskog ulja pitome nane (*Mentha piperita* L.). *Lekovite sirovine*, (33), 63-72.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, A., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014): Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183-190.
- Nikolin, B., Šober, M. (2003): *Analitika lijekova*. Sarajevo Publishing, Sarajevo.
- North, L.H., Wuest, P. (1993): The infection process and symptom expression of *Verticillium* disease of *Agaricus bisporus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15: 74-80.

- Novotny, C., Erbanova, P., Sasek, V., Kubatova, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J., Zadrazil, F. (1999): Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*, 10: 159–168.
- Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Šušek, V., Molitoris, H.P. (2001): Capacity of *Irpex lateus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemical dyes. *Journal of Biotechnology*, 89: 113-122.
- Orav, A., Koel, M., Kailas, T., Mürisepp, M. (2010): Comparative analysis of the composition of essential oils and supercritical carbon dioxide extracts from the berries and needles of Estonian juniper (*Juniperus communis* L.). *Procedia Chemistry*, 2: 161-167.
- Oskiera, M., Szczech, M., Bartoszewski, G. (2015): Molecular identification of *Trichoderma* strains collected to develop plant growth-promoting and biocontrol agents. *Journal of Horticultural Research*, 23: 75–86.
- Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J., Chen, X., Romaine, C.P. (1999): Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushrooms green mold. *Phytopathology*, 89: 308-313.
- Ottavioli, J., Gonny, M., Casanova, J., Bighelli, A. (2009): Chemical variability of the needle oil of *Juniperus communis* ssp. *alpina* from Corsica. *Chemistry and Biodiversity*, 6: 2192-2199.
- Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Moja, S., Chahdi, F.O., Taleb, M., Greche, H. (2016): Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Industrial Crops and Products*, 89: 1-9.
- Pani, B.K., Panda, S.N., Das, S.R. (1997): Utilization of some agricultural bioproducts and other wastes for sporophore production of oyster mushroom. *The Orissa Journal of Horticulture*, 25: 36-39.
- Park, M.S., Bae, K.S., Yu, S.H. (2006): Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology*, 34: 11-113.
- Patel, Y., Naraian, R., Singh, V.K. (2012): Properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): A review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3: 1-12.
- Pathak, V., Dwivedi, R., Shukla, P. (2014): Pharmacognostical study of *Anethum sowa* (dill) seed. *International Journal of Recent Biotechnology*, 2(3): 6-14.
- Pavlič, B., Savić, D., Vladić, J., Vidović, S., Zeković, Z. (2018): Comparative analysis of the essential oils of three Lamiaceae species obtained by conventional and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 22(4): 174-179.
- Pavlović, M., Tzakou, O., Petrakis, P.V., Couladis, M. (2006): The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 84-87.
- Pecarski, D.M., Knežević-Jugović, Z.D., Dimitrijević-Branković, S.I., Mihajilovski, K.R., Janković, S.M. (2014): Comparative analysis of the chemical composition and antimicrobial activities of some Lamiaceae family species and eucalyptus (*Eucalyptus globules* M). *Acta Periodica Technologica (APTEFF)*, 45: 201-213.
- Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J. (2009): Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74: M379–M383.
- Persoon, C.H. (1794): *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Magazine of Botany, 1: 81-128.
- Petrović, S.S., Ristić, M.S., Petrović, N.V., Lazić, M.L., Francišković, M., Petrović, S.D. (2014): Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost etarskog ulja *Thymus serpyllum* L. *Hemijska Industrija*, 68(3): 389-397.
- Pignatti, S. (1982): *Flora d'Italia*. Edagricole, Bologna.
- Pino, J., Borges, P., Martinez, M., Vargas, M., Flores, H., Martin del Campo, S.T., Fuentes, V. (2002): Essential oil of *Mentha piperita* L. grown in Jalisco. *Journal of Essential Oil Research*, 14: 189-190.

- Pinto, E., Hrimpeng, K., Lopes, G., Vaz, S., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2013): Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32: 1311–1320.
- Popović, M. (2005): Biohemija biljaka. Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Potočnik, I. (2009): *Cladobotryum dendroides* (Bull.) W. Gams & Hooz., uzročnik paučinaste plesni šampinjona [*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach] i njegova osetljivost na fungicide i biofungicide. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Potočnik, I., Stepanović, M., Rekanović, E., Todorović, B., Milijašević-Marčić, S. (2015): Disease control by chemical and biological fungicides in cultivated mushrooms: button mushroom, oyster mushroom and shiitake. *Pesticides and Phytomedicine*, 30(4): 201-208.
- Potočnik, I., Todorović, B., Milijašević-Marčić, S., Luković, J., Kanižai-Šarić, G., Majić, I., Rekanović, E. (2021): A large-scale study on the effectiveness of a *Bacillus subtilis* Ch-13-based biofungicide against green mould disease and mushroom yield improvement. *Pesticides and Phytomedicine*, 36(2): 83-90.
- Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Milijašević, S., Stepanović, M., Todorović, B. (2009): Toxicity of fungicides with different modes of action to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44: 823-827.
- Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Stepanović, M., Milijašević, S., Todorović, B. (2010): Toxicity of biofungicide Timorex 66 EC to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Crop Protection*, 29(3): 290-294.
- Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Milijašević, S., Todorović, B., Stepanović, M. (2009): *In vitro* toxicity of selected fungicides from the group of benzimidazoles and demethylation inhibitors to *Cladobotryum dendroides* and *Agaricus bisporus*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44: 365-370.
- Pravdin, L.F. (1964): *Pinus sylvestris*: Variability, intraspecific taxonomy and selection. Nauka, Moskva.
- Qasemi, H., Fereidoni, Z., Karimi, J., Abdollahi, A., Zarenezhad, E., Rasti, F., Osanloo, M. (2021): Promising antibacterial effect of impregnated nanofiber mats with a green nanogel against clinical and standard strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66: 102844.
- Qiu, Z., Wu, X., Zhang, J., Huang, C. (2017): High temperature enhances the ability of *Trichoderma asperellum* to infect *Pleurotus ostreatus* mycelia. *PLoS ONE*, 12(10): e0187055.
- Quimio, T.H. (2004): Why grow mushrooms (Chapter 1. Introduction to Mushroom, Part I. Mushrooms). In *Oyster mushroom cultivation. Mushroom Growers' Handbook 1*, pp. 4-12.
- Rădulescu, V., Popescu, M.L., Ilieș, D.C. (2010): Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (Umbelliferae) cultivated in Romania. *Farmacia*, 58(5): 594-600.
- Radulović, N., Blagojević, P.D., Milojević, A.B. (2013): α -Linalool – a marker compound of forged/synthetic sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 3292-3303.
- Rahimmaleka, M., Sayed Tabatabaeib, B.E., Etemadic, N., Hossein Golid, S.A., Arzania, A., Zeinalie, H. (2009): Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. *Industrial Crops and Products*, 29: 348-355.
- Rasooli I., Abyaneh R. (2004): Inhibitory effect of *Thyme* oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15: 479-483.
- Reeb, J.E., Milota, M.R. (1999): Moisture content by the oven-dry method. *Proceeding of the 50th Meeting of Western Dry Kiln Association*, May 1999, State University Corvallis, Portland, OR, pp 66–74.
- Regnier, T., Combrinck, S. (2010): *In vitro* and *in vivo* screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. *South African Journal of Botany*, 76(4): 681-685.

- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R., Collado, I.G. (2008): Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89-123.
- Reuveni, M., Pipko, G., Neifeld, D., Finkelstein, E., Malka, B., Hornik, Y. (2006): New organic formulations of essential tea tree oil for the control of plant diseases. *Vegetable Crops News*, 42: 77-85.
- Richer, D.L. (1987): Synergism – a patent view. *Pesticide Science*, 19: 309-315.
- Rifai, M.A. (1969): A Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers, Commonwealth Mycological Institute, Richmond Keew, UK, Vol.116*, pp. 1–56.
- Rinker, D.L. (1993): Disease management strategies for *Trichoderma* mould. *Mushroom World*, 4: 3-5.
- Ríos, J.L., Recio, M.C. (2005): Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
- Robertson, J.L., Smith, K.L., Savin, N.E., Lavigne, R.J. (1984): Effects of dose selection and sample size on the precision of lethal dose estimates in sose-mortality regression. *Journal of Economic Entomology*, 77: 833-837.
- Romaine, C.P., Royse, D.J., Schlaghaufer, C. (2005): Superpathogenic *Trichoderma* resistant to Topsin M found in Pennsylvania and Delaware. *Mushroom News*, 53: 6-9.
- Romaine, C.P., Royse, D.J., Wuest, P.J., Beyer, D.M. (1996): Mushroom green mold: Cause, edaphic factors and control. *Mushroom News*, 44: 20-23.
- Royse, D. (2007): ICT WebDevelopment. <http://ppath.cas.psu.edu/FACULTY/royse.htm>
- Royse, D.J., Baars, J., Tan, Q. (2017): Current overview of mushroom production in the world. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, 5-13.
- Royse, D.J., Boomer, K., Du, Y., Handcock, M. (1999): Spatial distribution of green mold foci in 30 commercial mushroom crops. *Plant Disease*, 52: 246-250.
- Rus, C., Sumalan, R. M., Alexa, E., Copolovici, D. M., Pop, G., Botau, D. (2015): Study on chemical composition and antifungal activity of essential oils obtained from representative species belonging to the Lamiaceae family. *Plant Soil Environment*, 61(7): 297-302.
- Said-Al-Ahl, H.A., Sarhan, A.M., Dahab, A.D.M.A., Abou-Zeid, E.S.N., Ali, M.S., Nagulib, N.Y., El-Bendary, A.M. (2015): Essential oils of *Anethum graveolens* L.: Chemical composition and their microbial activities at vegetative, flowering and fruiting stages of development. *International Journal of Plant Science and Ecology*, 1(3): 98-102.
- Samoljik, I., Petković, S., Mimica-Dukić, N., Božin, B. (2012): Acute and chronic pretreatment with essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L., Lamiaceae) influences drug effects. *Phytotherapy Research*, 26: 820-825.
- Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A., Petrini, O. (2002): *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170.
- Sanchez, C. (2004): Modern aspects of mushroom culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 756–762.
- Sanchez, C. (2010): Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1321-1337.
- Sarić, M. (1989): *Lekovite biljke SR Srbije*. Srpska Akademija Nauke Umetnosti. Posebno izdanje, knj.65, Beograd.
- Saroglou, V., Marin, P.D., Rančić, A., Veljić, M., Skaltsa, H. (2007): Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 146-152.
- Savoie, J.M., Iapicco, R., Largeteau-Mamoun, M.L. (2001): Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th 2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycological Research*, 105(11): 1348-1356.
- Seaby, D. (1996): Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathology*, 45: 905-912.

- Seaby, D.A. (1987): Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species. *Mushroom Journal*, 179: 147-151.
- Senegül, T., Yurtseven, S., Çetin, M., Koçyiğit, A., Söğüt, B. (2008): Effect of thyme (*T. vulgaris*) extract on fattening performance, blood parameters, oxidative stress and DNA damage in Japanese quails. *Journal of Animal and Feed Science*, 17: 608-620.
- Shah, B., Seth, A.K. (2010): *Textbook of pharmacognosy and phytochemistry*. New Delhi: Elsevier India.
- Sharma, S.K., Sharma, R. (2016): Essential oil constituents and antimicrobial potency of *Thuja orientalis* grown in Rajasthan. *International Journal of Environment, Science and Technology*, 2(2): 1-7.
- Sharma, S.R., Kumar, S. (2000): Studies on wet bubble disease of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) caused by *Mycogone pernicioso*. *Proceeding of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maastricht, Netherlands, 15-19 May 2000, 2: 569-575.
- Sharma, S.R., Vijay, B. (1996): Yield loss in *Pleurotus ostreatus* spp. caused by *Trichoderma viride*. *Mushroom Research*, 5: 19-22.
- Sharma, V.P., Sharma, S., Kumar, S., Gupta, M., Kamal, S. (2016): Cobweb and dry bubble diseases in *Lentinula edodes* cultivation - A new report. *International Society for Mushroom Science*, 130-134.
- Shpak, S.I., Lamotkin, S.A., Lamotkin, A.I. (2007): Chemical composition of *Pinus sylvestris* essential oil from contaminated areas. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1): 55-58.
- Simon, J.E. (1990): Essential oils and culinary herbs. In: *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR, pp. 472-83.
- Sisto, D., Faggiano, S., Rana, G.L. (1997): *Mycogone pernicioso*, a potential threat for cultivated mushrooms in southern Italy. *Petria*, 7(3): 159-164.
- Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. (1998): Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 139-191.
- Sobieralski, K., Siwulski, M., Komoń-Żelazowska, M., Błaszczuk, L., Górski, R., Spiżewski, T., Sas-Golak, I. (2012): Evaluation of the growth of *Trichoderma pleurotum* and *Trichoderma pleuroticola* isolates and their biotic interaction with *Pleurotus* sp. *Journal of Plant Protection Research*, 52(2): 235-239.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995): *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. 3 edn. New York, NY, USA: W.H. Freeman and Company.
- Soković, M. (2001): Antifungalna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih i lekovitih biljaka *in vitro* i *in vivo*. *Doktorska disertacija*. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Soković, M., Marin, P.D., Brkić, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2007): Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*, 1(2): 220-226.
- Soković, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2006): Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 211-224.
- Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V., Van Griensven, L.J.L.D. (2009): Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14: 238-249.
- Soliman, K.M., Badaea, R.I. (2012): Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (2002): 1669-1675.
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiw, M., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., Sharma, A. (2020): *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. *Plants*, 9: 762.

- Srivastava, A., Prasad, B., Rutumbara, J., Rishi Srivastava, D.R. (2022): *Thuja occidentalis*: an unexplored phytomedicine with therapeutic applications. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 8: 25.
- Srivastava, P., Kumar, P., Singh, D.K., Singh, V.K. (2012): Biological properties of *Thuja orientalis* Linn. *Advances in Life Sciences*, 2(2): 17-20.
- Stamets, P. (1993): *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten Speed Press, Berkeley, California, USA.
- Stanisavljević, D.M., Zlatković, B.P., Ristić, M.S., Veličković, D.T., Đorđević, S.M., Lazić, M.L. (2012): Hemijski sastav etarskog ulja (*Thymus serpyllum* L.) sa područja Kopaonika. *Savremene Tehnologije*, 1(1): 25-29.
- Stanojević, Lj., Marjanović-Balaban, Ž., Kalaba, V., Stanojević, J., Cvetković, D., Cakić, M. (2017): Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20(6): 1557-1569.
- Starović, M., Ristić, D., Pavlović, S., Ristić, M., Stevanović, M., Al Juhaimi, F., Naydun, S., Özcan, M.M. (2016): Antifungal activities of different essential oils against anise seeds mycopopulations. *Journal of Food Safety and Food Quality – Archives of Food Hygiene*, 67(3): 72-78.
- Staunton, L., Dunne, R., Cormican, T., Donovan, M. (1999): *Chemical and biological control of mushroom, pests and diseases*. Horticulture and Farm Forestry, Series No. 14, TEAGASC, Kinsealy Research Centre, Dublin, Republic of Ireland.
- Stević, T. (2013): *Komparativna analiza agenasa za biološku kontrolu patogenih gljiva izolovanih sa lekovitih biljaka*. Doktorska disertacija. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Stević, T., Berić, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., Stanković, S. (2014): Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55: 116-122.
- Šarić, Lj., Čabarkapa, I., Šarić, B., Plavšić, D., Lević, J., Pavkov, S., Kokić, B. (2014): Composition and antimicrobial activity of some essential oils from Serbia. *Agro Food Industry Hi Tech*, 25(1): 40-43.
- Šilić, Č. (1990): *Atlas drveća i grmlja*. Svjetlost, Sarajevo.
- Tamura, A., Kotani, H., Naruto, S. (1975): Trichoviridin and dermadin from *Trichoderma* sp. TK-1. *Journal of Antibiotics*, 28: 161-162.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steker, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Tang, G.T., Li, Y., Zhou, Y., Zhu, Y.H., Zheng, X. J., Chang, X.L., Zhang, S.R., Gong, G.S. (2022): Diversity of *Trichoderma* species associated with soil in the Zoige alpine wetland of Southwest China. *Scientific reports*, 12(1): 21709.
- Tanović, B., Milijašević, S., Obradović, A. (2007): *In vitro* effect of plant essential oils on growth of some soil-borne pathogens. *Acta Horticulturae*, 729: 483-487.
- Tanović, B., Potočnik, I., Delibašić, G., Ristić, M., Marković, M. (2009): *In vitro* effect of essential oils from aromatic and medicinal plants on mushroom pathogens: *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone pernicioso*, and *Cladobotryum* sp. *Archives of Biological Science*, 61(2): 231-237.
- Tanović, B., Potočnik, I., Stanisavljević, B., Đorđević, M., Rekanović, E. (2006): Response of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone pernicioso* and *Cladobotryum* spp. mushroom pathogens to some essential oils. *Pesticides and Phytomedicine*, 21: 231-237.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y., Wang, Y. (2012): The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One*. 7(1): e30147.
- Tisdale, T. (2004): *Cultivation of the oyster mushroom (Pleurotus sp.) on wood substrates in Hawaii* (M.S.c. Thesis). University of Hawaii, Honolulu.

- Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E., Stepanović, M., Kostić, M., Ristić, M., Milijašević-Marčić, S. (2016): Toxicity of twenty-two plant essential oils against pathogenic bacteria of vegetables and mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(12): 832–839.
- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., Impicciatore, M. (2006): Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*, 78: 1419-1432.
- Tokimoto, K., Komatsu, M. (1979): Effect of carbon and nitrogen sources in media on the hyphal interference between *Lentinus edodes* and some species of *Trichoderma*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 45: 261-264.
- Toncer, O., Karaman, S., Diraz, E., Tansi, S. (2017): Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different phenological stages in semi-arid environmental conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26: 5441-5446.
- Tripathi, P., Dubey, N. (2004): Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 235-245.
- Troian, R.F., Steindorff, M., Ramada, H., Arruda, W., Ulhoa, C.J. (2014): Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*, 36: 2095-2101.
- Tsiri, D., Graikou, K., Poblócka-Olech, L., Krauze-Baranowska, M., Spyropoulos, M., Chinou, I. (2009): Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja* species cultivated in Poland-antimicrobial activity. *Molecules*, 14 (11): 4707-4715.
- Tucakov, J. (1990): Lečenje biljem. Rad, Beograd.
- Umar, M.H., Geels, F.P., Van Griensven L.J.L.D. (2000): Pathology and pathogenesis of *Mycogone pernicioso* infection of *Agaricus bisporus*. Proceeding of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, Netherlands, 15-19 May 2000, 2: 561-567.
- Umar, M.H., Van Griensven L.J.L.D. (1999): Studies on the morphogenesis of *Agaricus bisporus*: dilemma of normal versus abnormal fruit body development. *Mycological Research*, 103: 1235-1244.
- Urbán, P. (2012): Termesztett laskagomba *Trichoderma* közösségeinek biodiverzitása és ökofiziológiai vizsgálat. MSc thesis, University of Szeged, Szeged, Hungary.
- Valimaa, A.L., Honkalampi-Hämäläinen, U., Pietarinen, S., Willför, S., Holmbom, B., Von Wright, A. (2007): Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 235–243.
- Van Griensven, L.J.L.D., Van Roestel, A.J.J. (2004): The cultivation of the button mushroom, *Agaricus bisporus*, in the Netherlands: a successful industry. *Revista Mexicana de Micología*, 19: 95-102.
- Verma, R.S., Padalia, R.C., Chauhan, A. (2012): Variation in the volatile terpenoids of two industrially important basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars during plant ontogeny in two different cropping seasons from India. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 626-631.
- Vokk, R., Lougas, T., Mets, K., Kravets, M. (2011): Dill (*Anethum graveolens* L.) and parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) from Estonia: Seasonal differences in essential oil composition. *Agronomy Research*, 8: 515-520.
- Vyas, B.R.M., Molitoris, H.P. (1995): Involvement of an extra-cellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3919–392.
- Wang, G., Cao, X., Ma, X., Guo, M., Liu, C., Yan, L., Bian, Y. (2016): Diversity and effect of *Trichoderma* spp. associated with green mold disease, on *Lentinula edodes* in China. *Microbiology Open*, 5(4): 709-718.

- Warrier, P.K., Nambiar, V.P.K., Ramakutty, C. (1994): Indian medicinal plants. Orient Longman Limited, Kottakkal Madras, India.
- Wasser, P.S. (2005): Shiitake (*Lentinus edodes*). In Encyclopedia of Dietary Supplements, pp. 653-665. Marcel Dekker, New York, USA.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pp. 315-322. Eds M.A. Innis, D.H. Gelfrand, J.J. Sninsky and T.J. White. San Diego, California, USA: Academic Press.
- Williams, J., Clarkson, J.M., Mills, P.R., Cooper, R.M. (2003): Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology, 69: 4192-4199.
- Woo, S.L., Di Benedetto, P., Senatore, M., Abadi, K., Gigante, S., Soriente, I., Ferraioli, S., Scala, F., Lorito, M. (2004): Identification and characterization of *Trichoderma* species aggressive to *Pleurotus* in Italy. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 30: 469-470.
- Woods-Panzaru, S., Nelson, D., McCollum, G., Ballard, L.M., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Rooney, P.J., Loughrey A., Rao, J.R., Moore, J.E. (2009): An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents described in traditional Ulster cures and remedies. Ulster Medical Journal, 78(1): 13-15.
- Yang, S.A., Jeon, S.K., Lee, E.J., Im, N.K., Jhee, K.H., Lee, S.P., Lee, I.S. (2009): Radical scavenging activity of the essential oil of silver fir (*Abies alba*). Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 44: 253-259.
- Yeom, H.J., Kang, J.S., Kim, G.H., Park, I.K. (2012): Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). Journal of Agricultural Food Chemistry, 60: 7194-7203.
- Yili, A., Aisa, H.A., Maksimov, V.V., Veshkurova, O. N., Salikhov, Sh. I. (2009): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from seeds of *Anethum graveolens* growing in Uzbekistan. Chemistry of Natural Compounds, 45(2): 280-281.
- Yili, A., Yimamu, H., Maksimov, V.V., Aisa, H.A., Veshkurova, O.N., Salikhov, Sh. I. (2006): Chemical composition of essential oil from seeds of *Anethum graveolens* cultivated in China. Chemistry of Natural Compounds, 42(4): 491-492.
- Yu, S.H. (2002): Integrated control of oyster mushroom green mould (1-5). <http://www.mushworld.com>
- Yutani, M., Hashimoto, Y., Ogita, A., Kubo, I., Tanaka, T., Fujita, K. (2011): Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. Phytotherapy Research, 25:1707–1713.
- Zeković, Z., Filip, S., Vidović, S., Adamović, D., Elgndi, A. (2015): Basil (*Ocimum basilicum* L) essential oil and extracts obtained by supercritical fluid extraction. Acta Periodica Technologica (APTEFF), 46: 259-269.
- Zeković, Z., Lepojević, Ž., Milić, S., Adamović, D., Mujić, I. (2009): Supercritical CO₂ extraction of mentha (*Mentha piperita* L.) at different solvent densities. Journal of the Serbian Chemical Society, 74(4): 417-425.
- Zhang, J., Liu, M., Yang, Y., Lin, L., Xu, N., Zhao, H., Jia, L. (2016): Purification, characterization and hepatoprotective activities of mycelia zinc polysaccharides by *Pleurotus djamor*. Carbohydrate Polymers, 136: 588-597.

PRILOZI

PRILOG 1.

Tabela P1-1. Izolati vrsta roda *Trichoderma* korišćeni u filogenetskim analizama, poreklo i pristupni brojevi u GenBank bazi podataka

Izolat	Vrsta	Domaćin	Poreklo	GenBank pristupni broj	Literatura
TB3-36	<i>T. afroharzianum</i>	Soja	Kina	MW267263	Xu et al., neobjavljeno
Tafum1	<i>T. afroharzianum</i>	Zemljište	Kina	MT081431	Zhou et al., neobjavljeno
T54	<i>T. atrobrunneum</i>	Šampinjon	Srbija	OQ116866	Luković (2023), disertacija
T39	<i>T. atrobrunneum</i>	Treset	Kina	KX632628	Tang et al. (2022)
T42	<i>T. atrobrunneum</i>	Zemljište	Kina	KX632629	Tang et al. (2022)
S266	<i>T. atrobrunneum</i>	Cer	Hrvatska	KJ665375	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S622	<i>T. atrobrunneum</i>	-	Španija	KJ665413	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S447	<i>T. atrobrunneum</i>	Smrdljivo drvo	Španija	KJ665396	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S321	<i>T. atrobrunneum</i>	Bor	Španija	KJ665381	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S343	<i>T. atrobrunneum</i>	Crna jova	Francuska	KJ665384	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S147	<i>T. atrobrunneum</i>	Cer	Italija	KJ665369	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
T52	<i>T. guizhouense</i>	Šampinjon	Srbija	OQ116867	Luković (2023), disertacija
S393	<i>T. guizhouense</i>	Javor	Španija	KJ665506	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S279	<i>T. guizhouense</i>	Brest	Hrvatska	KJ665505	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
S278	<i>T. guizhouense</i>	Grab	Hrvatska	KF134799	Jaklitsch et al. (2014)
T57	<i>T. simmonsii</i>	Šiitake	Srbija	OQ116869	Luković (2023), disertacija
S86	<i>T. simmonsii</i>	Cer	Italija	KJ665721	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
Hypo15	<i>T. simmonsii</i>	Brest	Austrija	KJ665706	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
Hypo30	<i>T. simmonsii</i>	Leska	Austrija	KJ665707	Jaklitsch and Voglmyr (2015)
T10	<i>T. pholiotae</i>	Šampinjon	Srbija	OQ116868	Luković (2023), disertacija
JZBQH11	<i>T. pholiotae</i>	<i>Pholiota</i> sp.	Kina	ON649918	Cao et al. (2022)
JZBQH12	<i>T. pholiotae</i>	<i>Pholiota</i> sp.	Kina	ON649919	Cao et al. (2022)
JZBQH13	<i>T. pholiotae</i>	<i>Pholiota</i> sp.	Kina	ON649920	Cao et al. (2022)
Thaum12	<i>T. harzianum</i>	Zemljište	Kina	MT081434	Zhou et al., neobjavljeno
Thaum14	<i>T. harzianum</i>	Zemljište	Kina	MT081433	Zhou et al., neobjavljeno
CBS111147	<i>T. estonicum</i>	-	Estonija	FJ860638	Jaklitsch (2009)
CBS114576	<i>T. ceramicum</i>	-	SAD	FJ860628	Jaklitsch (2009)
CBS.43395	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Kompost za pečurke	Velika Britanija	KP008991	Oskeira et al., neobjavljeno

PRILOG 2.

Tabela P2-1. Prinosi i komponente etarskih ulja biljaka iz familije Lamiaceae (deo 1)

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)				
			Majčina dušica, list i cvet	Bosiljak, list	Bosiljak, cvet	Pitoma nana, list i cvet	Divlja nana, list i cvet
(3E)-heksenol	843	844	-	0,20	0,07	-	-
artemisia trien	924	923	-	0,14	0,09	-	-
α-tujen	925	924	0,61	-	-	-	1,82
α-pinen	933	932	0,42	0,06	0,07	0,37	0,92
kamfen	946	946	0,27	-	-	-	0,06
verbenon	963	961	-	0,12	0,05	-	-
sabinen	971	969	-	0,43	0,20	0,31	1,43
β-pinen	975	974	0,60	0,81	0,26	0,66	1,83
(3E)-okten-2-ol	981	982	0,33	-	-	-	-
3-oktanol	986	988	0,68	-	-	0,13	-
mircen	990	988	0,92	-	-	0,15	3,89
2-oktanol	992	994	-	-	-	-	0,38
δ-2-karen	1002	1001	-	-	-	-	0,10
α-felandren	1004	1002	0,09	-	-	-	-
δ-3-karen	1010	1008	0,05	-	-	-	-
α-terpinen	1019	1019	0,93	-	-	0,13	1,10
p-cimen	1022	1020	11,58	0,23	0,22	0,07	-
limonen	1026	1024	0,55	-	-	0,57	9,42
1,8-cineol	1027	1026	-	2,39	1,02	4,96	22,05
(Z)-β-ocimen	1034	1032	0,09	0,15	0,09	0,13	0,55
(E)-β-ocimen	1046	1044	0,09	2,84	1,86	-	0,08
(2E)-oktenal	1052	-	-	-	0,09	-	-
γ-terpinen	1053	1054	4,81	0,22	0,17	0,27	4,88
cis-sabinen hidrat	1063	1065	0,08	-	-	0,31	0,27
terpinolen	1084	1086	0,07	0,21	0,22	0,07	0,13
linalol	1096	1095	2,20	35,58	48,90	0,34	19,23
α-thujon	1102	1101	-	0,07	0,05	-	-
(2E,4E)-oktadienal	1103	1102	-	-	-	0,05	-
cis-p-ment-2-en-1-ol	1117	1118	-	-	-	-	0,27
(E)-epoksi ocimen	1136	1137	-	-	0,82	-	-
trans-limonen oksid	1136	1137	-	-	-	-	0,13
cis-β-terpineol	1138	1140	-	-	-	0,22	-
kamfor	1140	1141	-	0,30	0,30	-	-
izopulegol	1143	1145	-	-	-	0,25	-
menton	1150	1148	-	-	-	26,21	-
izomenton	1160	1158	-	-	-	-	0,07
neo-mentol	1162	1161	-	-	-	9,12	-
borneol	1166	1165	0,72	0,48	0,39	-	-
mentol	1169	1167	-	-	-	36,80	0,76
4-terpineol	1174	1174	0,33	0,78	0,84	0,73	0,70
izomentol	1180	1179	-	-	-	0,70	-
cis-pinokarveol	1180	1182	0,06	-	-	-	-
α-terpineol	1184	1186	0,17	-	-	0,20	0,80
cis-dihidrokarvon	1191	1191	-	-	-	0,11	-
dihidrokarveol	1192	1192	-	-	-	-	1,00
metil kavikol	1193	1195	-	32,92	17,79	-	-
trans-dihidrokarvon	1200	1200	-	-	-	-	0,87
verbenon	1205	1204	-	-	-	0,06	-
oktanol acetat	1212	1211	-	-	-	0,22	-
cis-karveol	1228	1226	0,77	-	-	-	0,34
timol metil etar	1233	1232	0,61	-	-	-	-
pulegon	1234	1233	-	-	-	0,05	0,10

Tabela P2-1. Prinosi i komponente etarskih ulja biljaka iz familije Lamiaceae (deo 2)

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)				
			Majčina dušica, list i cvet	Bosiljak, list	Bosiljak, cvet	Pitoma nana, list i cvet	Divlja nana, list i cvet
karvon	1241	1239	1,90	-	-	0,29	0,13
cis-piperiton oksid	1250	1250	-	-	-	-	0,19
geraniol	1251	1249	32,43	0,36	0,52	-	-
piperiton	1252	1249	-	-	-	1,19	-
linalil acetat	1252	1254	-	-	-	-	0,22
geranial	1266	1264	0,20	-	-	-	-
peril aldehid	1267	1269	-	-	-	-	0,07
neo-mentil acetat	1270	1271	-	-	-	0,25	-
bornil acetat	1282	1284	-	0,98	0,99	0,12	6,14
timol	1289	1289	11,59	-	-	-	-
mentil acetat	1293	1294	-	-	-	4,14	14,21
karvakrol	1296	1298	16,97	-	-	-	-
izomentil acetat	1304	1304	-	-	-	0,24	-
α -terpinil acetat	1348	1346	0,07	-	-	-	-
eugenol	1355	1356	-	1,27	0,54	-	-
piperitenon oksid	1367	1366	-	-	-	-	0,66
α -kopaen	1373	1374	-	-	0,16	-	-
α -kopaen	1376	1374	1,35	-	-	-	0,06
(E)- β -damascenon	1381	1383	-	0,12	0,27	-	-
(3Z)-heksenil heksenoat	1380	1378	-	-	-	0,42	-
β -bourbonen	1388	1387	0,09	0,17	-	0,19	0,86
β -elemen	1391	1389	-	2,41	3,85	-	-
etil dekanoat	1397	1395	-	-	-	0,05	-
n-tetradekan	1401	1400	-	-	-	0,07	-
metil eugenol	1402	1403	-	0,09	-	-	-
β -kariofilen	1416	1417	3,08	0,93	1,32	3,79	1,20
β -gurjunen	1429	1431	-	1,99	1,22	-	-
trans- α -bergamoten	1432	1432	-	0,55	0,92	-	-
aromadendren	1441	1439	-	0,07	0,09	-	-
α -humulen	1451	1452	-	0,51	0,59	0,38	0,13
(E)- β -farnesen	1456	1454	0,15	-	-	-	-
alo-aromadendren	1459	1458	-	0,38	0,33	-	-
10-epi- β -akoradien	1476	1474	-	2,60	4,07	-	-
γ -murolen	1477	1478	0,05	-	-	-	-
germakren D	1482	1484	0,36	0,07	0,09	2,40	1,44
β -guaien	1491	1492	-	0,55	0,75	-	-
δ -selinen	1493	1492	-	-	-	0,47	-
2-tridekanon	1494	1495	-	-	-	-	0,69
biciklogermakren	1499	1500	-	1,07	1,86	-	-
β -bisabolen	1504	1505	3,93	-	-	-	-
γ -kadinen	1513	1513	-	1,68	1,56	-	-
trans-kalamenen	1521	1521	-	-	-	-	0,10
δ -kadinen	1522	1522	0,16	0,28	0,22	0,20	-
cis-kalamenen	1527	1528	-	0,08	0,10	-	-
salviadienol	1522	-	-	0,22	0,05	-	-
(E)-nerolidol	1562	1561	0,19	-	0,30	-	-
spatulenol	1578	1577	-	-	0,13	-	-
kariofilen oksid	1582	1582	-	-	-	0,41	0,16
maliol	1567	1566	-	-	0,65	-	-
viridiflorol	1592	1592	0,31	0,25	0,17	0,41	-
kubeban-11-ol	1596	1595	-	-	0,20	-	-
n-heksadekan	1600	1600	-	-	-	0,75	-
β -oploponen	1605	1607	0,07	-	-	-	-
1,10-di-epi-kubenol	1617	1618	-	0,55	0,58	-	-
3-izo-tujopsanon	1642	1641	-	-	-	0,19	-

Tabela P2-1. Prinosi i komponente etarskih ulja biljaka iz familije Lamiaceae (deo 3)

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)				
			Majčina dušica, list i cvet	Bosiljak, list	Bosiljak, cvet	Pitoma nana, list i cvet	Divlja nana, list i cvet
α-murolol	1645	1644	-	4,08	4,27	-	-
α-kadinol	1653	1652	-	-	-	-	0,10
selin-11-en-4α-ol	1656	1658	-	0,39	0,50	-	-
7-epi-α-eudesmol	1660	1662	-	-	-	0,22	-
α-bisabolol	1687	1685	-	0,12	-	-	-
germakron	1693	1693	-	-	-	0,10	-
Ukupno identifikovano (%)			99,93	99,70	99,80	99,47	99,54
Monoterpenski ugljovodonici			21,08	5,21	3,23	2,73	26,21
Oksidovani monoterpeni			39,54	41,06	54,10	86,29	68,21
Seskviterpenski ugljovodonici			9,17	13,34	17,13	7,43	3,79
Oksidovani seskviterpeni			0,57	5,61	6,85	1,33	0,26
Fenilpropanoidi			-	34,28	18,33	-	-
Fenoli			28,56	-	-	-	-
Ostalo			1,01	0,20	0,16	1,69	1,07
Prinos etarskog ulja (% v/w)			1,80	1,24	1,44	1,15	1,02
Broj identifikovanih komponenti			41	44	48	48	43

RI_E^a – eksperimentalno dobijeni retencioni indeksi, izračunati u odnosu na seriju n-alkana (C6 – C28) na DB-5 koloni;
 RI_L^b – retencioni indeksi preuzeti iz literature (Adams, 2007)

Tabela P2-2. Prinosi i komponente etarskih ulja zimzelenih biljaka (deo 1)

Komponente	RI ^E ^a	RI ^L ^b	Sadržaj (%)				
			Tuja, iglice	Tuja, plod	Jela, iglice	Bor, iglice	Kleka, plod
(2E)-heksenal	844	846	0,50	-	-	-	-
Santen	882	884	-	-	0,71	-	-
2-bornen	907	909	0,07	0,10	-	-	-
Triciklen	924	921	0,18	-	11,61	0,16	0,07
artemisia trien	924	923	-	0,16	-	-	-
α -tujen	925	924	0,14	0,26	-	0,11	1,57
α -pinen	933	932	41,75	43,75	9,93	37,48	32,06
Kamfen	946	946	1,58	1,95	10,58	0,99	0,23
n-heptanol	959	959	-	-	-	-	0,08
Sabinen	971	969	2,18	2,67	5,06	-	14,20
β -pinen	975	974	2,01	2,45	1,46	16,35	2,15
Mircen	990	988	0,07	0,08	-	1,16	15,09
n-oktanol	1000	998	-	-	-	-	0,06
α -felandren	1004	1002	0,09	-	1,67	-	-
δ -3-karen	1010	1008	26,4	34,83	1,23	0,11	0,13
α -terpinen	1019	1019	0,34	0,50	3,57	0,05	0,48
p-cimen	1022	1020	2,30	1,51	-	0,05	0,28
Limonen	1026	1024	-	-	1,03	1,94	3,07
β -felandren	1026	1025	-	-	4,54	0,13	-
(Z)- β -ocimen	1034	1032	0,11	0,04	0,12	1,02	-
(E)- β -ocimen	1046	1044	0,08	0,11	-	0,05	-
γ -terpinen	1053	1054	0,15	0,24	6,08	-	0,88
cis-sabinen hidrat	1063	1065	-	-	-	-	0,05
Terpinolen	1084	1086	4,17	5,21	-	0,38	0,95
p-ment-2,4(8)-dien	1086	1085	-	-	15,99	-	-
Linalol	1096	1095	-	-	0,20	0,21	0,19
β -tujon	1113	1112	-	-	0,38	-	-
cis-p-ment-2-en-1-ol	1117	1118	-	-	-	-	0,10
α -kamfolenal	1122	1122	-	-	-	-	0,06
alo-ocimen	1127	1128	-	-	0,11	-	-
trans-limonen oksid	1136	1137	-	-	0,32	-	-
trans-pinokarveol	1136	1135	-	-	0,19	0,12	0,16
cis-verbenol	1139	1137	-	-	-	-	0,07
Pinokarvon	1162	1160	-	-	0,26	0,15	-
δ -terpineol	1162	1162	-	-	-	-	0,11
p-ment-1,5-dien-8-ol	1167	1166	-	-	-	-	0,05
4-terpineol	1174	1174	0,28	0,33	12,50	-	2,15
α -terpineol	1184	1186	0,08	0,08	0,98	0,80	0,19
Mirtenol	1192	1194	-	-	-	-	0,07
cis-piperitol	1194	1195	-	-	0,15	-	-
Dodekan	1200	1200	-	-	0,13	-	-
trans-karveol	1215	1215	-	-	0,13	-	-
Citronelol	1221	1223	-	-	-	-	0,09
(3Z)-heksanil-2-metil butanoat	1229	1229	-	-	-	-	0,05
timol metil etar	1233	1232	-	-	-	0,05	-
Heptil izobutanoat	1248	1246	-	-	-	-	0,07
linalil acetat	1252	1254	-	-	-	0,29	-
Piperiton	1252	1249	-	-	1,60	-	-
bornil acetat	1282	1284	0,26	0,33	8,47	0,68	0,20
δ -elemen	1333	1335	0,40	0,41	0,08	0,09	0,06
α -kubeben	1345	1345	-	-	-	-	0,66
α -terpinil acetat	1348	1346	1,26	0,56	-	1,78	-
α -longipinen	1349	1350	-	-	0,28	-	-
Izoleđene	1375	1374	-	-	-	-	0,09
α -kopaen	1376	1374	-	-	-	0,13	0,27
geranil acetat	1379	1379	-	-	-	0,13	-

Tabela P2-2. Prinosi i komponente etarskih ulja zimzelenih biljaka (deo 2)

Komponente	RI ^E ^a	RI ^L ^b	Sadržaj (%)				
			Tuja, iglice	Tuja, plod	Jela, iglice	Bor, iglice	Kleka, plod
daucen	1381	1380	-	-	-	-	0,10
β -kubeben	1386	1387	-	-	-	1,35	-
β -elemen	1391	1389	0,44	0,17	-	0,09	1,62
junipen	1406	1407	-	-	0,15	-	0,06
α -gurjunen	1409	1409	0,21	0,28	-	-	-
β -kariofilen	1416	1417	4,53	1,20	0,05	6,80	1,58
β -gurjunen	1429	1431	0,12	0,08	-	0,12	-
γ -elemen	1432	1434	-	-	-	-	1,35
aromadendren	1441	1439	-	-	-	0,06	-
sejcelen	1446	1444	-	-	-	0,12	-
α -humulen	1451	1452	3,27	0,58	0,11	1,23	1,98
alo-aromadendren	1459	1458	0,05	-	-	-	0,06
γ -gurjunen	1473	1475	0,16	0,13	-	0,68	0,33
germakren D	1482	1484	1,61	0,32	-	13,35	6,77
β -selinen	1487	1489	0,10	-	-	0,37	0,37
δ -selinen	1493	1492	-	-	0,05	2,60	1,39
α -selinen	1496	1498	0,12	0,04	-	-	-
α -zingiberen	1494	1493	0,05	-	-	-	-
1,7-di-epi- β -cedren	1498	1498	0,08	-	-	-	-
α -murolen	1501	1500	-	-	-	-	0,10
germakren A	1506	1508	0,30	-	-	0,11	-
γ -kadinen	1513	1513	-	-	0,07	1,17	0,44
δ -kadinen	1522	1522	0,37	0,06	-	4,03	1,05
trans-kadin-1,4-dien	1531	1533	-	-	-	0,08	-
α -kadinen	1537	1537	-	-	-	0,22	0,15
α -kalakoren	1543	1544	0,34	-	-	-	0,08
elemol	1549	1548	0,27	0,07	-	-	0,10
elemicin	1554	1555	-	-	-	-	0,08
spatulenol	1578	1577	-	-	-	0,28	0,47
germakren B	1558	1559	-	0,14	0,05	-	3,80
1-heksadecen	1588	1588	-	-	-	-	0,13
globulol	1588	1590	0,18	-	-	-	-
izo-aromadendren epoksid	1591	1590	0,17	0,10	-	-	-
viridiflorol	1592	1592	-	-	-	0,14	-
α -cedrol	1608	1608	2,01	1,10	-	-	-
junenol	1617	1618	-	-	-	-	0,11
10-epi- γ -eudesmol	1621	1622	0,12	-	-	-	-
γ -eudesmol	1629	1630	0,14	-	0,11	0,08	-
α -akorenol	1634	1632	-	-	-	-	0,05
α -murolol	1645	1644	-	-	-	1,02	-
β -eudesmol	1648	1649	-	-	-	-	0,31
α -kadinol	1650	1652	-	-	-	0,13	-
α -eudesmol	1653	1652	0,12	-	-	1,23	-
7-epi- α -eudesmol	1660	1662	0,35	-	-	-	-
dihidro-eudesmol	1661	1661	-	-	-	-	0,38
metil tetradekanoat	1722	1722	-	-	-	-	0,07
etil heksadekanoat	1993	1992	-	-	-	-	0,10
Ukupno identifikovano (%)			99,51	99,84	99,95	99,67	99,15
Monoterpenski ugljovodonici			81,62	93,86	72,98	59,98	71,16
Oksidovani monoterpeni			1,88	1,30	25,18	4,21	3,55
Seskviterpenski ugljovodonici			12,15	3,41	0,84	32,60	22,31
Oksidovani seskviterpeni			3,36	1,27	0,11	2,88	1,42
Fenilpropanoidi			-	-	-	-	0,08
Ostalo			0,50	-	0,84	-	0,63
Prinos etarskog ulja (% v/w)			0,58	0,64	0,35	0,42	1,51

Tabela P2-2. Prinosi i komponente etarskih ulja zimzelenih biljaka (deo 3)

	Tuja, iglice	Tuja, plod	Jela, iglice	Bor, iglice	Kleka, plod
Broj identifikovanih komponenti	45	33	36	47	63

RI_E^a – eksperimentalno dobijeni retencioni indeksi, izračunati u odnosu na seriju n-alkana (C6 – C28) na DB-5 koloni;

RI_L^b – retencioni indeksi preuzeti iz literature (Adams, 2007)

Tabela P2-3. Prinosi i komponente etarskih ulja kantariona i hajdučke trave (deo 1)

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)	
			Hajdučka trava, list i cvet	Kantarion, list i cvet
n-oktan	800	800	-	0,06
(2E)-heksenal	844	846	0,16	-
2-metil oktan	864	-	-	11,44
2-heptanol	895	894	-	0,91
santolina trien	908	906	0,34	-
amil acetat	910	911	-	0,05
triciklen	924	921	3,00	-
α -tujen	925	924	1,75	0,08
α -pinen	933	932	0,68	10,74
kamfen	946	946	0,05	-
sabinen	971	969	3,01	1,07
β -pinen	975	974	17,99	0,80
6-metil-5-hepten-2-on	982	981	0,19	-
mircen	990	988	0,15	0,27
δ -3-karen	1010	1008	0,49	-
α -terpinen	1019	1019	0,79	0,05
p-cimen	1022	1020	1,36	0,13
1,8-cineol	1027	1026	10,30	-
β -felandren	1026	1025	0,05	0,17
(Z)- β -ocimen	1034	1032	0,06	0,16
(E)- β -ocimen	1046	1044	-	0,68
γ -terpinen	1053	1054	1,12	-
(2E)-okten-1-ol	1058	1060	-	2,60
artemisia alkohol	1082	1080	0,32	-
metil benzoat	1089	1088	0,23	-
linalol	1096	1095	0,07	0,88
β -tujon	1113	1112	0,08	-
3-oktanol acetat	1121	1120	0,08	-
α -kamfolenal	1122	1122	0,05	-
alo-ocimen	1127	1128	0,05	-
trans-limonen oksid	1136	1137	1,10	-
kamfor	1140	1141	7,99	-
menton	1150	1148	1,65	-
cis-krizantemol	1158	1160	1,30	-
pinokarvon	1162	1160	2,25	-
borneol	1166	1165	2,14	-
4-terpineol	1174	1174	0,07	0,09
cis-pinokarveol	1180	1182	0,56	-
α -terpineol	1184	1186	1,87	-
cis-dihidrokarvon	1191	1191	0,93	-
trans-dihidrokarvon	1200	1200	0,20	-
verbenon	1205	1204	0,11	-
trans-piperitol	1208	1207	0,18	-
trans-karveol	1215	1215	0,20	-
cis-karveol	1228	1226	0,09	-
kumin aldehid	1237	1238	0,05	-
piperiton	1252	1249	0,11	-
2-metil dodekan	1256	-	-	2,54
trans-karvon oksid	1275	1273	0,89	-
bornil acetat	1282	1284	0,79	-
γ -terpinen-7-al	1292	1290	-	0,61
karvakrol	1296	1298	0,05	-
α -kubeben	1345	1345	0,09	0,56
eugenol	1355	1356	0,60	-
α -kopaen	1373	1374	0,08	-
izoledene	1375	1374	-	0,42

Tabela P2-3. Prinosi i komponente etarskih ulja kantariona i hajdučke trave (deo 2)

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)	
			Hajdučka trava, list i cvet	Kantarion, list i cvet
α -kopaen	1376	1374	-	0,29
β -kubeben	1386	1387	0,10	-
β -bourbonen	1388	1387	0,59	0,07
β -elemen	1391	1389	0,05	-
α -funebren	1401	1402	-	0,16
metil eugenol	1402	1403	0,05	-
seskvitujen	1404	1405	-	0,13
2-epi- β -funebren	1412	1411	-	0,50
β -kariofilen	1416	1417	9,33	22,97
β -cedren	1420	1419	0,08	-
β -gurjunen	1429	1431	-	0,49
aromadendren	1441	1439	0,05	0,35
(Z)- β -farnesen	1442	1440	-	0,13
α -humulen	1451	1452	1,21	-
α -patčulen	1456	1454	-	0,19
(E)- β -farnesen	1456	1454	0,10	10,96
cis-murol-4(14),5-dien	1467	1465	-	0,23
β -akoradien	1467	1469	-	0,21
dodekan-1-ol	1470	1469	-	0,27
trans-kadin-1(6),4-dien	1474	1475	-	1,83
γ -gurjunen	1473	1475	0,13	-
γ -murolen	1477	1478	-	1,80
germakren D	1482	1484	1,89	2,66
β -selinen	1487	1489	0,25	0,63
(E)- β -jonon	1488	1487	-	0,33
α -selinen	1496	1498	0,09	-
biciklogermakren	1499	1500	-	1,57
α -murolen	1501	1500	0,19	-
γ -kadinen	1513	1513	0,15	0,90
δ -kadinen	1522	1522	0,24	1,72
trans-kadin-1,4-dien	1531	1533	-	0,15
α -kadinen	1537	1537	-	0,23
α -kalakoren	1543	1544	0,05	0,15
elemol	1549	1548	0,20	-
(E)-nerolidol	1562	1561	-	0,68
spatulenol	1578	1577	0,06	0,51
kariofilen oksid	1582	1582	0,48	1,57
germakren B	1558	1559	0,36	0,30
1-heksadecen	1588	1588	-	-
izo-aromadendren epoksid	1591	1590	3,22	-
viridiflorol	1592	1592	4,28	3,76
rosifoliol	1600	1600	-	0,24
(2E)-dodecenil acetat	1609	1608	0,09	-
humulen epoksid II	1610	1608	-	0,25
1,10-di-epi-kubenol	1617	1618	-	0,51
10-epi- γ -eudesmol	1621	1622	0,57	-
cis-kadin-4-en-7-ol	1634	1635	-	0,17
hinesol	1638	1640	0,21	-
epi- α -murolol	1641	1640	0,49	2,56
β -eudesmol	1648	1649	-	1,02
α -kadinol	1650	1652	-	0,21
α -eudesmol	1653	1652	-	0,60
Selin-11-en-4 α -ol	1659	1658	0,65	-
7-epi- α -eudesmol	1660	1662	-	0,82
epi- β -bisabolol	1669	1670	-	0,12

Tabela P2-3. Prinosi i komponente etarskih ulja kantariona i hajdučke trave (deo 3)

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)	
			Hajdučka trava, list i cvet	Kantarion, list i cvet
α -bisabolol	1687	1685	1,60	0,88
tetradekan-1-ol	1673	1671	-	2,11
germakron	1693	1693	0,40	-
(2E,6Z)-farnesol	1712	1714	0,17	-
kamazulen	1732	1730	5,45	-
hexahydrofarnesyl acetone (phytone)	1845	-	-	0,26
heksadekanska kiselina	1957	1959	0,68	-
metil linoleat	2097	2095	-	0,12
4,8,13-duvatriene-1,3-diol	2168	-	0,17	-
Ukupno identifikovano (%)			99,31	99,92
Monoterpenski ugljovodoni			30,90	14,15
Oksidovani monoterpeni			33,30	1,58
Seskviterpenski ugljovodoni			15,03	49,60
Oksidovani seskviterpeni			12,33	13,90
Fenilpropanoidi			0,65	-
Fenoli			0,05	-
Ostalo			6,88	20,69
Prinos etarskog ulja (% v/w)			0,21	0,08
Broj identifikovanih komponenti			81	65

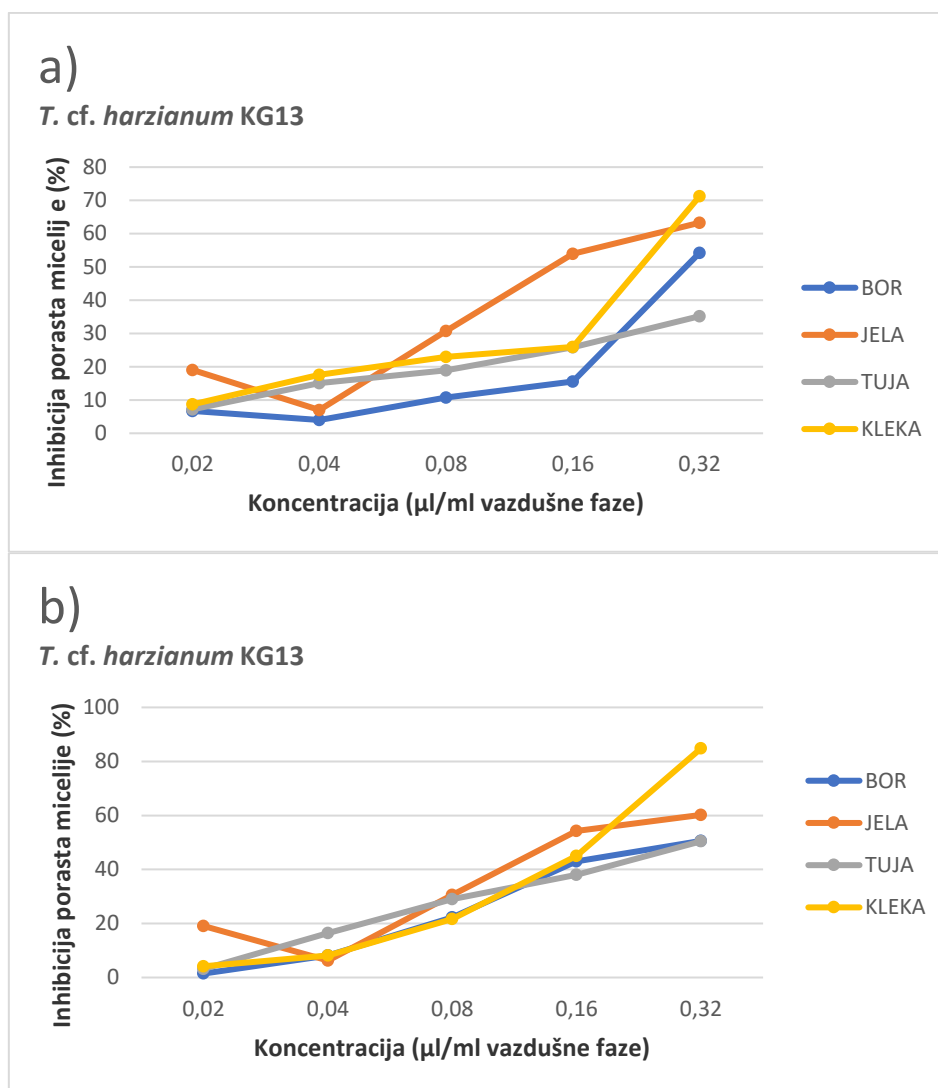
RI_E^a – eksperimentalno dobijeni retencioni indeksi, izračunati u odnosu na seriju n-alkana (C6 – C28) na DB-5 koloni; RI_L^b – retencioni indeksi preuzeti iz literature (Adams, 2007)

Tabela P2-4. Prinosi i komponente etarskog ulja mirođije

Komponente	RI _E ^a	RI _L ^b	Sadržaj (%)
			Mirođija, list i seme
α -tujen	925	924	0,09
α -pinen	933	932	0,47
sabinen	971	969	0,05
β -pinen	975	974	0,27
α -felandren	1004	1002	14,02
limonen	1026	1024	22,83
terpinolen	1084	1086	0,14
alo-ocimen	1127	1128	0,09
dil etar	1182	1184	1,06
cis-dihidrokarvon	1191	1191	0,38
trans-dihidrokarvon	1200	1200	3,60
trans-karveol	1215	1215	0,05
cis-karveol	1228	1226	0,21
karvon	1241	1239	56,4
(2E)-decenal	1261	1260	0,07
trans-karvon oksid	1275	1273	0,06
Ukupno identifikovano (%)			99,79
Monoterpenski ugljovodoni			37,96
Oksidovani monoterpeni			61,76
Ostalo			0,07
Prinos etarskog ulja (% v/w)			2,02
Broj identifikovanih komponenti			16

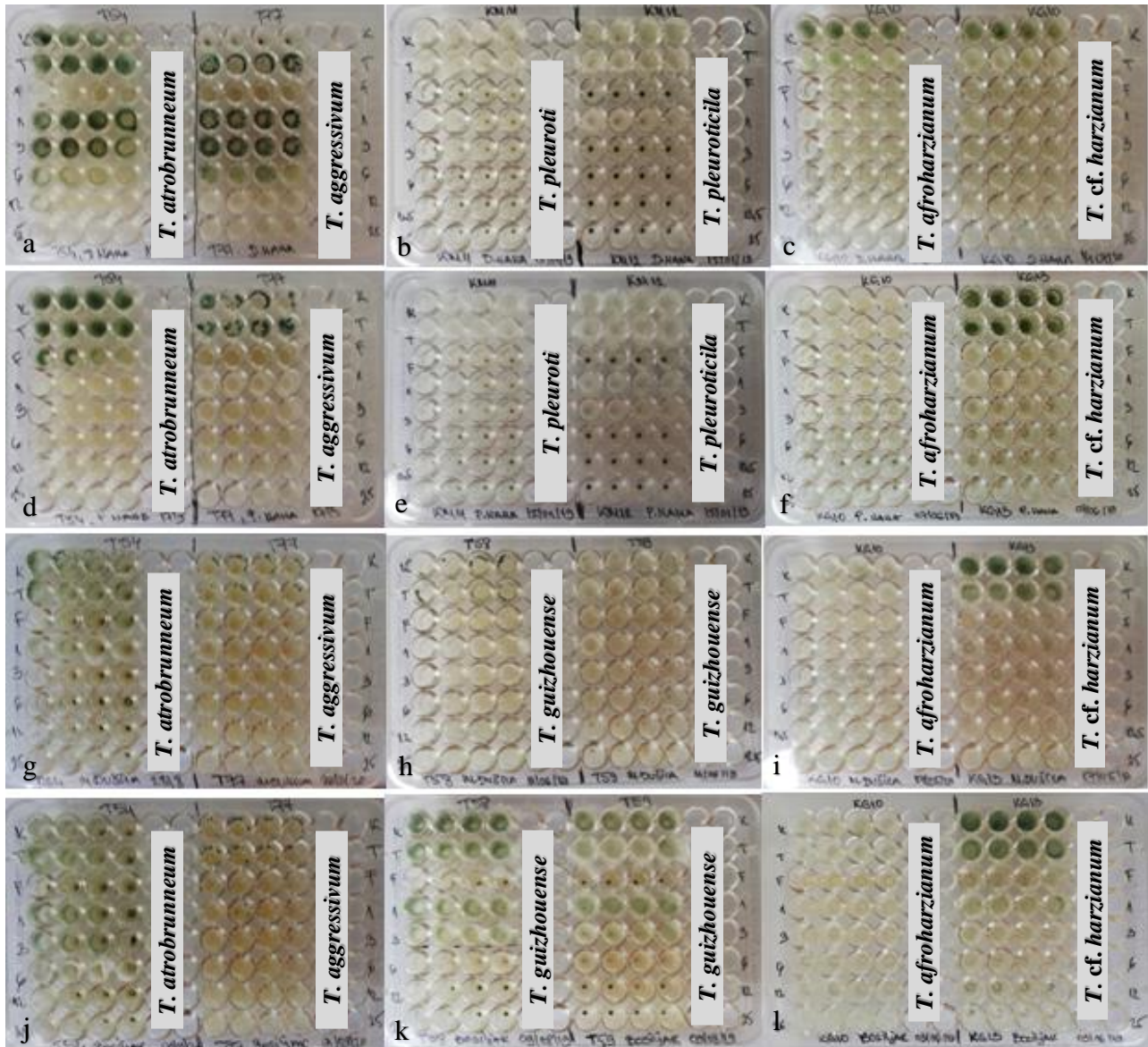
RI_E^a – eksperimentalno dobijeni retencioni indeksi, izračunati u odnosu na seriju n-alkana (C6 – C28) na DB-5 koloni; RI_L^b – retencioni indeksi preuzeti iz literature (Adams, 2007)

PRILOG 3.

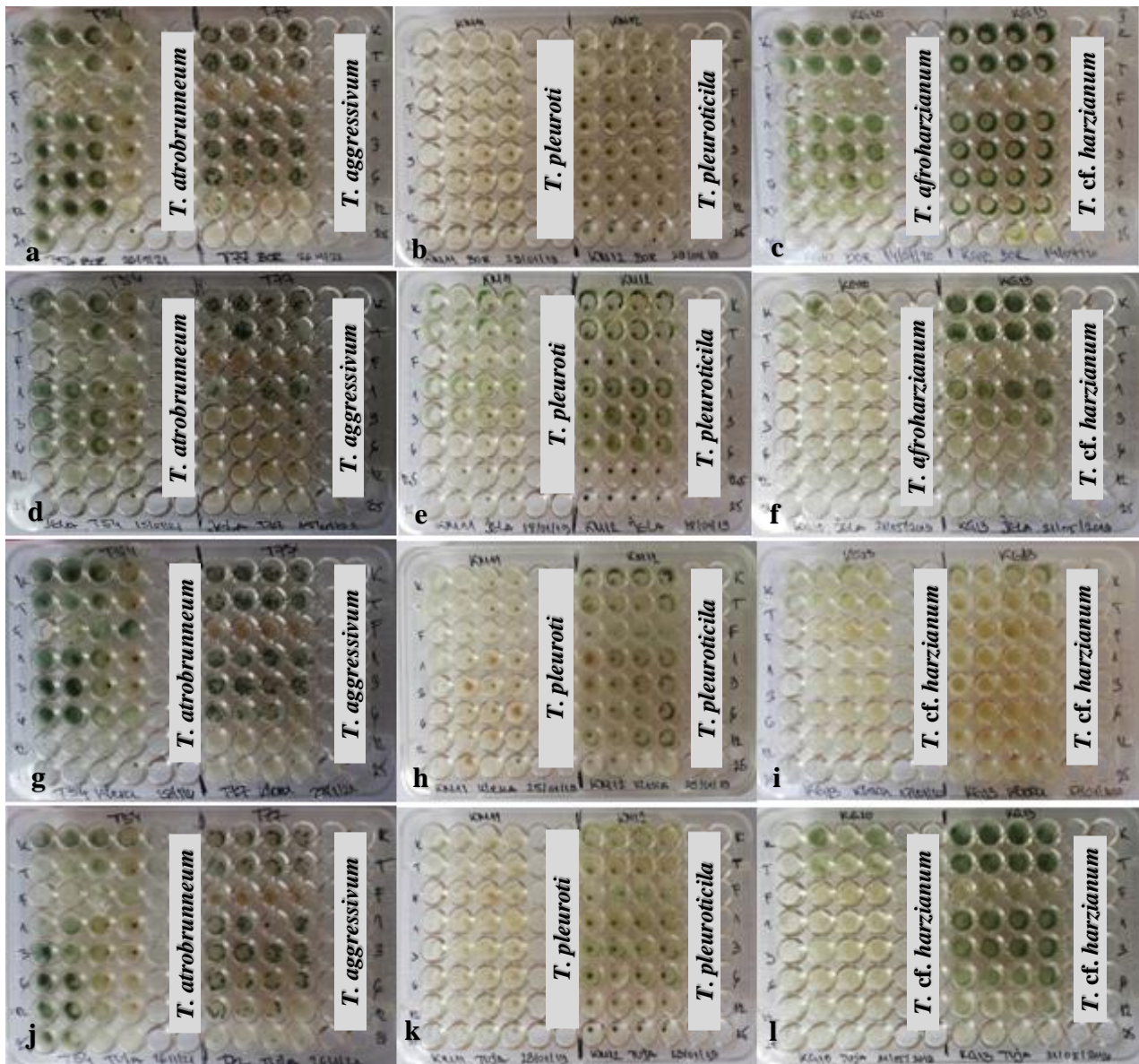


Grafikon P3-1. Procenti inhibicije porasta kolonije micelije *T. cf. harzianum* za etarska ulja bora, jele, tuje i kleke primenom makrodilucione fumigantne metode sa suspenzijom spora (a) i isečkom micelije (b)

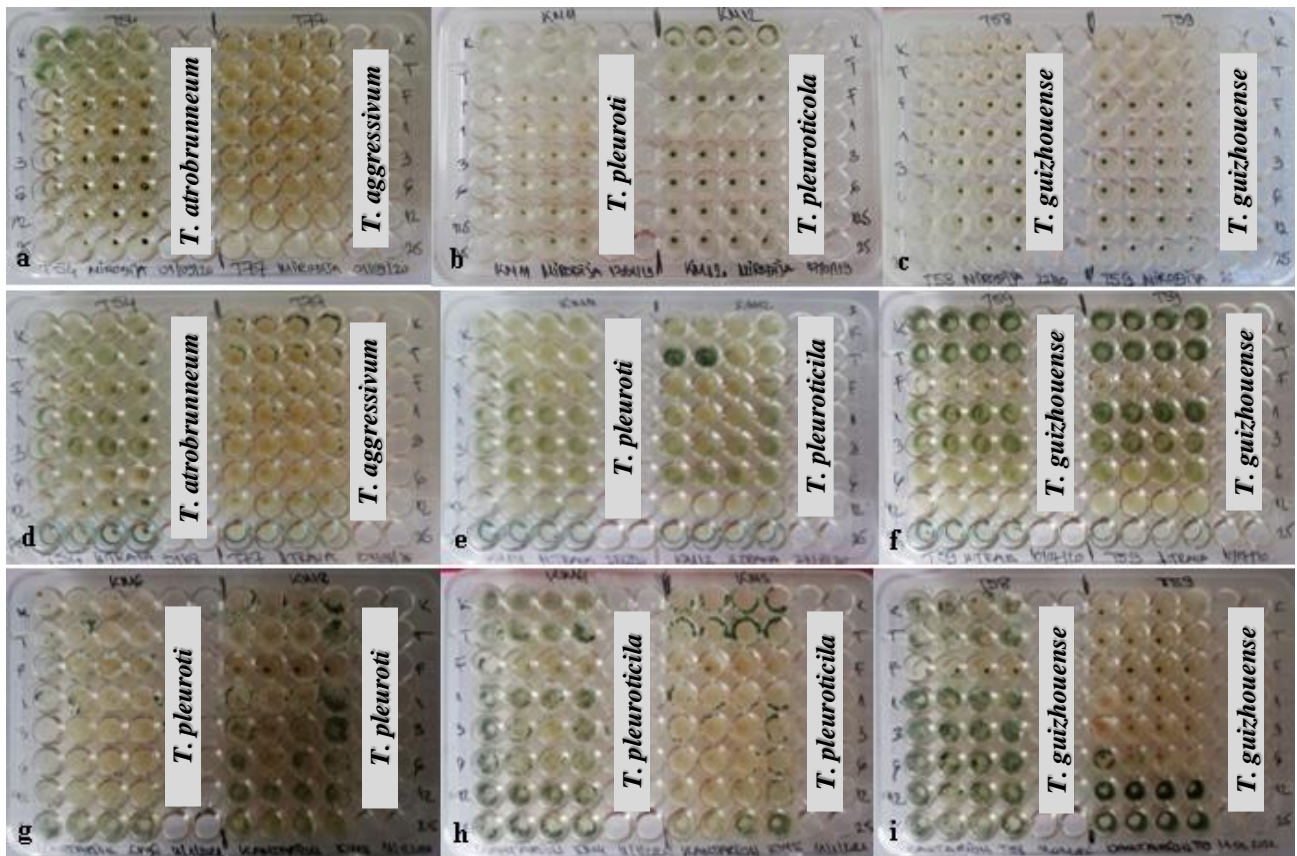
PRILOG 4.



Slika P4-1. Delovanje etarskih ulja divlje nane (a-c), pitome nane (d-f), majčine dušice (g-i) i bosiljka (j-l) prema: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum*, *T. guizhouense*, *T. pleuroti*, *T. pleuroticola* i *T. cf. harzianum* primenom mikrodilucione metode

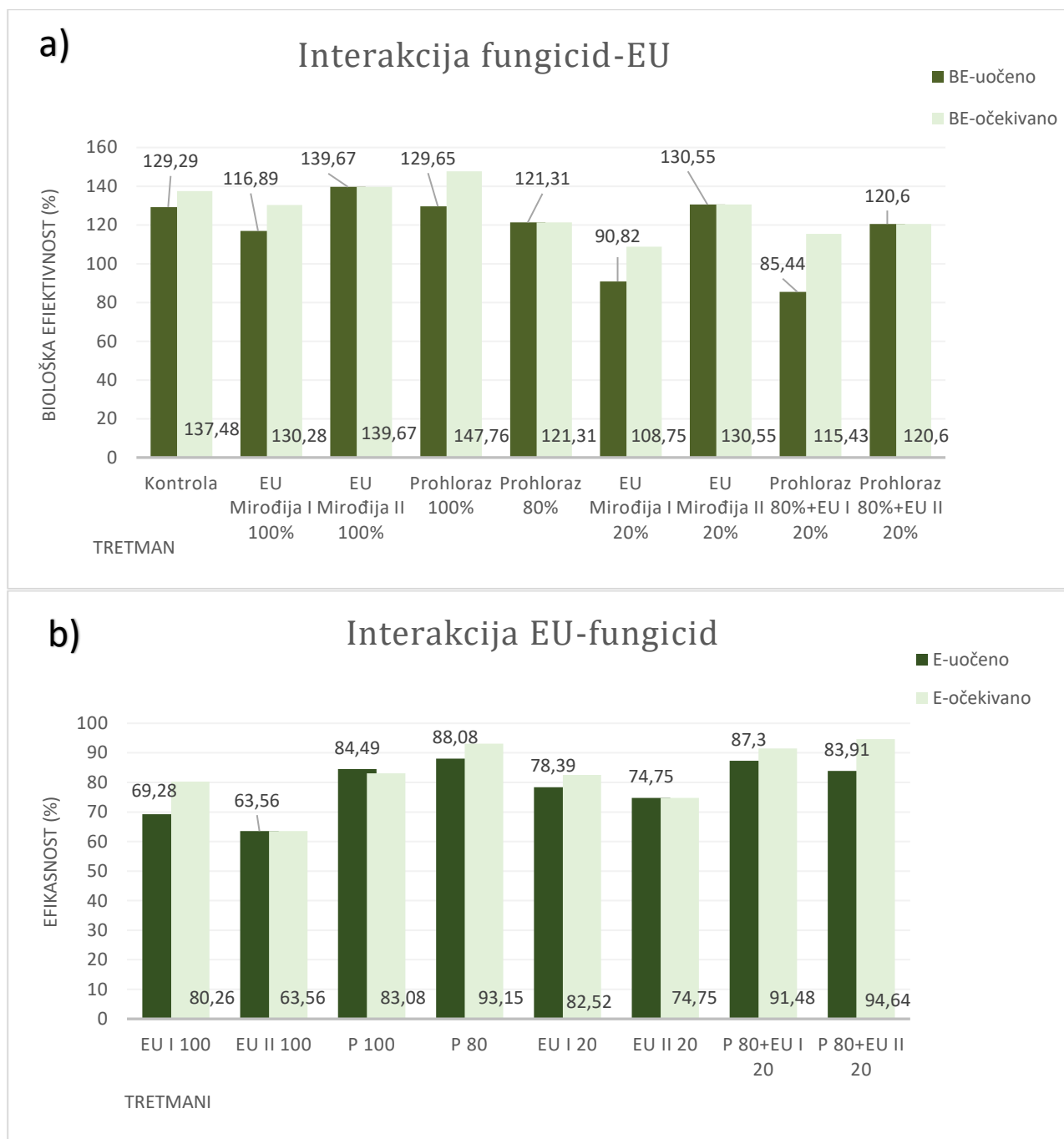


Slika P4-2. Delovanje etarskih ulja bora (a-c), jele (d-f), kleke (g-i) i tuje (j-l) prema: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. pleuroti*, *T. pleuroticola*, *T. afroharzianum* i *T. cf. harzianum* primenom mikrodilucione metode



Slika P4-3. Delovanje etarskih mirođije (a-c), hajdučke trave (d-f) i kantariona (g-i) prema: *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atrobrunneum*, *T. pleuroti*, *T. pleuroticola* i *T. guizhouense* primenom mikrodilucione metode

PRILOG 5.



¹ BE - uočeno = uočene vrednosti; BE - očekivano = očekivane vrednosti. Očekivane vrednosti: $E_e = (X+Y) - (XY)/100$, E_e – efekat aditivnog odgovora dva inhibitorna agenta, X i Y – procenat efekta izazvanog etarskim uljem mirođije i kontrolnim fungicidom

² E - uočeno = uočene vrednosti; E - očekivano = očekivane vrednosti. Očekivane vrednosti: $E_e = (X+Y) - (XY)/100$, E_e – efekat aditivnog odgovora dva inhibitorna agenta, X i Y – procenat efekta izazvanog etarskim uljem mirođije i kontrolnim fungicidom.

Grafikon P5-1. Biološka efektivnost (a) i efikasnost antifungalnih jedinjenja u suzbijanju prouzrokača zelene plesni (b)

BIOGRAFIJA

Jelena M. Luković rođena je 16. juna 1993. u Kruševcu. Osnovnu školu je završila u Rataju, a gimnaziju u Aleksandrovcu (Srednja škola „Sveti Trifun“). Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za Fitomedicinu, studijski program Biljna proizvodnja, modul Fitomedicina, upisala je školske 2012/13. godine, a završila 30. septembra 2016. godine sa opštim uspehom 9,07 (devet i 07/100). Završni rad pod naslovom „Antifungalna aktivnost etarskih ulja cimeta i karanfilića na *Cladobotryum dendroides* (Bull.) W. Gams & Hooz., prouzrokovaca paučinaste plesni šampinjona“ odbranila je sa ocenom 10. Master akademske studije, studijski program Fitomedicina, modul Fitomedicina, upisala je školske 2016/17. godine i odbranila master rad pod nazivom „Antifungalna aktivnost kombinacija odabranih etarskih ulja prema *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Samuels & W. Gams, prouzrokovacu zelene plesni šampinjona“ 28. septembra 2017. godine sa ocenom 10. Master akademske studije završila je sa prosečnom ocenom 9,50 (devet i 50/100). Eksperimentalni deo završnog i master rada uradila je u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun. Školske 2017/18. godine upisala je doktorske akademske studije na studijskom programu Poljoprivredne nauke, modul Fitomedicina na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od 1. juna 2018. godine zaposlena je na određeno vreme u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd-Zemun u Laboratoriji za primenjenu fitopatologiju, gde je tokom 2018. i 2019. godine bila angažovana na projektu TR 31043 u okviru kog je započela sa realizacijom doktorske disertacije. Ispite na doktorskim studijama položila je sa prosečnom ocenom 9,88 (devet i 88/100). U zvanje istraživač-saradnik izabrana je 28. januara 2021. godine.

U toku dosadašnjeg bavljenja istraživačkim radom i u saradnji sa drugim autorima, objavila je i saopštila 22 rada, od toga dva iz kategorije M23, osam iz kategorije M24, pet iz kategorije M34 i sedam iz kategorije M64. Član je Društva za zaštitu bilja.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Jelena Luković

Broj indeksa FM170036

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod naslovom

Antifungalno delovanje etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja na vrste roda *Trichoderma* -
patogene jestivih gljiva

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge 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 autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jelena Luković

Broj indeksa FM170036

Studijski program Poljoprivredne nauke

Naslov rada Antifungalno delovanje etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja na vrste roda *Trichoderma* – patogene jestivih gljiva

Mentori dr Ivana Vico, redovni profesor; dr Ivana Potočnik, naučni savetnik

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se podele moji lični podaci vazani za dobijanje akademskog naziva 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 autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

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

Antifungalno delovanje etarskih ulja lekovitog i aromatičnog bilja na vrste roda

Trichoderma - patogene jestivih gljiva

koja je moje autorsko delo.

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

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni do ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.