

Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi

Mila Grahovac, Dušanka Inđić, Sanja Lazić i Slavica Vuković

*Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine
Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Srbija
(mila@polj.uns.ac.rs)*

*Primljen: 29. oktobra 2009.
Prihvaćen: 2. decembra 2009.*

REZIME

Poljoprivredna proizvodnja u razvijenim zemljama podleže raznim promenama, neke su posledica zahteva potrošača a neke su etičkog značaja. Ovo se posebno odnosi na zaštitu bilja. Globalni zahtevi za smanjenje upotrebe pesticida hemijske prirode koji se smatraju štetnim za potrošača uslovljavaju razvoj novih, manje opasnih, održivih strategija u zaštiti bilja. Veliki broj hemijskih pesticida je isključen iz upotrebe (organohlorni insekticidi, metil-bromid), ili zbog potencijalnog rizika po ljudsko zdravlje, zagađenja životne sredine, efekata na neciljane organizme, ili razvoja rezistentnosti kod štetnih organizama na pomenuta jedinjenja. Nema sumnje da postoji potreba za razvojem alternativnih sistema zaštite u budućnosti i da se oni moraju implementirati kao dopuna ili zamena konvencionalnoj primeni pesticida. Osmišljena primena biopreparata u kombinaciji sa drugim merama zaštite, zadovoljila bi zahteve za proizvodnju higijenski ispravnih i zdravstveno bezbednih poljoprivrednih proizvoda i hrane uopšte. U radu su prikazani mehanizmi delovanja, oblici formulacija bioloških fungicida i mogućnosti primene, pregled biofungicida, zatim prednosti i nedostaci, kao i rizici pri proizvodnji i primeni bioloških preparata.

Ključne reči: Biopesticidi; biofungicidi; antagonisti; superparaziti; kompeticija; antibioza

UVOD

U zaštiti bilja dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava ili pesticida. Kao sintetisana jedinjenja, pesticidi su različitog hemijskog sastava, toksikoloških osobina, perzistentnosti i potencijalni su zagađivači životne sredine. Međuprodukti degradacije često su perzistentniji od polaznog jedinjenja, ostaju duže vreme u zemljištu ili vodi (podzemne vode),

što može da ima posledice i za naredne biljke u plodored (Đorđević, 2008).

Saznanja o riziku pri primeni (Šovljanski i sar., 2004, 2004a; Inđić i sar., 2006) nekih insekticida i fungicida po rukovaoca, potrošača, životnu sredinu, neuspeh pri rešavanju nekih oboljenja podzemnih i nadzemnih organa biljaka, brza pojava rezistentnih jedinki u populaciji nekih štetnih vrsta, zabrana primene sintetskih pesticida u vreme zrenja i berbe (naročito u zaštićenom

prostoru), dovela su do povećanja interesa i javnosti i struke za uvođenje alternativnih mera u zaštitu bilja, gde zasluženno mesto nalaze kako biološki preparati tako i druge nepesticidne mere.

Stvaranje nepovoljnih uslova za razvoj bolesti primenom agrotehničkih mera, primena bioloških produkata i antagonističkih organizama, superparazita, ili predatora, uvođenje kompetitorskih vrsta pojedinačno, ili integrisano sa manje rizičnim pesticidima, su tehnologije zaštite kojima se danas teži (Klokočar-Šmit i sar., 2006; Grgić, 2009).

Biopesticidi podrazumevaju primenu korisnih mikroorganizama ili produkata njihovog metabolizma, zatim primenu biljnih ekstrakata i eteričnih ulja u zaštiti bilja, odnosno oni su alternativa hemijskim, sintetičkim jedinjenjima. Produkti metabolizma pomenutih mikroorganizama su toksini, kristali, spore i antibiotici, koji štite biljke delujući antagonistički na prouzrokovaoce bolesti, štetne insekte, nematode i korove, pri čemu su bezopasni za ljude i ekološki bezbedni. Takođe, korisni mikroorganizmi proizvode vitamine, enzime i biljne hormone koji mogu delovati na imuni sistem biljaka, povećavajući njihovu otpornost.

U svetu je veliki broj zemalja i stručnjaka uključen u ovu oblast istraživanja, kako u edukaciju, tako i u komercijalizaciju biopesticida. Danas je u svetu prema podacima Đorđevića (2008), registrovano 185 biopesticidnih preparata, od kojih su 72 aktivne materije bakterije, 47 gljive, 40 entomopatogene nematode, 24 virusi i dve protozoe. Primenuju se na različitim biljnim vrstama – povrću, voću, žitaricama, krmnom bilju i drugim gajenim vrstama. Podela biopesticida izvršena je prema vrsti organizama koje suzbijaju, na: bioinsekticide, biofungicide, bioherbicide i druge, ili se mogu razvrstati prema grupama živih organizama (gljive, virusi, bakterije, nematode), koji su u funkciji aktivne materije biopreparata. Kako navodi Rekanović (2009), u svetu su vrlo značajna istraživanja usmerena u pravcu biološkog suzbijanja *Phytophthora infestans* koja se uglavnom zasnivaju na primeni bakterija *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Lactobacillus plantarum* i gljiva *Mucor spinosus*, *Pythium oligandrum* i *Trichoderma harzianum* koje ispoljavaju antagonističko delovanje.

Postoji veći broj bioloških agenasa za zaštitu bilja koji su dostupni na tržištu. Kako navodi Lainsbury (2009), trenutno u Ujedinjenom Kraljevstvu registrovani biofungicidi su na bazi tri aktivne materije: *Coniothyrium minitans*, *Candida oleophila* i *Peniophora gigantea*. U susednoj Mađarskoj biofungicidi su na bazi *C. minitans*, *Streptomyces griseoviridis* i *Trichoderma harzia-*

num (Ocsko i sar., 2008). U Hrvatskoj je registrovano više biofungicidnih preparata na bazi *T. harzianum* (Trichodex WP) i *Aerobasidium pullulans* (Blossom protect, Boni protect i Botector) (Maceljiski, 2005; Lučić, 2009). Kod nas su registrovana dva, na bazi *Bacillus subtilis* (F-Stop) i *Pythium oligandrum* (Polyversum) (Sekulić i Savčić-Petrić, 2009). Međutim, našim proizvođačima se nudi i biofungicid na bazi *Trichoderma asperellum* (Trifender), namenjen za dezinfekciju supstrata u rasadnicima, plasticima i staklenicima radi suzbijanja fitopatogenih vrsta iz rodova *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Fusarium* i *Sclerotinia* (Anonymous, 2009).

BIOLOŠKI FUNGICIDI – BIOFUNGICIDI

Biofungicidi mogu biti na bazi korisnih gljiva, bakterija, kvasaca, koji infestiraju i kontrolišu razvoj biljnih patogena (Anonymous 9), zatim na bazi eteričnih ulja ili biljnih ekstrakata. Sposobnost biofungicida da zaštiti domaćina od patogena, održi se na različitim biljkama u različitim uslovima, osnov je njihovog komercijalnog uspeha (Klokočar-Šmit i sar., 2006).

Mehanizmi delovanja biofungicida

Razlikuju se sledeći mehanizmi delovanja biofungicida:

- direktna kompeticija;
- antibioza;
- predatorstvo ili parazitizam;
- indukovana (izazvana) otpornost biljke domaćina.

Direktna kompeticija podrazumeva da se koren biljke domaćina (rizosfera) mora naseliti organizmom koji se primenjuje za biološko suzbijanje prouzrokovaoce bolesti ili Biological Control Organism (BCO) pre nego što dođe do infekcije patogenom. Rizosfera je izvor hranljivih materija. Generalno, organizam koji se primenjuje u biološkoj kontroli mora biti prisutan u velikom broju radi kompeticije sa patogenom. Biološki agens proizvodi toksin koji usporava rast patogena (antibioza). BCO treba da poseduje antibiotska i antagonistička svojstva. Ukoliko patogen proдре u koren, moguće je da izostane efekat antibioze. Predatorstvo ili parazitizam podrazumeva da organizam koji se primenjuje za biološku kontrolu napada patogeni organizam i njime se hrani. Pri ovakvom mehanizmu delovanja, biološki agens mora biti prisutan pre napada patogena. Indukovana otpornost se javlja kada se u napad-

nutoj biljci aktivira odbrambeni sistem i to ne imuni, već unutrašnja borba za usporavanje infekcije. Biljke domaćini se namerno inokulišu radi izazivanja ovog tipa otpornosti. Biološki fungicid je okidač za pojavu ovog tipa otpornosti (Anonymous 9).

Biološka aktivnost biofungicida može biti zasnovana na produkciji brojnih metabolita koji deluju antifungalno i antibakterijski. Na primer, *B. subtilis* se u svetu koristi za pripremu brojnih preparata. Produkuje antibiotike (bacilysin i fengymycin, dificidin i oxydificidin, bacitracin, bacilin i balilomycin b i iturin) koji deluju na mnoge vrste aerobnih i anaerobnih bakterija. Produkti metabolizma, lipopeptidi, deluju na različite komponente ćelijskog zida, sprečavaju prijanjanje patogena na biljne organe, a enzim subtilin ometa razvoj patogena (Klokočar-Šmit i sar., 2003).

Formulacije biopreparata i mogućnosti primene

Formulacija bioloških preparata zahteva veoma dobro poznavanje interakcije mikroorganizama i objekta suzbijanja. Osnovno je da se preparati mogu proizvoditi na tečnom ili polučvrstom supstratu i u dovoljnim količinama, zatim da ostaju vitalni tokom čuvanja i posle primene preparata, da pod selekcionim pritiskom u laboratorijskim uslovima ne izgube osobine važne za biološko suzbijanje (vitalnost, varijabilnost, selektivnost), kao i kompatibilnost sa tehnologijom primene. Ovo se prevazilazi korišćenjem aduvanata, hranljivih i vezivnih materija ili stikera i nosača kao većeg dela u formulaciji. Primenuju se u obliku polunativne kulture, ili formulisani u obliku prašiva, kvašljivog praška, vodotopivih granula, granula, peleta, mikrokapsula, gela i emulgjućih tečnosti. Kratak rok čuvanja biopreparata prevazilazi se inkapsulacijom mikroorganizama, ili njihovih produkata, u matrice organskih polimera. Biopreparati mogu da sadrže jedan ili više mikroorganizama kao aktivnih materija. Preparat Polyversum je na bazi *Pythium oligandrum*, a Trichoshield na bazi *Trichoderma harzianum* + *T. lignorum* + *Gliocladium virens* + *Bacillus subtilis* (Klokočar-Šmit i sar., 2006).

Za razliku od hemijskih, sintetizovanih fungicida, sadržaj aktivne materije u preparatu biofungicida, prema Anonymousu (3) i Tomlinu (2006) izražava se u milionima ili milijardama živih ćelija i spora/g (*B. subtilis* izolati 24 i 26), ili $2,5\text{--}5 \times 10^{10}$ ćelija/ml (*Pseudomonas fluorescens* izolati 7G, 7G2K, 17-2), ili 5 milijardi spora/g (*Penicillium vermikulatum*).

Biofungicidi se primenjuju: za tretiranje semena, krotla krompira pred sadnju ili pre skladištenja, folijarno, za potapanje ili prskanje rasada pre sadnje, zalivanjem biljaka posle rasađivanja, zalivanjem biljaka, potapanjem kalema.

Prema rezultatima istraživanja u Izraelu korišćene su i pčele u primeni biofungicida na bazi *T. harzianum* u suzbijanju *Botrytis cinerea* na jagodama. Pčele pri izlasku iz košnice prelaze preko inokuluma i tako ga raznose na cvetove jagoda. Ideja za ovakav način primene proistekla je iz glavnog problema u suzbijanju sive plesnivosti pomoću *T. harzianum*, a to je distribucija ovog antagonista tako, da u najvećoj meri zahvati cvet i plod jagode, jer su oni upravo i meta napada sive plesni. Zatim, aplikacija ovog i sličnih biofungicida mora biti vrlo česta da bi se obezbedila zadovoljavajuća biomasa gljive antagonista i zaštitili cvetovi i plodovi. Pomenuti način primene u uslovima slabijeg i srednjeg napada smanjio je zarazu sivom plesni u okolini košnice u većoj meri nego korišćeni hemijski fungicidi, ali u uslovima jakog napada sive plesni, ova mera nije obezbedila zadovoljavajuću zaštitu jagoda (Sharoni i sar., 2006; Ivić, 2007).

Moguće su i kombinacije tri sukcesivne mere: termičko tretiranje semena, zatim nanošenje stimulatora rasta (*Azospirillum brasilense*) i tretiranje streptomycin-sulfatom kojima se postiže povećana efikasnost, na primer bolje suzbijanje prouzrokovala bakterijske pegavosti paradajza (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) (Bashan i Bashan, 2002).

Maksimalno dozvoljen broj tretiranja biofungicidima je normiran za svaku biljnu vrstu, najveći je za vinovu lozu, osam puta (Anonymous 3). Broj gajenih biljaka koje se štite biofungicidima je prilično veliki, od ratarskih, povrtarskih, u voćarstvu, ukrasnom, lekovitom i začinskom bilju.

PREGLED BIOFUNGICIDA

Biofungicidi na bazi gljiva

Ampelomyces quisqualis izolat M-10 je aktivna materija u preparatu AQ10, koji je formulisan kao vodotopive granule (WG) i sadrži 5×10^9 spora/g. Rok trajanja preparata je duži od šest meseci kada se čuva na hladnom i suvom mestu, a preko tri godine u frižideru.

Gljiva *A. quisqualis* je vrsta iz reda *Coleomycetes*, podreda *Deuteromycotina*, nekada zvanih *Cicinnobolium cesatii* koje su 1959. godine preimenovane u sadašnji naziv *A. quisqualis*. Ova gljiva je dobro poznata kao hi-

perparazit roda *Erysiphaceae* – patogenih gljiva, prouzrokovaca pepelnice. Izolat *A. quinquale* M-10 je pronađen 1984. godine u sušnoj zoni Izraela. Razvio ga je Ecogen Israel Partnership iz Jerusalima i uveden je u primenu 1995. godine.

Mehanizam delovanja se zasniva na hiperparazitizmu, to jest ključne spore potiskuju razvoj pepelnice. Ovaj proces zahteva relativnu vlažnost od minimum 60% u mikro sredini ključajućih spora. Kada prodre u hife patogena, posle 2-4h, hiperparazit se razvija nezavisno od uslova spoljašnje sredine. Krajnji rezultat je prekid razvoja pepelnice.

Preparat na bazi gljive hiperparazita primenjuje se u suzbijanju pepelnice na jabučastom voću, tikvama, vinovoj lozi, ukrasnom bilju, jagodama i paradajzu. *A. quinquale* hiperparazitira sve vrste pepelnice. Primenuje se i u programima integralne zaštite za suzbijanje plamenjača. Uglavnom se primenjuje klasičnom tehnikom prskanja uz dodatak okvašivača koji su kompatibilni sa životnom sposobnošću ovog organizma. Nije fitotoksičan niti fitopatogen. Može se primenjivati sa komercijalnim biološkim insekticidima na bazi *Bacillus thuringiensis*, ali se ne sme mešati sa sistemčnim fungicidima inhibitorima sinteze sterola.

Aktivna materija preparata AQ10 podleže testu ključivosti i testu hiperparazitizma kako bi se utvrdila životna sposobnost spora i produktivnost. U testu ključivosti spore se zasejavaju na hranljivi agar, inkubacija traje 24h posle čega one počinju da ključaju. Procenat ključivosti spora oslikava njihovu životnu sposobnost unutar bilo koje populacije. Hiperparazitizam se određuje na osnovu testova (*in situ*) prskanjem biljaka krastavca zaraženih pepelnicom suspenzijom spora AQ10. Posle 10 dana inkubacije u plasteniku dolazi do pojave makroskopskih simptoma hiperparazitizma koji se ocenjuju različitim kvantitativnim parametrima (Tomlin, 2006).

***Coniothyrium minitans* soj CON/M/91-08**, odnosno spore pomenute gljive su aktivna materija preparata Contans, formulisan kao WG. Proizvodi se fermentacijom i u čvrstom je stanju, tamno braon boje, mirisa koji podseća na pečurke. Stabilan je preko šest meseci na 4°C, ne treba ga čuvati u vlažnim uslovima ili na temperaturi preko 20°C. Prvi put je proizveden u Nemačkoj 1998. godine.

C. minitans napada sklerocije gljive *Sclerotinia* sp. u zemljištu i uništava ih. Infekcija sklerocija nastaje ključanjem spora *C. minitans* koje prodiru u unutrašnjost preko pigmentisanih ćelija sa spoljne strane sklerocija ili kroz postojeće pukotine na površini. Rast se nastavlja inter- ili intracelularno kroz nepigmentisana unutrašnja

tkiva korteksa i srži sklerocije. Penetracija u ćelije podrazumeva kako enzimsku degradaciju tako i pritisak i može se pojaviti u svim tkivima sklerocije. U napadnutim ćelijama u središnjem delu dolazi do plazmolize i agregacije, te do postepene degradacije ćelijskih zidova. Ovo može obuhvatiti i produkciju hitinaze i β -1,3-glukanaze. Hife *C. minitans* često liziraju ćelije sa spoljne strane. Posledično, dolazi do proliferacije hifa ovog mikoparazita unutar sklerocija i za manje od 14 dana u idealnim uslovima piknidi se stvaraju u unutrašnjosti i na površini sklerocija. Primenuje se za suzbijanje *S. sclerotiorum* i *S. minor* u svim usevima koje ovi patogeni napadaju (repa, soja, suncokret, duvan, povrće, voće, ukrasne, lekovite i začinske biljke). Primenuje se preko zemljišta pre setve (2-8 kg/ha) ili posle žetve (1-2 kg/ha). *C. minitans* ne produkuje toksine ili sekundarne metabolite koji su od toksikološkog značaja, nalazi se u prirodi a gustina populacije zavisi od uslova sredine. Prema tome, povećanje gustine populacije kao posledica tretiranja, prolaznog je karaktera (Tomlin, 2006).

Preparat Koni WG na bazi *C. minitans* formulisan kao vodotopive granule, primenuje se u integralnoj proizvodnji, u zaštiti povrća, suncokreta, uljane repice i soje za kontrolu *S. sclerotiorum* i *S. minor* (Ocsko i sar., 2008).

Prema Lainsbury (2009), tretiranje preparatom na bazi *C. minitans* se vrši tri meseca pre redovne zaštite od bolesti kako bi se obezbedilo vreme da se smanji broj infektivnih sklerocija u zemljištu. Tretiranje zemljišta i žetvenih ostataka nakon žetve, sprečava dalju kontaminaciju zemljišta sklerocijama koje su formirane na prethodnom usevu. Za postizanje što boljih efekata, zemljište treba da bude vlažno a temperatura 12-20°C. Preparat se inkorporira u površinski sloj zemljišta na dubini od 10 cm. Ukoliko je temperatura zemljišta ispod 0°C ili preko 27°C, fungicidno dejstvo se zaustavlja, ali se aktivira kada se temperatura vrati između navedenih raspona.

***Candida oleophila* izolat I-182** je aktivna materija biofungicida koji se koristi u kontroli truleži i plesni inhibirajući rast štetnih gljiva kada se primeni posle žetve (berbe) ili koloniziranjem plodova i drugih biljnih površina, naročito oštećenih tkiva *C. oleophila*, a može se primeniti na voću, povrću, na biljkama u zaštićenom prostoru i na ukrasnom bilju. Primena ove gljive nema štetnih efekata jer se primenuje prvenstveno u zaštićenom prostoru, a istraživanja pokazuju da nije toksična ili patogena za životinje. Primenuje se prskanjem ili potapanjem. Ponekad se hemijski fungicid do-

daje u gljivičnu smešu kako bi se pojačao fungicidni efekat (Anonymous 7).

Preparat Aspire na bazi gljive *C. oleophila* primenjuje se na plodovima citrusa i jabučastog voća u skladištima. Kompeticija za hranljive materije i prostor se smatra glavnim mehanizmom delovanja ovog antagonista. Međutim, moguća je i sekrecija različitih enzima za razgradnju ćelijskog zida gljiva kao što su: α -1,3-glukanaze, hitinaze i proteaze (Bar-Shimon i sar., 2004).

Trichoderma sp. su gljive koje su prisutne u gotovo svim poljoprivrednim zemljištima i drugim sredinama, kao što je trulo drvo i sl. Antigljivične sposobnosti ovih mikroorganizama su poznate još od 1930. godine i od tada se veliki naponi ulažu za njihovo uvođenje kao biofungicida u zaštitu bilja. Ove gljive rastu trofički prema hifama drugih gljiva, obavijaju se oko njih posredstvom lecitina, razgrađuju ćelijski zid ciljnog gljivičnog organizma sekrecijom različitih litičkih enzima. Pomenuti proces (mikoparazitizam) ograničava rast i aktivnost fitopatogenih gljiva. U suštini, ne zna se da li se pozitivna svojstva *Trichoderma* sp. ogledaju u tome što one direktno napadaju i kontrolišu gljive – prozrokovaoče bolesti, kao što se dugo verovalo, ili zato što imaju direktan efekat na biljke. Novija istraživanja ukazuju da su razvoj biljaka, kao i biohemijski procesi u njima pod uticajem sojeva *Trichoderma* sp. Specifični sojevi gljiva iz roda *Trichoderma* koloniziraju i prodiru u tkiva korena biljaka i izazivaju niz morfoloških i biohemijskih promena na biljci, koje se jednim delom smatraju odbrambenim mehanizmom biljaka, koje na kraju dovode do pojave indukovane sistemne otpornosti (ISR) čitave biljke. Sposobnost *Trichoderma harzianum* da izazove pojačan porast biljaka je potvrđena kako u ogledima u plastenicima tako i u hidroponskim sistemima. Ustanovljeno je povećanje porasta klijanja za 30% i korenovog sistema ovih biljaka za 95%. U biljkama inokulisanim gljivama iz roda *Trichoderma* utvrđeno je i povećanje koncentracije fosfora i gvožđa (Chet i sar., 2006).

Preparat Trichodex WP na bazi *T. harzianum* registrovan je u susjednoj Mađarskoj, nalazi se na žutoj listi pesticida i primenjuje se kao sredstvo za biološku kontrolu u integralnoj zaštiti povrća (Ocsko i sar., 2008).

Kako navodi Lučić (2009), *T. harzianum* je kontaktni antibiotski fungicid niske toksičnosti za čoveka, korisne insekte i životnu sredinu, prikladan za ekološku zaštitu u vinogradima, voćnjacima, povrtnjacima, tarstvu i uzgoju ukrasnog bilja.

Trichoderma sp. je do sada pokazala visoku efikasnost u suzbijanju svake patogene gljive za čiju je kontrolu primenjena. Ipak, neki sojevi su visokoefikasni za određene patogene gljive, dok za druge mogu biti potpuno bez efekta. Skorašnje otkriće da ove gljive aktiviraju odbrambeni mehanizam biljaka govori u prilog tome da se sojevi *Trichoderma* sp. mogu primenjivati i u kontroli drugih patogena, ne samo gljiva (Anonymous 10). U Hrvatskoj je registrovan za suzbijanje gljive *Botrytis cinerea* na vinovoj lozi i jagodama (Maceljski, 2005; Lučić, 2009). Kako navodi Thomas (2004), preparat Plantshield na bazi *T. harzianum* (izolat T-22) primenjuje se i u Virdžiniji za suzbijanje *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp. i *Thielaviopsis* sp. u rasadnicima drvenastih biljaka, pri kalemljenju, na ukrasnim biljkama, kupusnjačama, paradajzu i krastavcima.

Prema Klokočar-Šmit i sar. (2008), u *in vitro* ogledima, vrsta *Trichoderma asperellum* ispoljila je slabiju antagonističku aktivnost, odnosno sporiju inhibiciju spora fitopatogene gljive *F. proliferatum*, dok je prema *F. solani* pokazala izraženo antagonističko dejstvo.

U uslovima laboratorije, rasadniku i polju, proučavan je odnos antagonista *T. lignorum* i patogena – prozrokovaoča crne truleži korena duvana *Thielaviopsis basicola* (ШаиниДзе, 2008). Kultura *T. lignorum* izolovana je iz rizosfere duvana, a *T. basicola* iz obolelog korena. Antagonistički efekat je određen: a) pri istovremenoj primeni antagonista i patogena; b) antagonist primenjen pre patogena; c) patogen unet pre antagonista. Antagonist je u petri-kutiji unet tri dana posle zasejavanja patogena i postepeno je ograničavao porast fitopatogene gljive i posle 11 dana zauzeo celu površinu. Pri istovremenom zasejavanju *T. basicola* i *T. lignorum* i u varijanti gde je prvo bio zasejan antagonist, a posle četiri dana patogen, na površini ispitivane hranljive podloge nalazila se samo micelija antagonista. Mikroskopiranjem, pri istovremenom zasejavanju, hife antagonista obavijale su hife parazita izazivajući lizis. U rasadniku i u polju, u varijanti gde je prvo unet patogen a posle sedam dana antagonist, procenat zaraženih biljaka je bio 13,5 i 9,6% respektivno, pri istovremenom unošenju antagonista i patogena 10,8 i 8,2% obolelih biljaka, a pri unošenju prvo antagonista pa patogena 6,2 i 4,8% obolelih biljaka, a u kontroli 3 i 17% obolelih biljaka. Antagonist je značajno ograničio razvoj crne korenove truleži duvana, posebno pri blagovremenom unošenju. Bolji rezultati se ostvaruju pri unošenju antagonista pre patogena, povećava se prinos rasada duvana i efikasnost u rasadniku za 29,6%, a u polju 18,2%, to jest za svaku

utrošenu novčanu jedinicu izračunata dobit u rasadniku je 7,1, a u polju 4,8 jedinica.

Neke *Trichoderma* sp. poseduju prirodnu otpornost na većinu pesticida, uključujući i fungicide, mada se sojevi razlikuju po osetljivosti. Većina proizvođača sojeva *Trichoderma* za biološku kontrolu, poseduju podatke o stepenu osetljivosti na pesticide (Anonymous 10).

Momaerts i sar. (2008) navode da primena bumbara kao polinatora u poljoprivredi, koja je poslednjih godina sve više zastupljena, iziskuje potrebu da se ispita potencijalni rizik primene bioloških agenasa na bumbar. Isti autori sprovedli su studiju u kojoj je ispitan uticaj dva biofungicida na bazi *Trichoderma* na vrstu *Bombus terrestris*. Ispitivani preparati (Binab-TF-WP i Binab-TF-WP-Konc) sadrže kombinaciju bioagenasa *Trichoderma harzianum* ATCC20476 i *Trichoderma polysporum* ATCC20475. Bumbari su izloženi delovanju bioloških agenasa u maksimalno propisanim količinama za primenu u polju i laboratorijskim uslovima – dermalno, pijenjem tretirane zaslađene vode i preko tretiranog polena. Efekti su ocenjeni preko mortaliteta radilica i bilo kakvih efekata na trutove. Rezultati dobijeni u laboratorijskim uslovima pokazali su da su dva navedena proizvoda pogodna za primenu pomoću bumbara – polinatora, budući da nisu izazvali nikakve entomopatogene efekte.

U višegodišnjim istraživanjima (1980-2005), Жалиева (2008) iznosi podatke o izmeni patokompleksa, prouzrokovala truleži žitarica, pogotovo u zadnjih 10 godina, i o profilaktici oboljenja primenom preparata na bazi mikroorganizama – antagonista (bakterije i gljive) koji žive u rizosferi ili na korenu biljaka. Dugom selekcijom izdvojene su vrste roda *Trichoderma* koje dobro preživljavaju u rizosferi ili na korenu, bezopasne su za čoveka i životinje, poboljšavaju plodnost zemljišta, štite biljke od patogena i sposobne su za samoregulaciju u agrocenozi. Preparat Trihodermin (*T. harzianum*) nanet na seme ozime pšenice, pri razvoju truleži 29,7-57,4% (trogodišnji period), pri primeni 10 kg/t semena, ostvario je efikasnost u proseku 37,7%, a pri primeni 20 kg/t semena 53,9%. Tretiranjem semena i folijarnom primenom, preparat je redukovao razvoj patogena za 57,2%, što nije ostvareno ni sa 3 kg/t Benlate. Primenom biopreparata jednom u vegetaciji smanjen je razvoj truleži za 41,1%. Tokom perioda 1994-1996. godine ispitivano je više biofungicida (Planriz, Pseudobakterin-2, Alirin-B, Trihodermin, Vermikulon, Hetomin) za tretiranje semena pšenice. Efikasnost preparata za prouzrokovala truleži po godinama zavisila je od prisutnih vrsta patogena i klimatskih uslova,

a stabilnija je pri primeni Trihodermina (E=55,6%). Konstatovani su i sporedni efekti *T. harzianum* na rast ozime pšenice i bokorenje, koje je u odnosu na kontrolu povećano za 11%, ubrzan je razvoj (u kontroli je faza razvoja 11, a u tretmanu 43% biljaka je u fazi 13). Tokom 1996. i 1997. godine proučen je uticaj *T. harzianum*, *T. lignorum* i *T. viride* na sniženje razvoja truleži (fuzarioza, helmintosporioza) na ozimoj (E=55,5, 58, 50,9%) i jaroj pšenici (50, 45,5, 47,4% respektivno). Tokom perioda 1998-2000. godine proučen je sadržaj gljiva roda *Trichoderma* u rizosferi ozime pšenice posle primene bioloških i hemijskih fungicida. Preparat Planriz (*T. harzianum*) povećao je sadržaj gljiva u rizosferi, ostali biopreparati nisu, dok je Raxil SP izrazito smanjio brojnost *Trichoderma* sp. U periodu 2004-2005. određena je efikasnost preparata Mikol-C i Mikol-B (*T. asperellum*) u količini 1 l/t za ozimu pšenicu. U fazi bokorenja na dve ispitivane sorte, u kontroli u patokompleksu najzastupljenije su *Fusarium* sp. (34,5 i 57%). Pomenutim preparatima trulež je smanjena za 70-72%.

***Pythium oligandrum* izolat DV 74 (028816)** je aktivna materija preparata Polyversum. Ova gljiva deluje kao hiperparazit kolonizirajući druge fitopatogene gljive na semenu i u okolini, rizosferi tretiranih biljaka, potiskujući porast najmanje 20 zemljišnih patogenih gljiva (Anonymous 6).

Prvi put je opisana 1930. godine kao prouzrokovala truleži korena graška. Međutim, u kasnijim istraživanjima je otkriveno da se *P. oligandrum* u prirodi često javlja zajedno sa poznatim patogenima biljaka, *P. debaryanum* i *P. ultimum*, za koje je potvrđeno da su glavni uzročnici truleži semena i propadanja klijanaca. Ta činjenica je ukazala na mogućnost da *P. oligandrum* nije parazit biljaka već da je mogući mikopatogen. Na osnovu brojnih ispitivanja utvrđeno je da ova gljiva parazitira preko 23 vrste patogenih gljiva, među kojima su *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium albo-atrum* i *V. dahliae* (Filajdić i sar., 2006), kao i patogene iz rodova *Alternaria*, *Gaeumannomyces*, *Ophiostoma* i *Pseudocercospora* (Anonymous 6).

Mehanizam delovanja se ostvaruje na dva načina: a) aktivno – direktno parazitiranje i b) pasivno – indukovanje stvaranja morfoloških i fizioloških barijera u biljnom tkivu i stimulacija rasta biljaka putem povećanog usvajanja fosfora (Filajdić i sar., 2006). *P. oligandrum* proizvodi istoimeni protein oligandrin i druge supstance koje stimulišu ćelijske zidove biljaka da se odbrane od invazije patogena a takođe i prirodne odbrambene mehanizme biljaka (Anonymous 6).

Primenjuje se u usevu paprika za suzbijanje *V. dahliae* (Mijatović i sar., 2003; Rekanović i sar., 2004; Rekanović, 2005), zasadu vinove loze za suzbijanje *B. cinerea* i *Phomopsis viticola* (Filajdić i sar., 2003; Miletić i sar., 2003; Latinović i sar., 2005), maline za suzbijanje *B. cinerea* (Tanović i sar., 2005), usevu uljane repice za suzbijanje *Alternaria brassicae*, *B. cinerea*, *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) i *Sclerotinia sclerotiorum* (Anonymous 5).

Preparat Polyversum je kod nas registrovan za kontrolu prouzrokovaca sive truleži u vinovoj lozi i u zasadu maline (Sekulić i Savčić-Petrić, 2009).

Preparat se primenjuje bez toksikoloških i ekotoksikoloških ograničenja (Filajdić i sar., 2006), a u literaturnim podacima se navodi da *P. oligandrum* ne parazitira nijedan drugi osim ciljnih organizama (Anonymous 6).

***Aureobasidium pullulans* DSM 14940 i 14941** je kvasna gljiva koja se razvija na lišću drveća i u močvarama slane vode. Ima više životnih formi (polimorfna je): blastospore, hife, hlamidospore i uvećane ćelije (swollen cells). Uvećane ćelije i hlamidospore se smatraju formama za održavanje ili prezimljavanje. Produkuje zeleni melanin koji vremenom pocrni. Takođe, produkuje i polisaharid pululan. Utvrđeno je da kod ljudi može prouzrokovati upalu pluća i astmu (Anonymous 2).

U Hrvatskoj je registrovana za suzbijanje prouzrokovaca bakteriozne plamenjače *Erwinia amylovora*, prouzrokovaca sive truleži *B. cinerea*, meke truleži ploda *Penicillium expansum* i truleži plodova voća *Monilia fructigena* na jabuci, krušci i dunji (Lučić, 2009).

Rezultati studije saopštene u Italiji govore u prilog visoke efikasnosti *A. pullulans* (LS 30 – izolovan iz jabuke) u suzbijanju prouzrokovaca bolesti na uskladištenom voću. Prema navodima Lima i sar. (1999) *A. pullulans* je ispoljila visoko antagonističko dejstvo prema fitopatogenim gljivama *Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *P. expansum*, *P. italicum* i *P. digitatum* na plodovima jabuka, krušaka, jagoda, kivija, vinove loze, pomorandže, mandarine i grejpfruta.

Biofungicidi na bazi kvasaca

***Rhodotorula glutinis* (izolat LS-11)**, *Cryptococcus laurentii* (izolat LS-28), *Candida famata* (izolat 21-D) i *Pichia guilliermondii* (izolat 29-A) navode se kao vrlo efikasni antagonisti fitopatogenih gljiva (*Aspergillus niger*, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *P. expansum*, *P. italicum* i *P. digitatum*) na plodovima jabuka, krušaka, ja-

goda, kivija, grožđa, pomorandži, mandarina i grejpfruta (Lima i sar., 1999).

Od preko 200 vrsta kvasaca izolovanih sa površine različitih plodova, 50 je testirano za kontrolu fitopatogene gljive *Penicillium expansum* na jabuci. Izolati *R. glutinis* LS-11 i *C. laurentii* LS-28 su ispoljili najizraženiji antagonizam prema pomenutom patogenu. Aktivnost ovih antagonista je dalje testirana na plodovima jabuke, kruške, jagode, kivija i grožđa u kontroli nekoliko najznačajnijih skladišnih patogena (*B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* i *A. niger*). Antagonisti *R. glutinis* i *C. laurentii* su pokazali širok spektar aktivnosti u kontroli navedenih patogena, s tim što je izolat LS-28 ispoljio veću i stabilniju aktivnost od izolata LS-11. Takođe, isti antagonisti su testirani na oštećenim i neoštećenim plodovima jabuke, pri čemu je u oštećenim tkivima izolat LS-28 postigao veću gustinu kolonije u odnosu na izolat LS-11, ali je imao manju sposobnost kolonizovanja neoštećenih plodova. U *in vitro* ogledima, oba antagonista su pokazala slabu osetljivost na nekoliko fungicida koji se često primenjuju na voću i povrću (Lima i sar., 1998).

Budući da su dva pomenuta izolata ispoljila različite nivoe antagonističke aktivnosti u kontroli više patogena na uskladištenim proizvodima, ispitani su mehanizmi delovanja. Kompeticija za hranljive materije imala je najznačajniju ulogu u aktivnosti oba kvasca, naročito izolata LS-11. Direktna interakcija sa hifama patogena utvrđena je samo kod izolata LS-11, dok kod aktivnijeg izolata LS-28, ovakva pojava nije registrovana. U odnosu na LS-11, izolat LS-28 je *in vitro* proizvodivao značajno više ekstracelularne β 1,3-glukanaze, kada je uzgajan u prisustvu hifa patogena *P. expansum* i *B. cinerea*. Antibioza nije bila registrovana (Marusich i sar., 1997).

Biofungicidi na bazi bakterija

***Streptomyces griseoviridis* izolat K 61** je bakterija koja se javlja u zemljištu, a izolovana je u Finskoj. Deluje na patogene gljive prouzrokovace biljnih bolesti, na najmanje dva načina, kolonizovanjem korena biljaka pre pojave patogenih gljiva, lišavajući ih prostora, a takođe i materija za ishranu. Bakterija produkuje nekoliko supstanci koje nepovoljno utiču na patogene gljive. Primenjuje se u kontroli gljiva prouzrokovaca truleži semena, korena, stabljike i uvenuća u različitim ratarskim, povrtarskim usevima, voćnjacima i ukrasnom bilju u plastenicima. Može se primenjivati preko semena, zemljišta, potapanjem rasada i biljnih delova pri kalemlje-

nju i folijarno. Deluje preventivno, odnosno pre nego što patogene gljive dostignu prag štetnosti. Po dosadašnjim rezultatima, *S. griseoviridis* izolat K61 nije patogen za čoveka niti deluje štetno ukoliko se unese u organizam. Međutim, prilikom primene može doći do blage iritacije kože ili očiju, kao i do sporednih efekata na plućima. Stoga radnici koji primenjuju ovaj biofungicid moraju nositi zaštitnu opremu, uključujući i respirator koji filtrira prašinu i finu maglu. Ne deluje štetno na ne ciljane organizme ni na životnu sredinu (Anonymous 8). Prema Tomlinu (2006), pomenuta vrsta primenjuje se za kontrolu *Fusarium* i drugih patogena. U Mađarskoj je registrovan preparat Mycostop (40% *S. griseoviridis*) namenjen biološkoj borbi u integralnoj zaštiti bilja (Ocsko i sar., 2008). Mycostop je namenjen za kontrolu patogena *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. i *Botrytis* sp. u povrću, ukrasnom i začinskom bilju. U proizvodnji sadnica primenjuje se u količini 2-10 g/100m², u plasteničkoj proizvodnji krastavca, paradajza, paprike i ukrasnog bilja 2-5 g/100 m², a za tretiranje semena 0,4-0,8 g/100 g semena. U zatvorenom pakovanju pomenuti preparat zadržava aktivnost do 12 meseci (Anonymous 11).

***Bacillus subtilis* Cohn; var. *amyloliquefaciens* izolati GB03 (Gustafson); FZB24 (Taensa/Earth BioSciences); QST713 (AgraQuest); MBI600 (Becker Underwood).** Preparat na bazi ove bakterije prvi put je proizveo Becker Underwood 1994. godine. Formulisan je kao WP, WG i formulacija za tretiranje semena. Mehanizam delovanja zasnovan je na kolonizaciji korena biljke bakterijom i kompeticiji sa patogenim organizmima. Izolat QST713 proizvodi lipopeptide koji ispoljavaju fungicidni efekat. Primenjuje se za tretiranje semena pamuka, leguminoza i drugih vrsta u kontroli *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. Takođe se primenjuje i folijarno u kontroli *B. cinerea* na plavom patlidžanu, paradajzu i jagodama i *Sphaerotheca aphana* na jagodama. Poznati preparati su: Botokiller, Subtilex i System 3 (*B. subtilis* + metalaxyl + quintozene) (Tomlin, 2006).

B. subtilis GB03 se primenjuje kao fungicid na ukrasnim biljkama i njihovim semenima, kao i na semenu pamuka, povrća, kikirikija, soje, ječma, graška, pšenice i pasulja. Pomenuta bakterija kolonizuje korenov sistem biljke i na taj način stupa u kompeticijske odnose sa fitopatogenim gljivama kao što su *Rhizoctonia*, *Fusarium* i *Aspergillus*. Bakterija nastavlja da živi na korenovom sistemu i obezbeđuje zaštitu od patogena tokom cele vegetacije. Budući da *B. subtilis* formira spore, fungicidi na bazi ove bakterije su stabilni, dakle na tretira-

nom semenu čiji je period skladištenja produžen, ostaje živa, a nakon setve raste i umnožava se. Primena ovog fungicida nema negativan uticaj na čoveka i na životnu sredinu. Preparati na bazi ove aktivne materije mogu se primenjivati za tretiranje semena: a) mešanjem fungicida na bazi *B. subtilis* sa semenom u boksu sejalice neposredno pre setve, ili, b) pripremanjem mešavine preparata i semena uz dodatak vode (slurry metod), a moguće je dodati i insekticide, i/ili druge fungicide. Takvu mešavinu neopohodno je primeniti u roku od 72h (Anonymous 1).

Preparat Subtilex sadrži 2,75% aktivne materije (minimum 5x10¹⁰ vitalnih spora/g) *B. subtilis* izolat MBI600. Pri primeni za tretiranje semena sintetičkim fungicidima obezbeđuje dužu zaštitu u odnosu na sam sintetički fungicid. Kao rezultat biološke zaštite, povećan je porast i mehanička čvrstoća korena biljaka uz povećanje prinosa. Preparat Subtilex povećava brojnost kvržica azotofiksatora na leguminozama, što ima za posledicu formiranje zdravijeg korenovog sistema uz prisustvo bakterija (Anonymous 13).

Kod nas je registrovan preparat F-stop (*B. subtilis* soj ST 1/III) za suzbijanje prouzrokovala truleži plodova jabuke i pepelnice ruže (Sekulić i Savčić-Petrić, 2009), iako se prema navodima (Anonymous 12) primenjuje još i za kontrolu prouzrokovala sive truleži ruže (*B. cinerea*) i prouzrokovala poleganja rasada povrća. Efekat F-stop u zaštiti i bioregulaciji nekih povrtarskih useva (dve sorte paprike, paradajz) određen je preko visine biljaka, prvog cveta, krupnoće ploda i prinosa. Krupnoća ploda i prinos sorte paprike himera nije povećana pri primeni *B. subtilis* u odnosu na kontrolu, ali jeste u odnosu na onu gde je primenjen propamokarb. Pri primeni u paradajzu nije bilo značajnih razlika u visini biljaka i pojavi prvog cveta (Klokočar-Šmit i sar., 2003). Pri primeni *B. subtilis* (F-stop i Ibefungin) na uskladištenim krtolama krompira, posle 10 meseci nije registrovan gubitak u težini krtola u odnosu na kontrolnu varijantu (Klokočar-Šmit i sar., 2005, 2006a).

***Pseudomonas aureofaciens* izolat IB 51** je rizosferna bakterija, odnosno aktivna materija preparata Elena koji se primenjuje za zaštitu ozimog i jarog ječma od truleži korena (fuzarioza i helmintosporioza) i plesnivosti semena. Seme ozimog ječma tretirano je dva dana pre setve preparatom Elena u količini 1 l/t, a kao standard poslužio je preparat Fitosporin (*Bacillus subtilis*, izolat 26D) u količini 0,5 kg/t. Biološka efikasnost ispitivanog i standardnog preparata protiv infekcije na semenu bila je na nivou 48,5% pri zaraženosti u kontroli 37%. Protiv alternarioza na semenu efikasnost ispitiva-

nog preparata iznosila je 45,5%, a standardnog 40,9%. Ispitivani preparat je pozitivno delovao i na energiju klijanja (86%) i klijanje semena (87%). Efikasnost protiv truleži na korenu (fuzarioza i helmintosporioza) u fazi bokorenja u jesen iznosila je 79,4%, dok je razvoj bolesti u kontroli bio 6,3%, a u proleće 61,2% pri infekciji u kontroli 15,7%. Obezbedio je bolje prezimljavanje biljaka i poboljšao je kvalitet i kvantitet prinosa ozimog ješma (Коршунова i sar., 2009).

Biofungicidi na bazi prirodnih eteričnih ulja

Poslednjih nekoliko godina raste interesovanje za eterična ulja kao moguću zamenu konvencionalnim sintetičkim pesticidima. Postoji nekoliko proizvoda na bazi eteričnih ulja koji su trenutno dostupni na tržištu. Ulje ruzmarina se nudi kao insekticid u voćnjacima i povrtarskim usevima i kao fungicid širokog spektra delovanja u svim poljoprivrednim usevima. Proizvodi koji sadrže ulje karanfilića nalaze se u primeni kao herbicid, fungicid i inhibitor klijanja uskladištenog krompira (Hall i Fernandez, 2004).

U literaturi se navodi niz istraživanja u kojima je testirano fungicidno delovanje različitih eteričnih ulja. Ekstrakt iz cvetnih pupoljaka karanfilića ispoljio je fungicidno dejstvo na *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. i *Septoria* sp. (Soatthiamroong i sar., 2003). Ulja citronele i cimeta ispoljila su fungicidnu aktivnost na *Fusarium moniliforme* (Baruah i sar., 1996). Efikasnim se pokazalo i ulje žalfije u suzbijanju *B. cinerea* (Carta i sar., 1996), dok je kod ulja origana, majčine dušice i limunske trave utvrđeno fungicidno delovanje na prouzrokovane bolesti uskladištenog paradajza (Plotto i sar., 2003).

Prema navodima Arras i Usai (2001), ulje *Thymus vulgaris* (majčina dušica) pokazalo je snažno fungicidno delovanje na *Alternaria citri*, uticajem na klijanje spora. U Meksiku je esencijalno ulje, ekstrahovano iz lišća majčine dušice, analizirano putem gasne hromatografije/masene spektroskopije i procenjeno je njegovo fungicidno delovanje. Glavni sastojci ovog ulja bili su borneol (28,4%), timol (16,6%), karvakrol metil-etar (9,6%), kamfen (6,9%), α -humulen (6,4%) i karvakrol (5%). Testom *in vitro* utvrđeno je fungicidno delovanje eteričnog ulja majčine dušice u koncentraciji od 1000 ppm na inhibiciju *A. citri*. Fungicidno delovanje ovog ulja može se pripisati sastojcima borneol, timol i karvakrol (Soto-Mendivil i sar., 2006).

Skriningom dejstva 26 eteričnih ulja na *B. cinerea*, ulja deset biljaka – *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus*

citriodora, *Eupatorium cannabinum*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, *O. sanctum*, *Prunus persica*, *Zingiber cassumunar* i *Z. officinale*, ispoljila su apsolutnu (100%) inhibiciju porasta fitopatogenih gljiva. Eterična ulja *O. sanctum*, *P. persica* i *Z. officinale* su podvrgnuta daljim ispitivanjima budući da je registrovana minimalna koncentracija za inhibiciju (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) u poređenju sa drugim fungitoksičnim uljima. Utvrđeno je da su MIC za vrste *O. sanctum*, *P. persica* i *Z. officinale*, 200, 100 i 100 ppm (mg/l) respektivno. Ulja su termostabilna i ispoljila su fungicidno delovanje na 15 vrsta skladišnih fitopatogenih gljiva. Fungicidni potencijal ulja je bio viši u odnosu na neke sintetičke fungicide. Primenljivost ovih ulja u praksi utvrđena je za kontrolu sive truleži grožđa, prouzrokovane gljivom *B. cinerea* prilikom skladištenja. Grožđe tretirano uljem vrsta *P. persica* i *O. sanctum* pokazalo je produženo vreme skladištenja do četiri i pet dana, respektivno. Skladištenje grožđa koje je tretirano uljem *Z. officinale* produženo je za šest dana. Ulja nisu ispoljila fitotoksične efekte na kori voćaka (Tripathi i sar., 2008).

Fungicidna svojstva ulja 18 vrsta biljaka ispitana su na najčešćim patogenima kukuruza iz rodova *Penicillium*, *Fusarium* i *Pythium*. Od ispitanih, pet ulja je postiglo potpunu kontrolu patogena *in vitro*: ulje cimeta (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), karanfilića (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), origana (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz and P.H. Davis), *Satureja montana* L. i majčine dušice (*T. vulgaris* L.). Za sve patogene MIC je 800 μ l/l, a na klijancima nisu primećeni fitotoksični efekti u testu klijavosti (Christian i Goggi, 2008).

Utvrđeno je da etarska ulja nane (*Menta piperita* L.), bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), timijana (*Thymus vulgaris* L.) i čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia* (Maid. and Beet.) Cheel) u koncentracijama 0,04-0,65 μ l/ml delimično ili potpuno inhibiraju porast biljnih patogena *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *Verticillium* sp. i *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Tanović i sar., 2004). Određen je uticaj gasovite faze etarskih ulja 18 vrsta biljaka (anisa, bergamota, belog bora, bosiljka, cimeta, eukaliptusa, geranijuma, karanfilića, kleke, lavande, limuna, pitome nane, morača, pomorandže, ruzmarina, timijana, čajnog drveta i bora (*Pinus terebinta*)) na porast *B. cinerea in vitro*. Utvrđeno je da sva etarska ulja delimično ili potpuno inhibiraju rast micelije navedenog patogena. Najslabije inhibitorno dejstvo pokaza-

lo je ulje pomorandže, *P. terebinta* i belog bora, dok su ulja timijana, cimeta, anisa, geranijuma, nane i morača potpuno inhibirala porast micelije pomenutog patogena. Ulja bosiljka, morača, cimeta i timijana deluju fungicidno, dok su ulja geranijuma i nane samo fungitoksična (Tanović i sar., 2005a).

Aktivatori otpornosti biljaka

Jedan od najnovijih pristupa u zaštiti bilja od prouzrokovaca bolesti jeste indukovanje sistemične, stečene otpornosti, aktiviranjem odbrambenih mehanizama same biljke. Primena aktivatora otpornosti biljaka je u povoju i samo nekoliko aktivatora je trenutno dostupno na tržištu (Bishnoi i Payyavula, 2004) – preparat Messenger na bazi prirodnog proteina (harpin, 3%), izolovanog iz bakterije *Erwinia amylovora*, i preparat Actigard (1,2,3- benzotriazepol-7-tio karboksilna kiselina -S-metil-etar), selektivna, sistemična, sintetička supstanca.

Kao aktivatori otpornosti biljaka navode se acibenazol-S-metil, probenazol i ekstrakt biljke *Reynoutria sachalinensis* (preparat Milsana). Pomenuti ekstrakt se dodaje rastvoru kalcijum-nitrata, što prouzrokuje povećanje sadržaja prirodnih fenola u tretiranim biljkama, na čemu se i zasniva mehanizam delovanja. Primenjen na biljke u porastu, u vreme pojave bolesti, pojačava prirodni odbrambeni mehanizam biljke i sprečava razvoj bolesti. Efikasan je u suzbijanju fitopatogenih gljiva *Oidium* sp., *Botrytis* sp. i nekih bakterija kao što je *Xantomonas*, u usevima gde je registrovana smanjena osetljivost na fungicide, uključujući mnoge ukrasne biljke, tikve, paradajz, papriku, zelenu salatu i drugo povrće, vinovu lozu i bobičavo voće (Tomlin, 2006).

PREDNOSTI I NEDOSTACI BIOFUNGICIDA

Smatra se da primena biopesticida u kontroli biljnih bolesti iziskuje više ljudskog rada i da su manje efikasni od hemijskih pesticida. Ipak, primena biopesticida ima i nekoliko prednosti nad hemijskim preparatima:

Prednosti bioloških pesticida:

- organizmi za biološko suzbijanje su prirodan izvor;
- primena bioloških agenasa u programima integralne zaštite bilja omogućava razvoj održive poljoprivredne proizvodnje;
- postoje visoke premije za proizvodnju i prodaju organskih proizvoda (bez ostataka pesticida);

- smanjeni uticaj na životnu sredinu, a samim tim povećan biodiverzitet budući da su biopesticidi specifičnijeg delovanja na ciljani organizam od hemijskih preparata (Anonymous 14);
 - smanjuju potrebu za hemijskim sredstvima;
 - izuzetno su značajni u pripremi antirezistentne strategije i upravljanju osetljivošću suzbijanih vrsta na hemijske pesticide;
 - bezbedniji su za upotrebu od hemijskih sredstava;
 - manje su fitotoksični (Anonymous 9);
 - kraćih su karenca i radnih karenca;
 - mogu se primeniti u raznim tipovima biljne proizvodnje (organska, integralna itd.);
 - neki trajno ostaju u bocenozi posle unošenja (Klokočar-Šmit i sar., 2006).
- Nedostaci bioloških pesticida:
- teže se uvode u primenu;
 - imaju uži spektar delovanja;
 - sporije deluju od hemijskih sredstava;
 - deluju preventivno, nikad eradikativno;
 - biopreparati imaju kraći rok trajanja i skuplji su;
 - mogu biti inkompatibilni sa drugim fungicidima ili baktericidima (Anonymous 9);
 - zahtevaju višekratnu primenu;
 - zahtevaju sniženje pragova štetnosti (Klokočar-Šmit i sar., 2006).

RIZIK PO RUKOVAOCA BIOLOŠKIM PREPARATIMA

Evidentirane su i posledice primene biopreparata na bazi *B. thuringiensis*, *Verticillium lecanii*, *T. harzia-num*, *T. polysporum*, *Paecilomyces fumosoroseus* po rukovaoce. Utvrđeno je da je primena pomenutih organizama u vezi sa pojavom astme, alergija i alergijskog alveolitisa kod rukovaoce (Larsen i Baelum, 2002).

Posle reevaluacije *Burkholderia cepacia* – prouzrokovaca bakterijske truleži luka, izolovanog još 1949. godine, koji je registrovan kao antagonist zemljišnih patogena, Američka agencija za zaštitu životne okoline povukla ga je sa tržišta pod sumnjom da se redovno izoluje kod pacijenata sa cističnom fibrozom pluća (Anonymous 4).

Razvoj i implementacija *de novo* programa zaštite bilja će potrajati i iziskivati značajne investicije. Ključni faktor je edukacija proizvođača i radnika prognoznoizveštajne službe o rukovanju novim „alatom“ – biološkim preparatima (Anonymous 14).

ZAKLJUČAK

U zaštiti bilja dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava ili pesticida. Globalni zahtevi za potrebom smanjenja primene hemijskih pesticida koji se smatraju štetnim po potrošača, uslovljavaju i razvoj novih, bezopasnih, održivih strategija u zaštiti bilja – biopesticida, koji podrazumevaju primenu korisnih mikroorganizama ili produkata njihovog metabolizma u zaštiti bilja kao alternativu hemijskim sintetičkim jedinjenjima. Biofungicidi predstavljaju korisne gljive i bakterije koje napadaju i kontrolišu razvoj biljnih patogena. Mehanizmi delovanja biofungicida zasnovani su na: direktoj kompeticiji, antibiozi, predatorstvu ili parazitizmu i indukovanoj (izazvanoj) otpornosti biljke domaćina. U svetu je registrovan veći broj biofungicida, dok su kod nas registrovana samo dva, na bazi *Bacillus subtilis* (F-stop) i *Pythium oligandrum* (Polyversum). U svetu postoje biofungicidi i na bazi bakterija, kvasnih gljiva, kvasaca i eteričnih ulja. Razvoj i implementacija *de novo* programa zaštite bilja će potrajati, iziskivaće značajne investicije, edukaciju proizvođača, radnika prognozno-izveštajne službe i rukovalaca u primeni.

ZAHVALNICA

Rad je rezultat projekta TR20060 – Optimizacija primene aktuelnih i istraživanje novih fungicida i zoocida u funkciji njihove efikasnosti i bezbednosti hrane, Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- Anonymous 1:** *Bacillus subtilis* GBO3 (129068) Fact Sheet. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/fact_sheet_129068.htm, 1999.
- Anonymous 2:** *Aureobasidium pullulans*. <http://www.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=1444&Lang>
- Anonymous 3:** Spisak Pesticidov i agrohimikata, razrešenih k primenjeniu na teritorii Rossiskoj Federacii 2004 god. Zaštita i karantin rastenii, 5, 2004.
- Anonymous 4:** Federal Register: *Burkholderia cepacia* Strain Ral – 3, Withdrawal of and Application. www.epa.gov/EPA-PEST/2000/Feb./Day-09/p2954, 2005.
- Anonymous 5:** Opening the door to sustainable agriculture. <http://www.polyversum.cz/>, 2005.
- Anonymous 6:** *Pythium oligandrum* DV 74 (028816) Fact sheet. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_028816.htm, 2007.
- Anonymous 7:** *Candida oleophila* isolate I-182 (021008) Fact Sheet. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_021008.htm, 2000.
- Anonymous 8:** *Streptomyces griseoviridis* Strain K61 (129069) Fact Sheet. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_129069.htm, 2000.
- Anonymous 9:** Introduction to biological fungicides. <http://armstrong.extension.psu.edu/Horticulture/IntroductiontoBiologicalFungicides.pdf>, 2009.
- Anonymous 10:** *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>, 2008.
- Anonymous 11:** Mycostop Biofungicide. http://www.verdera.fi/gb_ohje.pdf, 2009.
- Anonymous 12:** F-STOP biološki fungicid. <http://www.bioec.co.rs/F-Stop-uputstvo.pdf>, 2009.
- Anonymous 13:** Subtilex biological fungicide. <http://www.nutrasol.com/library/Subtilex.pdf>, 2003.
- Anonymous 14:** Fungal Biological Control Agents. <http://www.rsc.org/ej/PO/2000/B008009H.pdf>, 2000.
- Anonymous (2009):** Trifender. Sremski poljoprivrednik, 57: 8, 2009.
- Arras, G. and Usai, M.:** Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*, 64(7): 1025-1029, 2001.
- Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus A., Goldway, M., Wisniewski, M. and Droby, S.:** Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*, 45: 140-148, 2004.
- Baruah, P., Sharma, R.K., Singh, R.S. and Ghosh, A.C.:** Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *Journal Essential Oil Research*, 8: 411-412, 1996.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L.E.:** Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by combined treatments of plant growth – promoting bacterium *Azospirillum brasiliense*, streptomycin sulfate and chemo – thermal seed treatment. *European Journal of Plant Pathology*, 108(9): 821-829, 2002.
- Bishnoi, U.R. and Payyavula, R.S.:** Effect of plant activators on disease resistance and yield in tomato and cano-

la. Proceedings 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 2004. http://www.cropsscience.org.au/icsc2004/poster/2/4/2/416_bishnoiur.htm, 2004.

Carta, C.M., Moretti, D.I. and Peana, A.T.: Activity of the oil of *Salvia officinalis* against *Botrytis cinerea*. Journal of Essential Oil Research, 8: 399-404, 1996.

Chet, I., Viterbo, A. and Brotman, Y.: Plant biocontrol by *Trichoderma* spp. Department of Biological Chemistry, Jerusalem, Israel, 2006.

Christian, J.E. and Goggi, A.S.: Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production. Crop Science, 48: 1941-1951, 2008.

Dorđević, S.: Primena mikroorganizama u organskoj proizvodnji. U: Organska poljoprivreda (Lazić B., Babović J., urednici), Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 2008, str. 534-539.

Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M. i Rekanović, E.: Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive. Pesticidi, 18(2): 69-75, 2003.

Filajdić, N., Rekanović, E., Tanović, B., Stević, M. i Vukša, P.: Efikasnost biofungicida Polyversum u suzbijanju *Botrytis cinerea* Pers. na plodovima maline. Pesticidi i fitomedicina, 21(4): 311-316, 2006.

Grgić, A.: Biološki fungicidi i insekticidi u paleti Stockton-a. Zbornik sažetaka 53. seminara biljne zaštite – Glasilo biljne zaštite, 1/2: 54-55, 2009.

Hall, D.J. and Fernandez, Y.J.: *In vitro* evaluation of selected essential oils as fungicides against *Penicillium digitatum* Sacc. Proceedings of Florida States Horticultural Society, 117: 377-379, 2004.

Indić, D., Klokočar-Šmit, Z. i Vuković, S.: Pesticidi visokog rizika i njihova zamena u krompiru. Zbornik sažetaka radova InterRegioSci 2006, Novi Sad, 2006, str. 26.

Ivić, D.: Zanimljivosti i novosti u biljnoj patologiji – suzbijanje sive plesni na jagodama gljivom *Trichoderma harzianum* pomoću pčela. Glasilo biljne zaštite, 4: 274-275, 2007.

Klokočar-Šmit, Z., Đurić, T., Indić, D., Peričević, D., Bočarov, A. i Nikolić, N.: Efekat *Bacillus subtilis* ST/III (BEC) u zaštiti i bioregulaciji nekih povrtarskih vrsta. Zbornik rezimea Šestog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2003, str. 68.

Klokočar-Šmit, Z., Jarak, M., Mijalčić, M., Indić, D. i Đurić, T.: *Bacillus* based products in control of fusarium potato tuber rot. Proceedings Balkan Scientific Conference, Carnobat, Bulgaria, 2005, pp. 578-582.

Klokočar-Šmit, Z., Lević, J., Maširević, S., Gvozdenović-Varga, J., Vasić, M. and Aleksić, S.: Fusarium rot of onion and possible use of bioproducts. Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, 114: 135-148, 2008.

Klokočar-Šmit, Z., Šovljanski, R. i Indić, D.: Biopreparati – alternativa u zaštiti plodovitog povrća. Biljni lekar, XXXIV(1): 19-30, 2006.

Klokočar-Šmit, Z., Šovljanski, R., Indić, D. i Vuković, S.: Mogućnosti ekološke proizvodnje krompira. Zbornik IV međunarodne Eko-konferencije 2006, Novi Sad, 2006a, str. 319-324.

Коршунова, Т.Ю., Силицев, Н.Н., Галимзянова, Н.Ф., Бойко Т.Ф. и Логинов, О.Н.: Биофунгицид елена на озимом ячмене. Защита и карантин растений, 5: 28-29, 2009.

Lainsbury, M.: The UK Pesticide Guide. BCPC, Norwich, UK, 2009, pp. 194-570.

Larsen, P. and Baelum, J.: Health problems associated with the use of microbial pesticides in greenhouses. Pesticide Research, Danish EPA, 61: 59, 2002.

Latinović, N., Vučinić, Z. i Vukša, P.: Efikasnost biofungicida Polyversum (*Pythium oligandrum* Drechsler) u suzbijanju crne pjegavosti vinove loze. Pesticidi i fitomedicina, 20(1): 37-41, 2005.

Lima, G., Arru, S., De Curtis, V. and Arras, G.: Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23: 223-229, 1999.

Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. and De Cicco, V.: Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology, 8: 257-267, 1998.

Lučić, K.: Sadržaj sredstava za zaštitu bilja 2009. g. Glasnik zaštite bilja, 1-2: 191-192, 2009.

Maceljski, M.: Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj. Glasilo biljne zaštite, 2-3: 135, 2005.

Marusich, M.F., Robinson, B.H., Taanman, J.-W., Kim, S.J., Schillace, R., Smith, J.L., Capaldi, R.A., Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G. and De Cicco, V.: β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. Postharvest Biology and Technology, 12(3): 293-300, 1997.

Mijatović, M., Ivanović, M. i Zečević, B.: Mogućnost primene nekih preparata u zaštiti paprika od prouzrokovala zelenog uvenuća. Zbornik rezimea Šestog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2003, str. 63.

Miletić, N., Rekanović, E., Stević, M., Latinović, N. i Miladinović, Z.: Preliminarna ispitivanja biofungicida Polyversum (*Pythium oligandrum* Drechsler). Zbornik rezimea Šestog savetovanja o zaštiti bilja, Zlatibor, 2003, str. 113.

Mommaerts, V., Platteau, G., Boulet, J., Sterk, G. and Smagghe, G.: *Trichoderma*-based biological control agents

are compatible with the pollinator *Bombus terrestris*: A laboratory study. *Biological Control*, 46(3): 463-466, 2008.

Ocsko, Z., Molnar, J. and Erdos, G.: Novenyvedo szerek, termesnovelo anyagok 2008/I. A Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium, Budapest, 2008.

Plotto, A., Roberts, D.D. and Roberts, R.G.: Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Horticulturae*, 628: 737-745, 2003.

Rekanović, E., Tanović B., Todorović, B. i Obradović, A.: Mogućnost zaštite paprika od verticilioznog uvenuća klasičnim i biofungicidima. Zbornik rezimea Petog kongresa o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004, str. 358.

Rekanović, E.: *Verticillium* spp. i mogućnost biološke i hemijske zaštite paprika. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2005.

Rekanović, E.: Osetljivost izolata *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary iz Srbije na fungicide i rizik od rezistentnosti. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 2009.

Sekulić, J. i Savčić-Petrić, S.: Pesticidi u prometu u Srbiji (2009). Biljni lekar (tematski broj), 2-3, 2009.

Sharoni, S., Arnon, D., Alon, B., Mohamad, A. and Yigal, E.: Honey bee dispersal of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T39: effectiveness in suppressing *Botrytis cinerea* on strawberry under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 116(2): 119-128, 2006.

Soattbiamroong, T., Jatisatienr, C. and Supyen, D.: Antifungal activity of extract of *Eugenia aromatica* (L.) Baill (Myrtaceae) against some pathogenic molds. *Acta Horticulturae*, 597: 209-214, 2003.

Soto-Mendivila, A.E., Moreno-Rodriguez, J., Estarron-Espinosa, M., Garcia-Fajardo, J. and Obledo Vazquez, N.E.: Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of thymus vulgaris against *Alternaria citri*. *e-Gnosis* - online, 4: 16, 2006.

Шахмудзе, О.Т.: Биологический метод защиты табака от болезней. Защита и карантин растений, 11: 22, 2008.

Šovljanski, R., Klokočar-Šmit, Z. i Indić, D.: Analiza rizika primene pesticida u povrću pre 25 godina i danas. Zbornik V kongresa o zaštiti bilja, Zlatibor, 2004, str. 312-315.

Šovljanski, R., Klokočar-Šmit, Z. i Indić, D.: Visokorizični insekticidi i fungicidi i alternative u zaštiti povrća. Tematski zbornik III međunarodne Eko-konferencije Zdravstveno bezbedna hrana, Novi Sad, 2004a, str. 387-392.

Tanović, B., Milijašević, S., Obradović, A., Todorović, B., Rekanović, E. i Milikić, S.: *In vitro* efekti etarskih ulja iz začinskih i lekovitih biljaka na patogene koji se prenose zemljištem. *Pesticidi i fitomedicina*, 19(4): 233-240, 2004.

Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I. i Rekanović, E.: Toksičnost etarskih ulja za *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro*. *Pesticidi i fitomedicina*, 20(2): 109-114, 2005a.

Tanović, B., Rekanović, E., Potočnik, I. and Todorović, I.: Effectiveness of fungicides and biofungicides in the control of grey mould of raspberry in Serbia. Book of Abstracts 9th International Rubus and Ribes Symposium, Santiago, Chile, 2005, p. 31.

Thomas, C.: Bug vs bug – managing plant diseases with biofungicides. Virginia Vegetable, Small Fruit and Specialty Crops, 2004.

Tomlin, C. (Ed.): The Pesticide Manual British Crop Protection Council. Farnham, UK, 2006.

Tripathi, P., Dubey, N.K. and Shukla A.K.: Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(1): 39-46, 2008.

Жалиева, А.Д.: Грибы р. Trichoderma - регуляторы численности возбудителей корневых гнилей пшеницы. Защита и карантин растений, 11: 17, 2008.

Biofungicides and Their Applicability in Modern Agricultural Practice

SUMMARY

Agricultural production in developed countries undergoes various changes, some of which take place at consumers' request, while others are of ethical importance. This is especially true of plant protection. A global demand for reducing the use of chemical pesticides, which are regarded as harmful to the consumer, induce the development of new, less harmful and sustainable strategies of plant protection. Many chemical pesticides have been excluded from further use (e.g. organochlorine insecticides, methyl bromide) due to their potential risk to human health, the environment and non-target organisms, or development of resistance of harmful organisms to those substances. A need for developing alternative protection systems in the future is beyond doubt and they should be implemented either as an addition or a substitute for conventional pesticides. Well-considered use of biological products in combination with other protection measures would meet the requirements for producing sanitary and health-safe agricultural products, and food in general. In the paper, we discuss the modes of action, formulation types and applicability of different biological fungicides, and list them individually with their advantages and disadvantages, as well as the production and application risks associated with biological products.

Keywords: Biopesticides; Biofungicides; Antagonists; Super-parasites; Competition; Antibiosis