

Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*

Ereš, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:780580>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Helena Ereš

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UTJECAJ TEMPERATURE I ETERIČNIH ULJA NA RAST FITOPATOGENE
GLJIVE *Rhizoctonia solani*

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Helena Ereš

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UTJECAJ TEMPERATURE I ETERIČNIH ULJA NA RAST FITOPATOGENE
GLJIVE *Rhizoctonia solani*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednica
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentorica
3. prof. dr. sc. Renata Baličević, članica

Osijek, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. <i>Rhizoctonia solani</i>	2
2.2. Eterična ulja	5
3. MATERIJAL I METODE	8
3.1. PDA podloga i eterična ulja.....	8
3.2. Postavljanje pokusa.....	8
4. REZULTATI	12
4.1. Utjecaj eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija <i>R. solani</i> četvrti dan od inokulacije	12
4.2. Utjecaj eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija <i>R. solani</i> osmi dan od inokulacije	16
4.3. Usporedba antifungalnog djelovanja eteričnih ulja po temperaturama četvrti dan od inokulacije.....	20
4.4. Usporedba antifungalnog djelovanja eteričnih ulja po temperaturama osmi dan od inokulacije.....	21
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČAK.....	24
7. LITERATURA	25
8. SAŽETAK	29
9. SUMMARY	30
10. POPIS TABLICA.....	31
11. POPIS SLIKA	32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

U vrijeme rasta svjetske populacije sve je veća potreba za hranom. Osim toga, može se primijetiti sve veći intenzitet klimatskih promjena koji itekako utječe na visinu i kvalitetu uroda. Upravo je to razlog okretanja novim načinima proizvodnje i metodama zaštite bilja kako bi se uspjela ostvariti maksimalna iskoristivost obradivih površina i pritom postići što veći i kvalitetniji prinos. Budući da se danas sve više proizvođača i potrošača okreće ekološkom načinu proizvodnje, sve se veća pažnja pridaje zaštiti okoliša i korištenju ekoloških preparata. Prema tome, veliki broj znanstvenika istražuje alternativne metode zaštite bilja od štetnih organizama kao zamjene za sintetičke pripravke kako bi se smanjio štetan učinak na zdravlje ljudi i okoliš. Holmes i Eckert (1999.) navode da se provode intenzivna istraživanja o primjenama nepesticidnih mjera koje imaju manje štetan učinak na okoliš. Kao jedan od mogućih načina zamjene sredstava za zaštitu bilja istražuju se eterična ulja za koja je brojim istraživanjima utvrđeno jako antifungalno, antibakterijsko i antivirno djelovanje.

Rhizoctonia solani je destruktivan i široko rasprostranjen patogen, koji ima veliki broj domaćina i pritom uzrokuje ekonomski značajne gubitke prinosa u cijelom svijetu. Jedna je od najproučavanijih gljiva iz roda *Rhizoctonia*, a prvi je put utvrđena na bolesnom gomolju krumpira te nakon toga i opisana 1858. godine (Sneh i sur., 1993.).

Zygadlo i Grosso (1995.) navode da su eterična ulja prikladna zamjena za kemijske fungicide, uz to su ekološki prihvatljiva i biorazgradiva. Prema nevedenom, biološki spojevi ekstrahirani iz biljaka mogli bi postati alternativni pristup u kontroli biljnih bolesti. U posljednjih nekoliko desetljeća testiran je fungistatičan učinak mnogih eteričnih ulja.

Cilj je ovog istraživanja utvrditi postoje li statistički značajne razlike u djelovanju dvanaest različitih eteričnih ulja u količini 25 μ L i pri temperaturama 15, 20 i 30 °C na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani* međusobno i u odnosu na kontrolu te postoje li razlike u djelovanju ulja pri različitim temperaturama.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorf *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) najznačajnija je vrsta iz roda *Rhizoctonia* te je stanovnik tla. Budući da je polifaga gljiva s više od 200 biljnih domaćina, uzrokuje velike gubitke na različitim kultiviranim vrstama, ali parazitira i brojne korove. Najznačajnije štete uzrokuje na povrću, cvijeću i ratarskim kulturama.

Unutar vrste *R. solani* od iznimnog je značaja grupiranje izolata u anastomozne grupe (AG) jer između njih postoje razlike u specifičnim simptomima i određenim domaćinima (Jasnić i sur., 2006.).

Carling i sur. (2002.). utvrdili su da je do danas patogen *R. solani* grupiran u 13 anastomoznih skupina (AG), koje se pri tome razlikuju po patogenosti, morfološkim karakteristikama i sekvencama DNA.

R. solani je fakultativni zemljišni patogen kojem se teleomorfni stadij (*T. cucumeris*) razvija neposredno iznad površine tla ili na česticama tla. Na bazidima nastaju četiri sterigme na kojima se formiraju prozirne, ovalne ili eliptične bazidiospore koje nemaju značajnu ulogu u epidemiologiji. Kod anamorfnog stadija (*R. solani*) gljiva formira tamni micelij koji se grana pod pravim kutom, a čine ga široke hife. Također gljiva stvara sklerocije i „trajni micelij“ koji predstavlja izvor zaraze (Jasnić i sur., 2006.).

Sklerocije, koje nastaju iz nediferenciranih hifa ili moniloidnih stanica, kličaju i formiraju micelij koji služi kao izvor inokuluma za infekciju i širenje bolesti. Kako bi došlo do infekcija, sklerocije moraju prvo proklijati i formirati micelij koji rastu prema biljci domaćinu (Ajayi-Oyetunde i Bradley, 2018).

Infekcije mogu nastati u širokom rasponu temperature i vlažnosti tla. Prema Carling i Leiner (1990.) optimalna temperatura za rast micelija svih istraživanih izolata gljive *R. solani* je od 20 °C do 25 °C. Osim visoke temperature i relativno visoke vlažnosti tla i zraka, sastav tla ima značajan utjecaj na pojavnost i intenzitet bolesti. Shodno tomu, Westerdijk i sur. (2004.) utvrdili su da zaslanjena i teška tla idealana za razvoj ovog patogena.

Iako danas govorimo o značajnom tehnološkom napretku u suvremenoj poljoprivredi i dalje je veliki problem kontrola biljnih bolesti zbog sve manje dostupnih kemijskih sredstva, ali i zbog sve većeg problema uzrokovanih klimatskim promjenama. Najznačajniji simptomi javljaju se na sjemenu, hipokotilu i korijenu biljaka, ali isto tako može doći do zaraze i

nadzemnih dijelova biljaka. Ivić i Cvjetković (2010.) navode da se u prirodi *R. solani* održava u tlu i na ostacima biljaka kao micelij ili sklerocije.

Trulež korijena i hipokotila tipični su simptomi koji se opažaju kada se osjetljivi genotipovi uzgajaju na tlima visokog rizika i u uvjetima povoljnim za razvoj bolesti kod soje (Yang i sur., 1990.)

Prstenasta pjegavost koju uzrokuje *R. solani* prvi put zabilježena je kod prosa u Kerali, Indija, 1989. i od tada je u porastu i predstavlja problem kod svih uzgajivača prosa (Nagaraja i Das, 2016.).

Za razliku od ostalih uzročnika truleži korijena šećerne repe, *R. solani* inficira korijen tijekom nicanja, odnosno dolazi do propadanja klijanaca tijekom vegetacijskog perioda i skladištenja repe. Svakako može uzrokovati i tamnu trulež korijena (Jasnić i sur., 2006.).

„Bijela noga“ jedna je od najznačajnijih bolesti krumpira diljem svijeta. Najpoznatiji simptom bolesti je pojava sklerocija na površini gomolja krumpira (Khedher, 2015.). Banville (1989.) navodi da kod uzgoja krumpira ovaj patogen može uzrokovati i kvantitativne i kvalitativne štete na usjevu. Kvantitativni gubici nastaju zbog zaraze stabljike i korijena, što utječe na veličinu i broj gomolja, dok se kvalitativni gubici odnose na stvaranje deformiranih gomolja i razvoj sklerocija na površini gomolja.

Međutim, sama kontrola *R. solani* otežana je zbog njezinog ekološkog ponašanja, širokog raspona domaćina i visoke stope preživljavanja sklerocija u različitim uvjetima okoliša. Mjere zaštite najviše se odnose na provođenje agrotehničkih mjera poput izbora tla, plodoređa, dubokog zaoravanja biljnih ostataka i uravnotežene gnojidbe te značajno manje na primjenu kemijskih fungicida. Stoga su se znanstvenici okrenuli novim alternativnim načinima kako bi pronašli najbolje rješenje u suzbijanju ove bolesti.

Naime, zbog sve veće važnosti i osviješćenosti o ekologiji, problemu rezistentnosti, negativnom utjecaju kemijskih sredstava za zaštitu bilja na zdravlje čovjeka i okoliš sve se više provode istraživanja alternativnih načina zaštite od uzročnika biljnih bolesti kojima je cilj zamjeniti ili u što većoj mjeri smanjiti njihovo korištenje. Upravo takva istraživanja pokazuju jako dobre rezultate i vode k pronalasku ekološki prihvatljivih metoda kontrole bolesti. O korištenju ljekovitih biljaka i njihovih djelotvornosti uvelike se govorilo u prošlosti i pritome se poseban naglasak stavljao na moguća antimikrobna svojstva.

Parađiković i sur. (2012.) zaključili su da se primjenom bioloških pripravaka i biostimulatora može postići jednaka učinkovitost kao i kod primjene kemijskih preparata za suzbijanje fitopatogenih gljiva *Pythium ultimum* Trow i *R. solani*.

Parajuli i sur. (2022.) istraživali su pokrovne usjeve kao potencijalna sredstva za suzbijanje biljnih bolesti koje se prenose tlom kod uzgoja drvenastih ukrasnih biljaka. Odnosno, rezultati su pokazali da pokrovni usjevi mogu smanjiti intenzitet pojave patogena *R. solani*, *Phytophythium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, A. M. Lodhi & Lévesque i *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan na reznicama crvenog javora.

Budući da proizvođačima na jugoistoku Sjedinjenih Američkih Država veliki problem predstavljaju bolesti koje se prenose tlom, znanstvenici su se okrenuli biološkim načinima suzbijanja najznačajnijih patogena kod uzgoja drvenastih ukrasnih biljaka. Istraživanje biofumigacije pokazalo je da su pokrovni *Brassica* usjevi bili učinkoviti za suzbijanje *R. solani* i *P. nicotianae* bez obzira na vremenski period od 2 i 4 tjedna (Baysal-Gurel i sur., 2020.).

Istraživanje o utjecaju biougljena na patogena *R. solani* pokazalo je da dodavanjem biougljena u relativno nižim koncentracijama poboljšava rast biljaka te umanjuje negativno djelovanje gljive *R. solani*. Međutim, pri višim koncentracijama, biougljen pokazao je neučinkovitost ili povećanu učestalost i intenzitet bolesti (Jaiswal i sur., 2014.).

De Curtis i sur. (2010.) istražili su učinkovitost dvaju antagonističkih bakterijskih izolata (*Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuuchi et al. , T1A-2B i *Pseudomonas sp.*, T4B-2A) na *R. solani* i *Sclerotium rolfsii* Sacc. te dokazali da je smanjena jačina bolesti uzrokovanih gljivom *R. solani* korištenjem izolata T1A-2B do 63,8%, a korištenjem T4B-2A do 73,2%.

Aktivnost *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn V26 *in vitro* značajno je inhibirala rast *R. solani* u usporedbi s netretiranom kontrolom. Prema navedenom, *Bacillus subtilis* ima veliki potencijal kao sredstvo za biokontrolu protiv *R. solani* na usjevima krumpira.

Fungivorna nematoda, *Aphelenchus avenae*, pokazala je snažnu sposobnost smanjenja pojavnosti patogena *R. solani*, *Fusarium solani* (Mart) Sacc. i *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen (Zhang i sur., 2020.).

2.2. Eterična ulja

Eterična ulja primjenjivala su se već u srednjem vijeku kao antibakterijski, antivirusni, antifungalni, antiparazitski, insekticidni, medicinski i kozmetički pripravci, no danas imaju puno širu primjenu poput farmaceutske, sanitarne, kozmetičke, poljoprivredne, prehrambene i druge industrije (Bakkali i sur., 2008.). Eterična ulja su prirodni proizvodi s karakterističnim intenzivnim mirisom dobiveni destilacijom iz aromatičnih biljaka. Singh i Maurya (2005.) navode da su eterična ulja prirodne fitokemikalije koje se koriste kao prirodna aroma, pesticidi, prirodni parfemi i u aromaterapiji. Nazzaro i sur. (2013.) navode da su eterična ulja tekuće, hlapljive, bistre i obojene smjese koje su topljive u lipidima i organskim otapalima te imaju manju gustoću od vode. Također, prisutni su u gotovo svim biljnim organima, uključujući pupoljke, cvjetove, lišće, sjemenke, grančice, stabljike, plodove, korijenje, drvo ili koru, ali ih biljka općenito pohranjuje u sekrecijske stanice, šupljine, kanale, žljezdane trihome ili stanice epiderme.

Zbog sve veće osviještenosti ljudi u pogledu korištenja ljekovitog bilja, u posljednjih nekoliko godina porastao je interes za prirodne proizvode kao zamjena za umjetne aditive ili farmakološki relevantna sredstva. Stoga su eterična ulja stekla veliku popularnost u prehrambenoj, kozmetičkoj, kao i farmaceutskoj industriji (Turek i Stintzing, 2013.). Sve češća pojava rezistentnosti na kemijska sredstva potaknula je znanstvenike da se okrenu istraživanju bioloških načina suzbijanja štetnih organizama, a kao jedno od ideja su upravo eterična ulja.

Ćosić i sur. (2010.) bavili su se ispitivanjem utjecaja eteričnih ulja na dvanaest fitopatogenih gljiva, a eterična ulja klinčića, ružmarina, anisa, lavande i timijana imala su značajan antifungalni učinak na *Fusarium graminearum* Schw., *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reink.) Nelson, Toussoun & Marasas, *F. oxysporum*, *Fusarium avenaceum* Fr. Sacc., *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al., *Phomopsis phaseoli* (sin. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*), *Phomopsis longicolla* Hobbs (sin. *Diaporthe viticola*), *Diaporthe neoviticola* Udayanga, Crous & Hyde (sin. *Phomopsis viticola*), *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker (sin. *Helminthosporium sativum*), *Colletotrichum coccodes* (Wallr) Hughes i *R. solani*.

Ulje *Thymus vulgaris* L. pokazalo je najveću antifungalnu učinkovitost te je potpuno inhibiralo rast micelija *Aspergillus flavus* L. pri $0,7 \mu\text{l ml}^{-1}$ i pokazalo je širok fungitoksični spektar protiv osam različitih gljivica koje kontaminiraju hranu: *F. oxysporum*,

Cladosporium herbarum (Pers.) Link, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Aspergillus terreus* Thom, *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson, *Aspergillus fumigatus* Fresen, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. i *Botryodiplodia theobromae* Pat. Dodatno se navodi da je navedeno ulje potpuno zaustavilo proizvodnju aflatoksina B1 pri $0,6 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Kumar i sur., 2008).

Palfi (2017.) navodi da je od deset ispitanih eteričnih ulja, ulje timijana imalo najjače inhibitorno djelovanje na porast micelija *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* i *Colletotrichum coccodes*.

Handique i Singh (1990.) utvrdili su antifungalno djelovanje eteričnog ulja limunske trave (*Cymbopogon*) protiv tri biljna patogena: *R. solani*, *S. rolfsii* i *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Učinkovitost na porast micelija *R. solani* od 67% zabilježena je pri primjeni 100 ppm eteričnog ulja limunske trave.

Eterično ulje iz biljke noćni jasmin (*Cestrum nocturnum* L.) inhibira porast micelija do 80% sljedećih gljiva: *R. solani*, *B. cinerea*, *Colletotrichum truncatum* (Schwein.) Andrus & Moore, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Phytophthora capsici* Leonian i *S. sclerotiorum* (Al-Reza i sur., 2010.).

Lixandru i sur. (2010). istraživali su utjecaj 8 eteričnih ulja na 11 bakterija i 3 gljivične vrste te utvrdili su da ulja timijana (*Thymus vulgaris* L.), korijandera (*Coriandrum sativum* L.) i bosiljaka (*Ocimum basilicum* L.) imala najbolje antibakterijsko djelovanje, dok su timijan i menta (*Mentha spicata* L.) imali bolje inhibitorno djelovanje na micelij gljiva.

Rezultati istraživanja utjecaja pet biljnih ekstrakata *Artemisia absinthium* L., *Rumex obtusifolius* L., *Taraxacum officinale* Weber ex Wiggers, *Plantago lanceolata* L. i *Malva sylvestris* L. na rast micelija tri gljive *A. alternata*, *Penicillium expansum* Link i *Mucor piriformis* Fisch pokazala su da sve koncentracije biljnih ekstrakata dovode do značajne inhibicije rasta micelija. U skladu s tim najveća koncentracija uzrokovala je maksimalnu inhibiciju rasta micelija, a potom niže koncentracije biljnih ekstrakata (Parveen i sur., 2014.).

Soylu i sur. (2006.) dokazali su da eterična ulja *Origanum syriacum* var. *bevanii* (Holmes) Letsw., *Thymbra spicata* L. subsp. *spicata*, *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas*, *Rosmarinus officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Mill. i *Laurus nobilis* L. inhibiraju porast micelija *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary na rajčicama.

Veliki broj autora bavi se istraživanjima o učinkovitosti eteričnih ulja u medicini kao načina suzbijanja pojedinih bolesti kod čovjeka. Giordani i sur. (2020.) navode da su ekstrakti *Stellaria dichotoma* L., *Scutellaria scordifolia* L. *Aquilegia sibirica* Fisch. Et Schrenk. i *Hyoscyamus niger* L. pokazali antifungalno djelovanje protiv svih proučavanih gljivica uzročnika kožnih bolesti. Flavoni, luteolin i apigenin, identificirani u ekstraktima *S. scordifolia* i rutin identificiran u ekstraktima *S. dichotoma* i *Hyoscyamus niger* L., mogli bi biti odgovorni za uočeno antifungalno djelovanje.

Pina-Vaz i sur. (2004.) istražili su utjecaj eteričnih ulja *T. vulgaris*, *T. zygis* i *T. mastichina* na *Candida* spp. i zaključili da navedena eterična ulja timijana imaju snažno antifungalno djelovanje na *Candida* spp., što osigurava buduća terapijska ispitivanja na mukokutanoj kandidozi.

Eterično ulje *Thymus vulgaris* kemoskop timol pojačava antifungalno djelovanje amfotericina B što ukazuje na moguću primjenu ovog eteričnog ulja uz antifungalne lijekove za liječenje mikoza (Giordani i sur., 2020.).

Osim antifungalnog djelovanja dokazana su brojna antibakterijska i antivirusna djelovanja eteričnih ulja na brojne uzročnike bolesti. Prema navedenom, eterična ulja cimeta, klinčića, pimenta, timijana, origana i ružmarina posjeduju snažno antibakterijsko djelovanje protiv *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (Conner, 1993.).

S druge strane, Jimbo i sur. (2009.) smatraju da je aromaterapija učinkovita nefarmakološka terapija za demenciju te da ima određeni potencijal za poboljšanje kognitivne funkcije, osobito kod bolesnika s Alzheimerove bolesti.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje utjecaja dvanaest eteričnih ulja uz primjenu 25 µL i tri razine temperature (15, 20 i 30 °C) na rast micelija fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani* provedeno je u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici i Katedri za fitopatologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

3.1. PDA podloga i eterična ulja

Za pripremu hranjive podloge potrebno je izvagati sastojke pomoću digitalne vage i to izvagati 21 g krumpir dekstroznog agara (potato dextrose agar PDA) i 1,40 g tehničkog agara koji se potom dodaju u Erlenmeyerovu tikvicu, u kojoj se nalazi 500 mL destilirane vode. Nakon što se smjesa kuhala oko 1h u vodenoj kupelji, tikvica se zatvori aluminijskom folijom, umota u novine i stavi u autoklav na sterilizaciju. Nakon sterilizacije, dodaje se 0,5 g antibiotika rastopljenog u 2 mL sterilne destilirane vode. Prije izlijevanja hranjive podloge potrebno je sterilizirati Petrijeve zdjelice u autoklavu na 120 °C. Izlivena hranjiva podloga (10 mL u svakoj zdjelici) hladi se na sobnoj temperaturi, a potom čuva u hladnjaku.

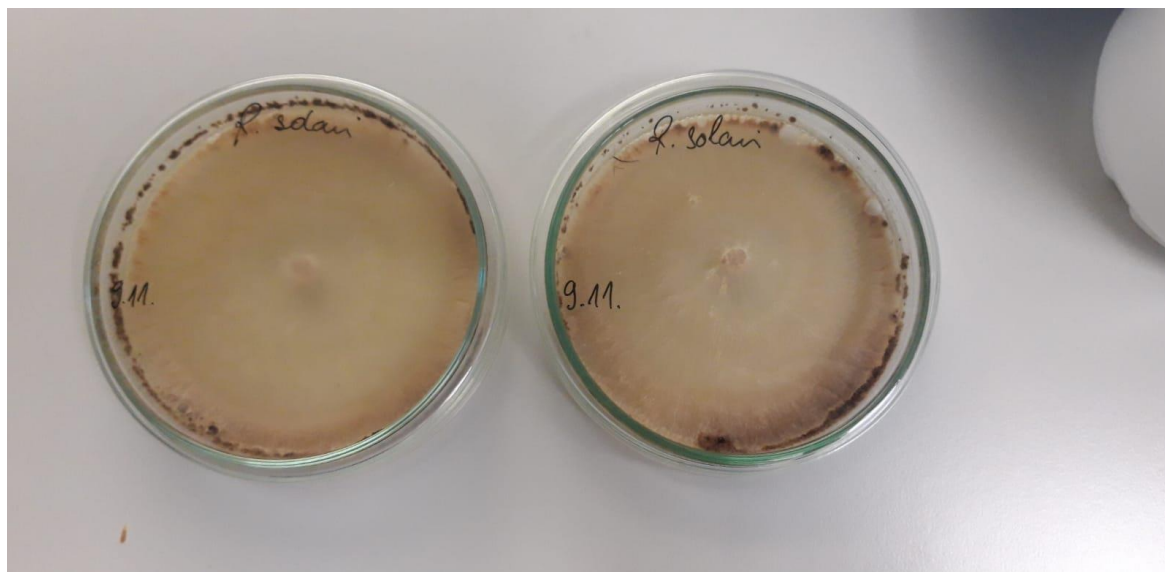
U ovome istraživanju korišteno je dvanaest eteričnih ulja u količini 25 µL s ciljem utvrđivanja njihovog djelovanje na porast micelija. Korištena su sljedeća eterična ulja: anis (*Pimpinella anisum* L.), bor (*Pinus sylvestris* L.), cimet kora (*Cinnamomum verum* Bercht & Presl), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), čajevac (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), čempres (*Cupressus sempervirens* L.), eukaliptus (*Eucalyptus globulus* Labill.), klinčić (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry), lavanda (*Lavandula angustifolia* L.), naranča slatka (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) i timijan (*Thymus vulgaris* L.).

3.2. Postavljanje pokusa

Na početku postavljanja pokusa nužno je cijelu površinu u laminaru dezinficirati etilnim alkoholom. Također sav korišteni pribor potrebno je sterilizirati na plameniku. Zatim se na svaku Petrijevu zdjelicu zapiše naziv gljive i eteričnog ulja, temperatura, količina ulja i datum. Prethodno pripremljena čista kultura gljive *Rhizoctonia solani* (slika 1.) buši se, pomoću metalnog kružnog rezača (slika 2.), uz sami rub Petrijeve zdjelice. Pomoću sterilne laboratorijske igle uzima se isječak (slika 3.) i postavlja na četiri označena mjesta na pripremljenu hranjivu podlogu u Petrijevu zdjelicu (slika 4.). U središte zdjelice pomoću pincete postavlja se kružni isječak filter papira na kojeg se pomoću mikropipete (slika 5.)

aplicira eterično ulje u količini 25 μ L ili, ako je riječ o kontrolnoj inačici, sterilna destilirana voda. Nakon postavljenog pokusa u 3 ponavljanja, Petrijeve zdjelice odnose se u termostatsku komoru (slika 6.) na temperature 15, 20 i 30 °C i svjetlosni režim 12 sati svjetlo / 12 sati tama. Zona inhibicije izmjerena je četvrti i osmi dan nakon natepljivanja (slika 7.).

Dobiveni podaci statistički su obrađeni pomoću programa Statistica for Windows 10.



Slika 1. Čista kultura gljive *R. solani*
Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 2. Bušenje kulture *R.solani* pomoću metalnog kružnog rezača
Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 3. Uzimanje uzorka čiste kulture pomoću laboratorijske igle
Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 4. Postavljanje čiste kulture gljive na hranjivu podlogu i označena mjesta
Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 5. Aplikacija eteričnog ulja pomoću mikropipete
Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 6. Petrijeve zdjelice u termostatskoj komori
Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 7. Mjerenje zone inhibicije
Izvor: Ereš, H. 2021.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija *R. solani* četvrti dan od inokulacije

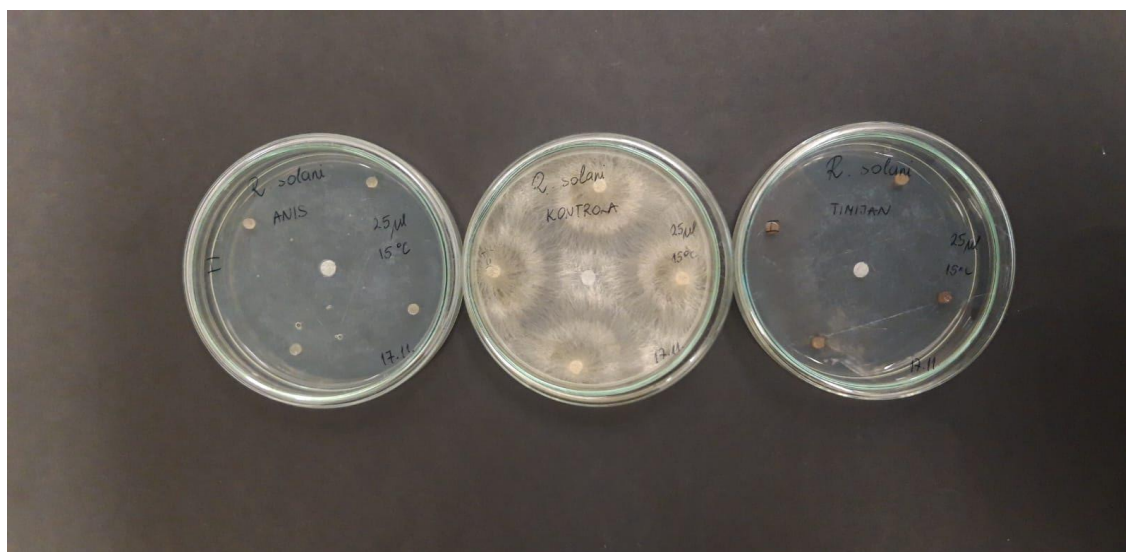
Fungistatičan učinak eteričnih ulja primjenjenih u količini 25 µL na tri temperature na porast micelija fitopatogene gljive *R. solani* u odnosu na kontrolu četiri dana od inokulacije prikazan je u tablici 1, a u tablici 2 prikazane su međusobne razlike u djelovanju eteričnih ulja na porast micelija gljive. Prema navedenom, eterično ulja anisa, cimet kore, citronele, čajevca, lavande i timijana je pri najnižoj temperaturi od 15 °C potpuno je inhibiralo porast micelija u odnosu na ostala ulja i kontrolu.

Sva navedena ulja na 30 °C pokazala su statistički značajno jače inhibitorno djelovanje u odnosu na kontrolu. Ulja bora, eukaliptusa i naranče slatke na 20 °C pokazala su statistički vrlo značajno slabije djelovanje u odnosu na druga ulja, ali jače u odnosu na kontrolu.

Tablica 1. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* u odnosu na kontrolu pri različitim temperaturama četvrti dan od naciepljivanja (zona inhibicije u mm)

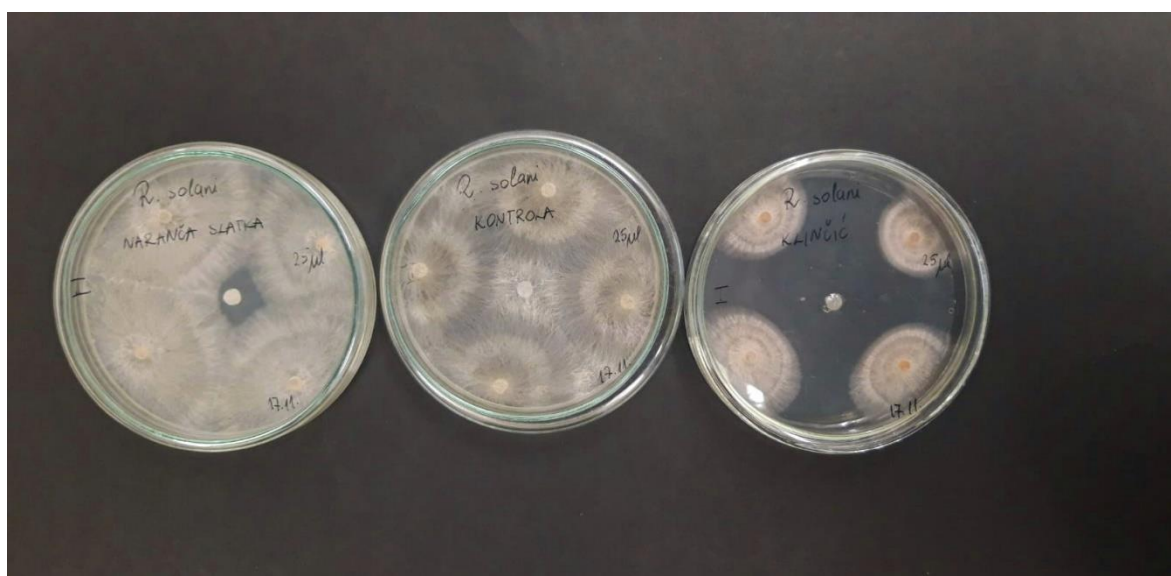
ULJE	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	30
BOR	16,17	9,92	20,67
CIMET KORA	30	28,83	30
CITRONELA	30	27,92	30
ČAJEVAC	30	30	30
ČEMPRES	21,5	19,58	28,33
EUKALIPTUS	24,67	9,17	27,08
KLINČIĆ	19,33	19,25	21,25
LAVANDA	30	21,75	30
NARANČA SLATKA	11,33	5	17,08
RUŽMARIN	30	13,92	30
TIMIЈAN	30	30	30
KONTROLA	0	0	0
LSD 0,05	5,71	4,50	4,38
0,01	7,72	6,09	5,93

Djelovanje ulja timijana i anisa u odnosu na kontrolu na 15° C prikazano je na slici 8, a djelovanje ulja slatke naranče i klinčića na slici 9.



Slika 8. Eterično ulje anisa i timijana u odnosu na kontrolu 4. dan od naciepljivanja na 15°C

Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 9. Eterično ulja naranče slatke i klinčića u odnosu na kontrolu na 20°C

Izvor: Ereš, H. 2021.

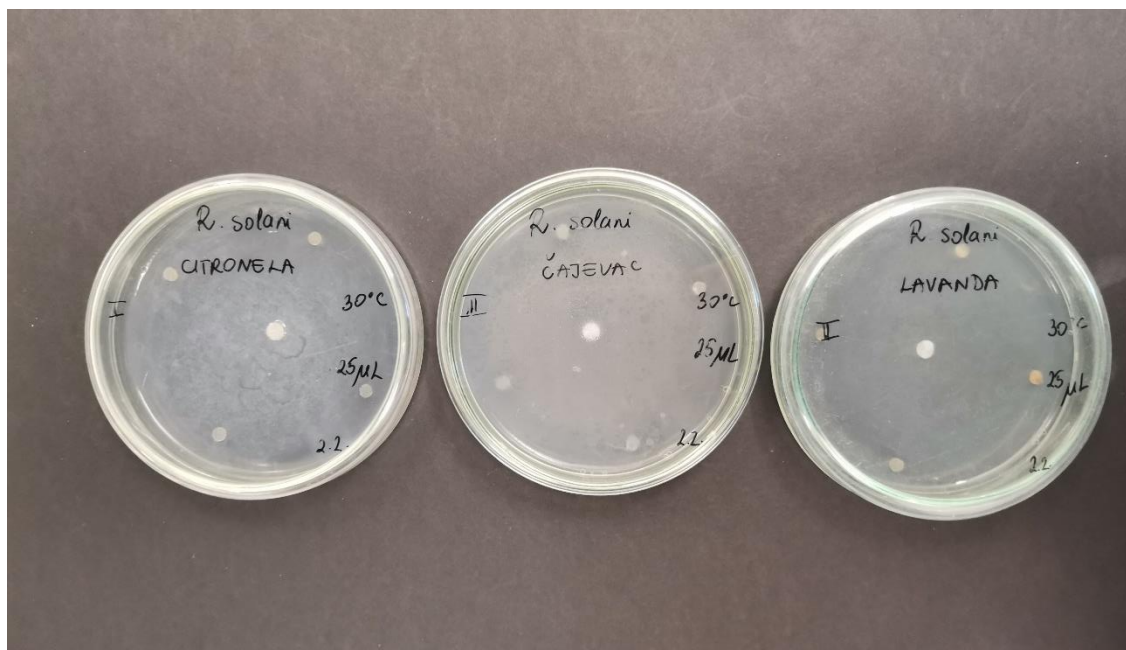
Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* pri različitim temperaturama četvrti dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

ULJE	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	30
BOR	16,17	9,92	20,67
CIMET KORA	30	28,83	30
CITRONELA	30	27,92	30
ČAJEVAC	30	30	30
ČEMPRES	21,5	19,58	28,33
EUKALIPTUS	24,67	9,17	27,08
KLINČIĆ	19,33	19,25	21,25
LAVANDA	30	21,75	30
NARANČA SLATKA	11,33	5	17,08
RUŽMARIN	30	13,92	30
TIMIJAN	30	30	30
LSD 0,05	5,96	4,70	4,58
0,01	8,08	6,37	6,21

Ulja anisa, kore cimeta, citronele, lavande, ružmarina, čajevca i timijana su na 15 °C potpuno inhibirala porast gljive i ta je inhibicija bila statistički jača u odnosu na ostala ulja. Statistički značajnih razlika u djelovanju ulja čempresa, eukaliptusa i klinčića nije bilo. Naslabije djelovanje imalo je ulje naranče slatke koje značajno slabije inhibiralo porast micelija u odnosu na sva ostala ulja izuzev ulja bora.

Ulje naranče slatke imalo je najslabije djelovanje i na 20 °C pri čemu je to ulje statistički značajno slabije inhibiralo rast gljive u odnosu na sva druga ulja izuzev ulja eukaliptusa. Pri temperaturi 30 °C također je ulje naranče slatke djelovalo najslabije te značajne razlike u djelovanju nisu utvrđene samo između tog ulja i ulja bora i klinčića.

Razlike u djelovanju ulja citronele, čajevca i lavande 4. dan od nacjepljivanja na 30 °C prikazane su na slici 10, a ulja lavande, naranče slatke i klinčića na slici 11.



Slika 10. Učinak ulja citronele, čajevca i lavande 4. dan od nacepljivanja na 30°C
Izvor: Ereš, H. 2022.



Slika 11. Učinak ulja lavande, naranče slatke i klinčića 4. dan od nacepljivanja na 30°C
Izvor: Ereš, H. 2022.

4.2. Utjecaj eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija *R. solani* osmi dan od inokulacije

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja u odnosu na kontrolu (prikazano kao zona inhibicije) osam dana od inokulacije prikazano je u tablici 3, a u tablici 4 prikazane su međusobne razlike u djelovanju eteričnih ulja na porast micelija gljive.

Osmi dan od naciepljivanja kod primjene ulja bora, čempresa, klinčića (slika 12), naranče slatke na temperaturi 15 °C, kao i kontrolnoj inačici s destiliranom vodom, micelij gljive *Rizoctonia solani* prerastao je cijelu Petrijevu zdjelicu (zona inhibicije 0 mm). Pri temperaturi 20 °C zone inhibicije nije bilo u kontroli i uz primjenu bora, čempresa, eukaliptusa, klinčića, lavande, naranče slatke i ružmarina., a na temperaturi 30 °C u kontroli i uz primjenu ulja klinčića i naranče slatke.

Ulja anisa, cimeta kore, citronele, čajevca i timijana su pri svim temperaturama statistički vrlo značajno inhibirala porast micelija u odnosu na kontrolu.

Tablica 3. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* u odnosu na kontrolu pri različitim temperaturama osmi dan od naciepljivanja (zona inhibicije u mm)

ULJE	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	30
BOR	0	0	3,33
CIMET KORA	30	18,33	30
CITRONELA	30	20,58	30
ČAJEVAC	30	30	29,25
ČEMPRES	0	0	13,33
EUKALIPTUS	17,92	0	2,08
KLINČIĆ	0	0	0
LAVANDA	30	0	27
NARANČA SLATKA	0	0	0
RUŽMARIN	4,83	0	30
TIMIJAN	30	30	30
KONTROLA	0	0	0
LSD 0,05	8,21	8,39	4,89
0,01	11,09	11,34	6,62



Slika 12. Porast micelija kod primjene eteričnog ulja klinčića 8. dan od naciepljivanja na 15°C

Izvor: Ereš, H. 2021.

Porast micelija *R. solani* na 15°C uz primjenu 25 μL eteričnih ulja klinčića i timijana i u kontrolnoj inačici prikazano je na slici 13.



Slika 13. Antifungalni učinak eteričnog ulja timijana i klinčića u odnosu na kontrolu 8. dan od naciepljivanja na 15°C

Izvor: Ereš, H. 2021.

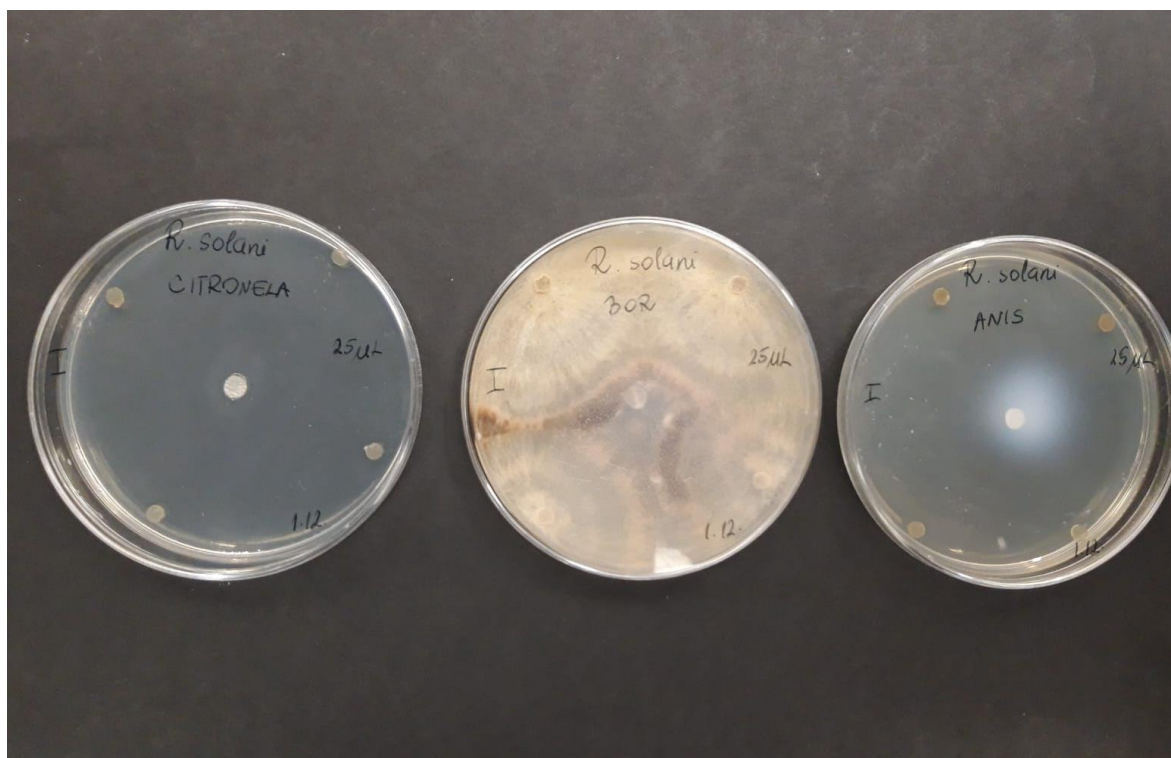
Tablica 4. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* pri različitim temperaturama osmi dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

ULJE	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	30
BOR	0	0	3,33
CIMET KORA	30	18,33	30
CITRONELA	30	20,58	30
ČAJEVAC	30	30	29,25
ČEMPRES	0	0	13,33
EUKALIPTUS	17,92	0	2,08
KLINČIĆ	0	0	0
LAVANDA	30	0	27
NARANČA SLATKA	0	0	0
RUŽMARIN	4,83	0	30
TIMIJAN	30	30	30
LSD 0,05	8,58	8,76	5,12
0,01	11,62	11,87	6,93

Uspoređuje li se djelovanje pojedinih ulja iz rezultata vidljivo je da su na svim temperaturama ulja anisa i timijana u potpunosti inhibirala porast micelija. Na temperaturi 15 °C ulja anisa, cimeta kore, citronele, čajevca, lavande i timijana su vrlo značajno jače inhibirala porast gljive u odnosu na ostala ulja. Na 20 °C ulja anisa, čajevca i timijana pokazala su vrlo značajno jače antifungalno djelovanje u odnosu na sva ostala ulja, a na 30 °C ulja anisa, cimeta, citronele, čajevca, lavande ružmarina i timijana.

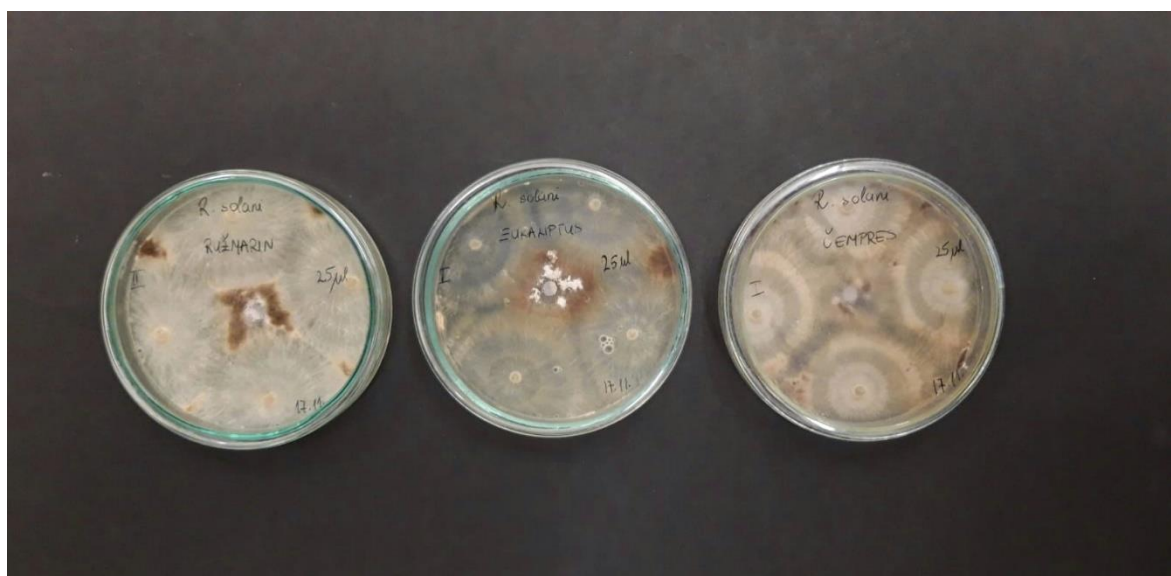
Na 20 °C ulja kore cimeta i citronele imala su značajno slabije djelovanje od ulja anisa, čajevca i timijana, ali i vrlo značajno bolje u odnosu na ulja bora, čempresa, eukaliptusa, klinčića, lavande, naranče slatke i ružmarina.

Antifungalno djelovanje ulja citronele, bora i anisa 8. dan od nacjepljivanja na temperaturi 15 °C prikazano je na slici 14, a djelovanje ulja ružmarina, eukaliptusa i čempresa na 20 °C na slici 15.



Slika 14. Antifungalni učinak ulja citronele, bora i anisa 8. dan od nacepljivanja na 15°C

Izvor: Ereš, H. 2021.



Slika 15. Antifungalni učinak ulja ružmarina, eukaliptusa i čempresa 8. dan na 20°C

Izvor: Ereš, H. 2021.

4.3. Usporedba antifungalnog djelovanja eteričnih ulja po temperaturama četvrti dan od inokulacije

Fungistatičan učinak eteričnih ulja na porast micelija gljive *R. solani* usporedno prema temperaturama prikazan je u tablici 5.

Četvrti dan od naciepljivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike između djelovanja na temperaturama 15, 20 i 30 °C za ulja anisa, bora, cimeta, citronele, čajevca, klinčića, lavande i timijana. Ulje čempresa je na temperaturi 20 °C značajno slabije djelovalo u odnosu na djelovanje pri 30 °C. Ulje eukaliptusa je na 20 °C djelovalo značajno slabije u odnosu na djelovanje na 15 i i vrlo značajno slabije u odnosu na 30 °C. Također, ulja naranče slatke i ružmarina imala su najslabije djelovanje na 20 °C i to vrlo značajno slabije u odnosu na djelovanje na temperaturama 15 i 30 °C.

Tablica 5. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama četvrti dan od naciepljivanja

ULJE	15 °C	20 °C	30 °C	LSD 0,05 0,01
ANIS	30	30	30	0,00 0,00
BOR	16,17	9,92	20,67	11,39 17,26
CIMET KORA	30	28,83	30	2,09 3,16
CITRONELA	30	27,92	30	4,16 6,31
ČAJEVAC	30	30	30	0,00 0,00
ČEMPRES	21,5	19,58	28,33	7,06 10,70
EUKALIPTUS	24,67	9,17	27,08	11,43 17,31
KLINČIĆ	19,33	19,25	21,25	2,62 3,96
LAVANDA	30	21,75	30	8,78 13,30
NARANČA SLATKA	11,33	5	17,08	3,26 4,94
RUŽMARIN	30	13,92	30	4,00 6,06
TIMIЈAN	30	30	30	0,00 0,00

4.4. Usporedba antifungalnog djelovanja eteričnih ulja po temperaturama osmi dan od inokulacije

Fungistatičan učinak eteričnih ulja na porast micelija gljive *R. solani* usporedno prema temperaturama prikazan je u tablici 6.

Uspoređujemo li djelovanje ulja na različitim temperaturama iz rezultata je vidljivo da osmi dan od naciepljivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike u djelovanju ulja anisa, bora, cimeta, citronele, čajevca, klinčića, naranče slatke i timijana.

Ulja čempresa i ružmarina su nakon osam dana vrlo značajno jače inhibirala porast gljive na 30 °C u odnosu na djelovanje na 15 i 20 °C. Ulje lavande je na 15 i 30 °C vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na 20 °C.

Tablica 6. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama osmi dan od naciepljivanja

ULJE	15 °C	20 °C	30 °C	LSD 0,05 0,01
ANIS	30	30	30	0,00 0,00
BOR	0	0	3,33	6,99 10,09
CIMET KORA	30	18,33	30	18,50 28,02
CITRONELA	30	20,58	30	9,46 14,33
ČAJEVAC	30	30	29,25	1,04 1,58
ČEMPRES	0	0	13,33	8,57 12,98
EUKALIPTUS	17,92	0	2,08	18,38 27,84
KLINČIĆ	0	0	0	0,00 0,00
LAVANDA	30	0	27	3,33 5,04
NARANČA SLATKA	0	0	0	0,00 0,00
RUŽMARIN	4,83	0	30	9,66 14,63
TIMIЈAN	30	30	30	0,00 0,00

5. RASPRAVA

Jačina antifungalnog djelovanja ulja ovisi o vrsti eteričnog ulja, primjenjenoj količini, načinu djelovanja (kontaktno, volatilno), ali i o dužini djelovanja te temperaturi okoline (Ćosić i sur., 2014.). U pravilu se učinak ulja smanjuje s produženjem vremena inkubacije. Takav trend utvrđen je i u ovome istraživanju s iznimkom ulja s najjačim antifungalnim djelovanjem (ulja anisa, čajevca i timijana) kod kojih je zona inhibicije nakon osam dana inkubacije jednaka onoj nakon četiri dana. Kod ulja ružmarina na temperaturama 15 i 20 °C zona inhibicije smanjila se nakon osam dana (4,83 mm, 0 mm) u odnosu na zonu inhibicije nakon četiri dana inkubacije (30 mm, 13,92 mm). Za isto ulje pri inkubaciji na 30 °C nije bilo razlike u veličini zone inhibicije nakon četiri i osam dana i u oba slučaja je iznosila 30 mm. Kod ulja čempresa i eukaliptusa na svim temperatura uočljivo je smanjivanje zone inhibicije s produljenjem vremena inkubacije.

Katooli i sur. (2012.) navode da je eterično ulje eukaliptusa u svim koncentracijama potpuno inhibirao rast micelija *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani* nakon 30 dana. U ovome istraživanju ulje eukaliptusa niti pri jednoj temperaturi nije u potpunosti inhibiralo rast gljive *R. solani*. Osam dana od inokulacije postoje razlike u veličini zone inhibicije (17,92 mm, 0 mm, 2,08 mm) no te razlike nisu statistički značajne.

U ovome istraživanju najjače antifungalno djelovanje na svim temperaturama pokazala su ulja anisa, timijana i čajevca. Katooli i sur. (2012.) navode da je u njihovom istraživanju ulje timijana u svim koncentracijama potpuno inhibiralo rast gljiva *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. Vrlo jako antifungalno djelovanje ulja timijana na različite fitopatogene gljive utvrdili su i Zambonelli i sur. (1996.), Yang i Clausen (2007.), a Ćosić i sur. (2010.) navode da pri primjeni ulja u količini 5 µL osim timijana vrlo jako antifungalno djelovanje imaju i ulja anisa, lista cimeta i klinčićevca. Autori navode da je ulje timijana imalo jak antifungalni učinak na *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Diaporthe helianthi*, *Phomopsis phaseoli* (sin. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*), *Phomopsis longicolla*, *Diaporthe neoviticola* (sin. *Phomopsis viticola*), *Bipolaris sorokiniana* (sin. *Helminthosporium sativum*), *Colletotrichum coccodes*, dok nije utvrđeno antifungalno djelovanje na *R. solani*. Ulje anisa imalo je slabije djelovanje od timijana, ali je i to djelovanje bilo statistički značajno bolje u odnosu na kontrolu za sve gljive izuzev *Fusarium graminearum*.

U ovom istraživanju utvrđeno je da ulja naranče slatke, bora i klinčića nisu fungistatično djelovala na ispitivanu gljivu niti na jednoj temperaturi. Slabo djelovanje ulja bora utvrdili su i Ćosić i sur. (2010.) i Lee i sur. (2007.). Ćosić i sur. (2010.) navode da je ulje bora primjenjeno u količini 5 μ L stimuliralo rast micelija *Diaporthe helianthi* i *Bipolaris sorokiniana* dok Lee i sur. (2007.) navode da ulje naranče slatke nije imalo inhibitorni učinak na *R. solani*, ali niti na razvoj gljiva *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Pythium ultimum*.

Za razliku od gore navedenog, Singh i sur. (1992.) utvrdili su dobar antifungalni utjecaj eteričnog ulja slatke naranče na velik broj uzročnika biljnih bolesti. Autori navode da je ulje naranče slatke imalo jako fungistatično djelovanje na *Helminthosporium oryzae*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Colletotrichum falcatum*, dok je potpuno inhibiralo rast *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *R. solani*, *Pythium debaryanum* i *Colletotrichum gloeosporioides*.

6. ZAKLJUČAK

Budući da je sve značajniji trend izbjegavanja kemijskih fungicida i ekološki uzgoj biljaka, eterična ulja svojim su djelovanjem potencijalni alternativni pristup zaštiti od uzročnika biljnih bolesti.

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata o utjecaju eteričnih ulja i temperature na porast micelija fitopatogene gljive *R. solani* u *in vitro* uvjetima može se zaključiti:

1. Potpuna inhibicija porasta micelija gljive *R. solani* utvrđena je kod primjene ulja anisa, čajevca i timijana pri svim navedenim temperaturama i neovisno o dužini trajanja inkubacije (zona inhibicije 30 mm).
2. Najslabiji antifungalni utjecaj imalo je ulje naranče slatke, a potom slijede ulja klinčića, bora, čempresa i eukaliptusa.
3. Kod ulja ružmarina na temperaturama 15 i 20 °C zona inhibicije se smanjila nakon osam dana (4,83 mm, 0 mm) u odnosu na zonu inhibicije nakon četiri dana inkubacije (30 mm, 13,92 mm). Za isto ulje pri inkubaciji na 30 °C nije bilo razlike u veličini zone inhibicije nakon četiri i osam dana i u oba slučaja je iznosila 30 mm.
4. Kod ulja čempresa i eukaliptusa na svim temperatura uočljivo je smanjivanje zone inhibicije s produljenjem vremena inkubacije
5. Istraživanja antifungalnog djelovanja eteričnih ulja potrebno je i dalje provoditi u *in vitro*, ali i *in vivo* uvjetima što potencijalno može dovesti do rezultata koji će biti osnova za proizvodnju biofungicida.

7. LITERATURA

1. Ajayi-Oyetunde, O. O., Bradley, C. A. (2018.): *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant pathology*, 67(1), 3-17.
2. Al-Reza, S. M., Rahman, A., Ahmed, Y. , Kang, S. C. (2010.): Inhibition of Plant Pathogens *In Vitro* and *In Vivo* wiht Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96: 86-92.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008.): Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
4. Banville GJ, (1989.): Yield losses and damage to potato plants caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *American Potato Journal* 66, 821–34.
5. Baysal-Gurel, F., Liyanapathirana, P., Addesso, K. M. (2020.): Effect of Brassica crop-based biofumigation on soilborne disease suppression in woody ornamentals. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(1), 94-106.
6. Carling, D. E., Leiner, R. H. (1990.): Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology (USA)*.
7. Carling, D.E., Kuninaga, S., Brainard, K.A. (2002.): Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. *Phytopathology* 92, 43–50.
8. Conner, D. E. (1993.): Naturally occuring compounds. *Antimicrobials in foods*, 441-468.
9. Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., Ravlić, M. (2010.): In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda*, 16(2): 25-28.
10. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D. (2014.): The Effect of Essential Oils on the Development of Phytopathogenic Fungi. U knjizi Sharma N. i sur. „Biological Controls for Preventing Food Deterioration – Strategies for Pre- and Postharvest Management“, 273-292. Wiley Blackwell, UK.
11. De Curtis, F., Lima, G., Vitullo, D., & De Cicco, V. (2010.): Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* on tomato by delivering antagonistic bacteria through a drip irrigation system. *Crop Protection*, 29(7), 663-670.

12. Giordani, C., Simonetti, G., Natsagdorj, D., Choijamts, G., Ghirga, F., Calcaterra, A., Quaglio, D., De Angelis, G., Toniolo, C., Pasqua, G. (2020.): Antifungal activity of Mongolian medicinal plant extracts. *Natural Product Research*, 34(4), 449-455.
13. Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Portugal, H. (2005.): Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans* potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* 18(12):990-995.
14. Handique, A. K., Singh, H. B. (1990.): Antifungal action of lemongrass oil on some soil-borne plant pathogens. *Indian Perfumer*, 34(3): 232-234.
15. Holmes, G. L., Eckert, J. W. (1999.): Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to post harvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89(9): 716–721.
16. Ivić, D., Cvjetković, B. (2010.): Smeđa trulež korijena (*Rhizoctonia solani*) – sve značajnija bolest šećerne repe. *Glasilo biljne zaštite*, 9(3):183-186.
17. Jaiswal, A. K., Elad, Y., Graber, E. R., Frenkel, O. (2014.): *Rhizoctonia solani* suppression and plant growth promotion in cucumber as affected by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 110-118.
18. Jasnić, S., Bagi, F., Stojšin, V. (2006.): *Rhizoctonia solani* prouzrokovatelj mrke truleži korena šećerne repe – rasprostranjenost i značaj. *Zbornik Radova - A Periodical of Scientific Research on Field & Vegetable Crops*, 42(1).
19. Jimbo, D., Kimura, Y., Taniguchi, M., Inoue, M., Urakami, K. (2009.): Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics*, 9(4), 173-179.
20. Katooli, N., Maghsoldo, R., Honari, H., Razavi, S. (2012.): Fungistatic activity of Essential oil of Thyme and Eucalyptus against of Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1(1): 1-4.
21. Khedher, SB, Kilani-Feki, O., Dammak, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Tounsi, S. (2015.): Učinkovitost *Bacillus subtilis* V26 kao biološke kontrole protiv *Rhizoctonia solani* na krumpiru. *Comptes rendus biologiques*, 338 (12), 784-792.
22. Kumar A, Shukla R, Singh P, Shekhar Prasad CH, Kishore Dubey N (2008.): Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9(4):575-580.

23. Lee, S.O., Choi G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C. (2007.): Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plantpathogenic fungi. *Plant Pathol J*, 23(2): 97-102.
24. Lixandru, B.E., Drăcea, N.O., Dragomirescu, C.C., Drăgulescu, E.C., Coldea, I.L., Anton, L., Dobre, E., Rovinaru, C., Codiță, I. (2010.): Antimicrobial activity of plant essential oils against bacterial and fungal species involved in food poisoning and/or food decay. *Roum Arch. Microbiol. Immunol.* 6(4):224-230.
25. Nagaraja, A., Das, I. K. (2016.): Disease resistance in pearl millet and small millets. In *Biotic stress resistance in millets* (pp. 69-104). Academic Press.
26. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013.): Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
27. Palfi, M. (2017.): Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u in vitro uvjetima. Doktorski rad, Sveučilište J.J. Strossmayera i Institut Ruđer Bošković.
28. Parađiković, N., Ćosić, J., Baličević, R., Vrandečić, K., Vinković, T., Ravlić, M. (2012.): Utjecaj kemijskih i bioloških mjera na rast i razvoj presadnica paprike i suzbijanje fitopatogenih gljiva *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. *Glasnik Zaštite Bilja*, 35 (3), 50-56.
29. Parajuli, M., Panth, M., Gonzalez, A., Adesso, K. M., Witcher, A., Simmons, T., Baysal-Gurel, F. (2022.): Cover crop usage for the sustainable management of soilborne diseases in woody ornamental nursery production system. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1-21.
30. Parveen, S., Wani, A. H., Ganie, A. A., Pala, S. A., Mir, R. A. (2014.): Antifungal activity of some plant extracts on some pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(3), 279-284.
31. Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J. (2004.): Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 18(1):73-78.
32. Singh, G., Maurya, S. (2005.): Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils: an overview. 179-192.
33. Singh, G., Upadhyay, R. K., Narayanan, C. S., Padamkumari, K. P., Rao, G. P. (1992.): Fungitoxic activity of volatile oils of *Hyptis suaveolens*. *Fitoterapia*, 63: 462.

34. Sneh B., Burpee L., Ogoshi, A. (1993.): Identification of Rhizoctonia Species. APS Press.
35. Soyulu, E., Soyulu, S., Kurt, S. (2006.): Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja raznih biljaka protiv uzročnika kasne plamenjače rajčice *Phytophthora infestans*. *Mycopatologia*, 161 (2), 119-128.
36. Turek, C., Stintzing, F. C. (2013.): Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53.
37. Westerdijk, C. E., Lamers, J. G., Schneider, J. H. M., Bakker, Y., Petersen, J., Buddemeyer, J., Rippel, R. (2004.): Strategies to control *Rhizoctonia solani* in sugar beet. In *Proceedings of the 67th IIRB Congress, Brussels, 11–12, February* (pp. 319-24).
38. Yang, X. B., Berggren, G. T., Snow, J. P. (1990.): Types of *Rhizoctonia* foliar blight on soybean in Louisiana. *Plant disease*, 74: 501-504.
39. Yang, V.W., Clausen, C.A.(2007.): Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *Int Biodeter Biodegr* 59:302-306.
40. Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A., Albasini A. (1996.): Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi In Vitro. *Journal of Phytopathology*, 144(9-10): 491-494.
41. Zhang, Y., Li, S., Li, H., Wang, R., Zhang, K. Q., Xu, J. (2020.): Fungi–nematode interactions: Diversity, ecology, and biocontrol prospects in agriculture. *Journal of Fungi*, 6(4), 206.
42. Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. (1995.): Comparative study on the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(2): 113-118.

8. SAŽETAK

Cilj je ovog rada u *in vitro* uvjetima utvrditi utjecaj temperature (15, 20 i 30 °C) i dvanaest eteričnih ulja (anis, bor, cimet kora, citronela, čajevac, čempres, eukaliptus, klinčić, lavanda, naranča slatka, ružmarin i timijan) u količini 25 µL na rast micelija fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*. Zona inhibicije mjerena se četvrti i osmi dan od inokulacije. Najjače antifungalno djelovanje imala su ulja anisa, čajevca i timijana pri svim navedenim temperaturama i neovisno o duljini trajanja inkubacije. S druge strane, ulja naranče slatke, bora i klinčića uopće su imala slabo ili nisu imala negativno djelovanje na rast gljive. Kod nekih ulja (ružmarin, čempres, eukaliptus) utvrđeno je da učinak ovisi o temperaturi i/ili duljini inkubacije.

Ključne riječi: *Rhizoctonia solani*, eterična ulja, temperatura, antifungalni učinak

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of temperature (15, 20 and 30 °C) and twelve essential oils (anise, pine, cinnamon bark, citronella, tea tree, cypress, eucalyptus, clove, lavender, sweet orange, rosemary and thyme) on the growth of mycelium of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* *in vitro*. The study was conducted using 25 µL of essential oils. The zone of inhibition was measured on the fourth and eighth day of incubation. The strongest antifungal effect had the essential oil of anise, tea tree and thyme at all temperatures and regardless of duration of incubation. On the other hand, sweet orange, pine and clove oil had small or no negative effect on mycelial growth. For some oils such as rosemary, cypress and eucalyptus it has been found that the effect depends on the temperature and/or duration of incubation.

Key words: *Rhizoctonia solani*, essential oils, temperature, antifungal activity

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* u odnosu na kontrolu pri različitim temperaturama četvrti dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* pri različitim temperaturama četvrti dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

Tablica 3. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* u odnosu na kontrolu pri različitim temperaturama osmi dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

Tablica 4. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *R. solani* pri različitim temperaturama osmi dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

Tablica 5. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama četvrti dan od nacjepljivanja

Tablica 6. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama osmi dan od nacjepljivanja

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Čista kultura gljive *R. solani* (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 2. Bušenje kulture *R.solani* pomoću metalnog kružnog rezača (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 3. Uzimanje uzorka čiste kulture pomoću laboratorijske igle (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 4. Postavljanje čiste kulture gljive na hranjivu podlogu i označena mjesta (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 5. Aplikacija eteričnog ulja pomoću mikropipete (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 6. Petrijeve zdjelice u termostat komori (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 7. Mjerenje zone inhibicije (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 8. Eterično ulje anisa i timijana u odnosu na kontrolu 4. dan od naciepljivanja na 15°C (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 9. Eterično ulja naranče slatke i klinčića u odnosu na kontrolu na 20°C (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 10. Antifugalni učinak ulja citronele, čajevca i lavande 4. dan od naciepljivanja na 30°C (Izvor: Ereš, H. 2022.)

Slika 11. Antifungalni učinak ulja lavande, naranče slatke i klinčića 4. dan od naciepljivanja na 30°C (Izvor: Ereš, H. 2022.)

Slika 12. Porast micelija kod primjene eteričnog ulja klinčića 8. dan od naciepljivanja na 15°C (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 13. Antifungalni učinak eteričnog ulja timijana i klinčića u odnosu na kontrolu 8. dan od naciepljivanja na 15°C (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 14. Antifungalni učinak ulja citronele, bora i anisa 8. dan od naciepljivanja na 15°C (Izvor: Ereš, H. 2021.)

Slika 15. Antifungalni učinak ulja ružmarina, eukaliptusa i čempresa 8. dan na 20°C (Izvor: Ereš, H. 2021.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*

Helena Ereš

Sažetak:

Cilj je ovog rada u *in vitro* uvjetima utvrditi utjecaj temperature (15, 20 i 30 °C) i dvanaest eteričnih ulja (anis, bor, cimet kora, citronela, čajevac, čempres, eukaliptus, klinčić, lavanda, naranča slatka, ružmarin i timijan) u količini 25 µL na rast micelija fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*. Zona inhibicije mjerena se četvrti i osmi dan od inokulacije. Najjače antifungalno djelovanje imala su ulja anisa, čajevca i timijana pri svim navedenim temperaturama i neovisno o duljini trajanja inkubacije. S druge strane, ulja naranče slatke, bora i klinčića uopće su imala slabo ili nisu imala negativno djelovanje na rast gljive. Kod nekih ulja (ružmarin, čempres, eukaliptus) utvrđeno je da učinak ovisi o temperaturi i/ili duljini inkubacije.

Rad je izrađen: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentorica: prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Broj stranica: 32

Broj slika: 15

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 42

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Rhizoctonia solani*, eterična ulja, temperatura, antifungalni učinak

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednica
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentorica
3. prof. dr. sc. Renata Baličević, članica

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Graduate studies, Course Plant protection

Graduate Thesis

Influence of temperature and essential oils on growth of phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*

Helena Ereš

Abstract:

The aim of this study was to determine the effect of temperature (15, 20 and 30 °C) and twelve essential oils (anise, pine, cinnamon bark, citronella, tea tree, cypress, eucalyptus, clove, lavender, sweet orange, rosemary and thyme) on the growth of mycelium of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani in vitro*. The study was conducted using 25 µL of essential oils. The zone of inhibition was measured on the fourth and eighth day of incubation. The strongest antifungal effect had the essential oil of anise, tea tree and thyme at all temperatures and regardless of duration of incubation. On the other hand, sweet orange, pine and clove oil had small or no negative effect on mycelial growth. For some oils such as rosemary, cypress and eucalyptus it has been found that the effect depends on the temperature and/or duration of incubation.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Number of pages: 32

Number of figures: 15

Number of tables: 6

Number of references: 42

Number of attachments: 0

Original in: Croatian

Key words: *Rhizoctonia solani*, essential oils, temperature, antifungal activity

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, president
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. prof. dr. sc. Renata Baličević, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Science Osijek, Josip Juraj Strossmayer
University of Osijek, Vladimira Preloga 1