

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Irena Brajković

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

ANTIFUGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA MATIČNJAKA I MIRTE

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Irena Brajković

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

ANTIFUGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA MATIČNJAKA I MIRTE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentor
3. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, član

Osijek, 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Priprema PDA podloge.....	12
3.2. Provođenje pokusa.....	13
4. REZULTATI.....	15
5. RASPRAVA	19
6. ZAKLJUČAK	21
7. POPIS LITERATURE	22
8. SAŽETAK.....	27
9. SUMMARY	28
10. POPIS TABLICA	29
11. POPIS SLIKA	30
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Poljoprivredni proizvođači i potrošači poljoprivrednih proizvoda sve se više brinu o zaštiti okoliša i zdravlju konzumenata iz čega proizlazi potreba za razvojem manje opasnih i ekološki prihvatljivih metoda za suzbijanje uzročnika bolesti. U tu se svrhu sve više istražuje potencijalno fungistatično ili fungicidno djelovanje eteričnih ulja što bi se u budućnosti moglo iskoristiti za proizvodnju bioloških fungicida. Pesticidi su potencijalni zagađivači prirodne sredine pa je za proizvodnju zdravstveno, nutritivno i tehnološki sigurnih proizvoda neophodno uvođenje novih tehnologija zaštite bilja. Prekomjerna upotreba fungicida može dovesti do razvoja otpornih populacija patogena (Da Cruz Cabral i sur., 2013.) i zagađenja okoliša te je to povećalo pritisak javnosti da se smanji uporaba sintetičkih fungicida (Bhagwat i Datar, 2014.). Višekratnom uporabom fungicida u dužem vremenskom periodu može također akumulirati rezidue u hrani iznad dopuštene količine (Ogah i sur., 2011.). Ove nuspojave promovirale su potragu za novim i alternativnim agrokemikalijama (Combrink i sur., 2011.).

Eterična ulja su sekundarni metaboliti biljaka važni za biljnu obranu jer često posjeduju antimikrobna svojstva (Hyltdgaard i sur., 2012.). Vrlo su značajni kao potencijalna osnova alternativnih metoda u zaštiti bilja jer imaju antifungalna, antibakterijska, antivirusna i insketicidna svojstva (Bassole i Juliani, 2012.). Ekstrakti različitih eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti dobivenih iz biljaka mogli bi biti dobra osnova za proizvodnju spojeva koji bi bili zamjena sintetskim fungicidima (Kishore i Pande, 2004.). Eterična ulja smanjuju rast hifa gljive i potiču degradaciju stanične membrane gljiva. Inhibicija rasta pomoću eteričnih ulja uzrokuje promjene u sastavu stanične stijenke, poremećaje plazmene membrane, dezorganizaciju mitohondrijske strukture i narušavanje enzimske reakcije u mitohondrijskoj membrani kao što su transport elektrona, transport protona i utječe na fosforilaciju odnosno na sintezu ATP-a (Knobloch, 1989.).

Fitopatogene gljivice su biljni patogeni koji izazivaju smanjenje ili potpuni gubitak prinosa i kvalitete pa time nanose veliku ekonomsku štetu poljoprivrednicima. U cilju pronalaska novih i ekološki prihvatljivih biofungicida provode se mnoga ispitivanja antifungalnih svojstava različitih eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na važne fitopatogene gljivice (Ćosić i sur., 2010.; Vitoratos i sur., 2013.). Brojne fitopatogene gljive stvaraju sekundarne metabolite kao što su mikotoksini. Razvojem analitičkih metoda, u porastu je

broj identificiranih mikotoksina. Utvrđeno je da eterična ulja mogu utjecati na smanjenje stvaranja mikotoksina zearalenona, deoksinivalenola i fumizona B (Velluti i sur., 2003.; Marin i sur., 2004.).

Cilj ovog rada je utvrditi učinak eteričnih ulja matičnjaka i mirte na porast micelija osam fitopatogenih gljiva.

2. PREGLED LITERATURE

Prema Dimitrovom (2000.) i definiciji iz Hrvatskoga općeg leksikona eterična ulja su hlapljive tvari jaka mirisa koje se nalaze u biljkama; smjesa su različitih organskih spojeva, većinom terpena; najviše se proizvode destilacijom biljnog materijala vodenom parom, a nose imena biljaka od kojih potiču (npr. ružino, lavandino, metvičino ulje) te služe u prehrambenoj industriji, parfumerji i medicini.

Eterična ulja se nalaze u različitim dijelovima biljke: lišću (eukaliptus), kori (cimet), laticama (ruža), korijenju (vetiver), citrusnoj kori (limun), sjemenkama (kim), neživom dijelu srčike (sandal), u rizomima (valerijana), nadzemnim ili vršnim dijelovima biljke (mažuran) te u smoli. U radu Wildwood (2002.) govori da su eterična ulja omalovažavana kao „otpadni nusproizvodi“ biljnog metabolizma dok nasuprot tome znanstvena istraživanja su dokazala da ih biljke koriste za zaštitu od bolesti, odbijanje grabežljivaca te privlačenje kukaca za oprašivanje.

Fitopatogene gljive uzrokuju oko 75 % biljnih bolesti, a svi ostali uzročnici bolesti uključujući viruse i bakterije preostalih 25 %.. Eukariotski su organizmi koji prodiru u biljku na tri načina: prodiranje kroz nastale mehaničke ozljede tkiva, izravno prodiranje kroz neozlijeđeno tkivo i prodiranje kroz prirodne otvore biljke. Do danas je poznato oko 100 000 vrsta gljiva od kojih 10 000 vrsta uzrokuje bolesti kod biljaka. Svaka od navedenih fitopatogenih gljiva može napasti jednu ili više vrsta biljaka.

Fitopatogena gljiva *Macrophomina phaseolina*, uzročnik suhe truleži, fakultativni je parazit, široko je rasprostranjena te prisutna u uzgojnim područjima šećerne repe, soje, kukuruza, lucerne, duhana i mnogih drugih biljnih vrsta. Biljke domaćine napada u različitim stadijima razvoja, a simptomi se javljaju u obliku nekrotičnih pjega, promjene boje na prizemnom dijelu stabljika i korijenu te venuću biljke i pojavi suhe (ugljenaste) truleži na napadnutim dijelovima biljaka.

Monilia laxa uzročnik je paleži cvjetova i mladica najčešće kod koštuničastog voća, a može se pojaviti u dva oblika: trulež plodova i sušenje cvjetova i mladica. Simptomi se javljaju u obliku tamnog posmeđenja mladica, propadanja i sušenja procvatnih cvjetova, a na plodovima se javljaju smeđe pjege koje se vrlo brzo šire i tako brzo zahvaćaju cijeli plod koji propada.

Alternaria helianthi izaziva crno smeđu koncentričnu pjegavost koja je prisutna u svim područjima uzgoja suncokreta. Simptomi su različiti ovisno o dijelu biljke koji je zaražen, na početku zaraze dolazi do pojave okruglih smeđih pjega na listovima koje su rasute bez ikakvog reda. Pjege se vremenom povećavaju i kod jače zaraze dolazi do sušenja lista. Na peteljkaama dolazi do pojave nekrotičnih uzdužnih pjega dok se na stabljikama javljaju izdužene crne ili smeđe pjege, a ako je prisutan veći broj pjega može doći do njihovog spajanja i loma stabljike. *A. helianthi* može zaraziti i sjeme.

Fitopatogena gljiva *Alternaria radicina* uzročnik je crne pjegavosti i truleži i to najčešće se pojavljuje na mrkvi, ali još ju možemo pronaći i na celeru, kimu i peršinu. Simptomi se pojavljuju na lišću, stabljikama i korijenu u svim razvojnim stadijima biljke. Na lišću dolazi do pojave tamnih pjega koje spajanjem uzrokuju sušenje lišća. Zaraženi dijelovi na korijenu mrkve su jasno odijeljeni od zdravog dijela i crne su boje. *A. radicina* najčešće se širi zaraženim sjemenom.

Sclerotium cepivorum je fitopatogena gljiva koja se prenosi zaraženim tлом, a uzročnik je bijele truleži luka te parazitira veliki broj domaćina iz porodice *Allium*. Simptomi se mogu pojaviti tijekom cijele vegetacije. Prvi znak bolesti je žućenje listova, zatim dolazi do njihove nekroze i to od vrha lišća prema dolje. Zaražene lukovice postaju trule, prekrivene su voštanim, sivo-bijelim micelijem, miris lukovice je neugodan.

Sclerotinia sclerotiorum polifagni je uzročnik bijele truleži. Parazitira više od 400 biljnih vrsta. Simptomi se mogu javiti na listovima, korijenu, stabljici ili plodovima. Zaraženi korijen je vodenast, trune i raspada se te se na njemu razvija gusti bijeli micelij. Zaraženo biljno tkivo stabljike je tamnije i vodenasto, brzo nekrotizira i postaje sivo do sivo-smeđe boje. Zaražena stabljika se može prelomiti. Zaraženi plodovi koji sadrže veće količine vode, kao što su na primjer plodovi rajčice, tkivo brzo trune (Ivić, 2016.).

Fitopatogena gljiva *Botrytis cinerea* uzročnik je sive plijesni. Parazitira veliki broj biljnih vrsta kao što su soja, duhan, uljana repica, salata, rajčica, paprika, sve tikvenjače, krizanteme i dr. Simptomi bolesti javljaju se na lišću, stabljici, cvjetovima i plodovima. Na stabljici, lišću i cvjetovima su to simptomi u vidu paleži ili nekroze, a na plodovima su to pjege i trulež. U slučajevima jačeg razvoja bolesti na zaraženim organima može se javiti i sivo-smeđi micelij gljive s konidioforima i brojnim konidijama, po kojem je bolest i dobila ime (Miličević, 2016.).

Verticillium dahliae fitopatogena je gljiva koja ako je prisutna u tlu te biljke inficira putem korijena, a potom se širi u nadzemne dijelove gdje dovodi do začepljenja i nekroze provodnih tkiva biljke te posljedično dovodi do sušenja cijele biljke ili pojedinih dijelova. Razlikuju se dva patotipa *V. dahliae*. Prvi može izazvati potpuno otpadanje zelenih listova (defolijaciju) i venuće na zahvaćenom dijelu biljke ili na cijeloj biljci, a drugi uzrokuje naglo sušenje (apopleksiju) ili postupno sušenje pojedinih grana ili čitavih mladih biljaka, no bez otpadanja listova (Moral i sur. 2010).

Posljednjih godina sve je veći interes za upotrebu prirodnih tvari, a neka pitanja koja se tiču sigurnosti sintetskih spojeva potaknula su detaljnije studije biljnih resursa. Eterična ulja, mirisni i isparljivi proizvodi biljnog sekundarnog metabolizma imaju široku primjenu u narodnoj medicini, aromatiziranju i konzerviranju hrane kao i u industriji mirisa. Antimikrobna svojstva eteričnih ulja poznata su već mnogo stoljeća. U vremenskom razdoblju od 1987. do 2001. godine u više od 500 radova ispitan je velik broj eteričnih ulja i njihovih sastojaka kako bi se utvrdila antimikrobna svojstva koja je moguće iskoristiti protiv bakterija i gljivica. U radu Kalemba i Kunick (2003.) razmatraju klasične metode koje se obično koriste za ocjenu antibakterijskih i antigljivičnih aktivnosti eteričnih ulja. Opisani su metoda difuzije agar (papirni disk i jažica) i metoda razrjeđivanja (agar i tekući bujon), kao i turbidimetrijsko i impedimetrijsko praćenje rasta mikroorganizama u prisutnosti testiranih eteričnih ulja. U radu razmatraju čimbenike koji utječu na *in vitro* antimikrobno djelovanje eteričnih ulja i na mehanizme djelovanja eteričnih ulja na mikroorganizme. Ovaj rad daje pregled osjetljivosti bakterija i gljivica na različita eterična ulja i njihove sastojke. Utvrđeno je da su eterična ulja začinskog i ljekovitog bilja (timijan, origano, menta, cimet, salvija i klinčić) među uljima s najjačim antimikrobnim djelovanjem.

Eterična ulja se proučavaju zbog dobrog biološkog djelovanja na različite uzročnike bolesti ljudi, biljaka i životinja. Veliki broj eteričnih ulja uz snažno djelovanje protiv bakterija, insekata i nematoda također imaju snažno antifungalno djelovanje. Protiv širokog raspona broja fitopatogenih gljiva mnoga eterična ulja biljnog porijekla u *in vitro* i *in vivo* uvjetima pokazuju antifungalni učinak. Znanstveno je dokazano da brojna eterična ulja i njihove komponente negativno djeluju na rast micelija mnogih fitopatogenih gljiva. U *in vitro* uvjetima poneka eterična ulja jače ili slabije djeluju protiv fitopatogenih gljiva koje uzrokuju razne bolesti biljaka, dok neka ulja na porast micelija pojedinih gljiva imaju stimulatивно djelovanje. Antifungalni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti gljive, kemijskom

sastavu ulja koji je u vezi s biljnom vrstom iz koje je ulje dobiveno i njezinim zemljopisnim porijeklom, o primijenjenoj količini ulja i o načinu aplikacije (Ćosić i sur., 2014.)

Trenutna upotreba sintetičkih kemikalija za kontrolu insekata i člankonožaca izaziva nekoliko problema vezanih za okoliš i zdravlje ljudi. Alternativa je upotreba prirodnih proizvoda koji imaju dobru učinkovitost i ekološki su prihvatljivi. Među tim kemikalijama eterična ulja biljaka iz nekoliko vrsta su temeljito testirana kako bi se ocjenila njihova repelentna svojstva kao vrijedan prirodni resurs za upotrebu u zaštiti bilja. Nerio i sur. (2010.) su glavni fokus ovog pregleda usmjerili na eterična ulja čija su repelentna djelovanja dokazana, kao i važnost sinergijskih učinaka među njihovim sastojcima. Eterična ulja su isparljive mješavine ugljikovodika s različitim funkcionalnim skupinama, a njihovo repelentno djelovanje povezano je s prisutnošću monoterpena i seskviterpena. Međutim, u nekim slučajevima, ove kemikalije mogu djelovati sinergistički, poboljšavajući njihovu učinkovitost. Uz to, upotreba drugih prirodnih proizvoda u smjesi, poput vanilina, može produžiti vrijeme zaštite, potencirajući repelentni učinak nekih eteričnih ulja. Među eteričnim uljima koja obećavaju kao repelenti su ulja *Cymbopogon* spp. (limunska trava), *Ocimum* spp. (bosiljak) i *Eucalyptus* spp. (eukaliptus) koji su također i najviše citirani u znanstvenim radovima. Pojedinačni spojevi prisutni u tim mješavinama s visokom repelentnom aktivnošću uključuju α -pinene, limonen, citronelol, citronelal, kamfor i timol. Konačno, iako se s ekonomskog stajališta sintetičke kemikalije još uvijek češće koriste kao repelenti nego eterična ulja, ovi prirodni proizvodi su učinkoviti i sigurni za ljude i okoliš.

Važna karakteristika eteričnih ulja jest ta da usporavaju biosintezu ergosterola, koji predstavlja specifični sterol gljiva, čineći ih specifičnima za ciljane gljive (Ćosić i sur., 2010., Amini i sur., 2012., Kedia i sur., 2015., Li i sur., 2017.).

Antifungalni učinak eteričnih ulja *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, *Eucalyptus* sp. i *Foeniculum vulgare* na gljive *Penicillium expansum*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Botrytis cinerea* na jabukama ispitivali su Yilmaz i sur. (2016.). Autori su utvrdili da je najučinkovitije djelovanje protiv ispitivanih gljiva u pokusima *in vitro* i *in vivo* imalo eterično ulje origana. Silazni redoslijed antifungalne aktivnosti eteričnih ulja bio je od eukaliptusa preko komorača i kadulje do eteričnog ulja ružmarina.

U uvjetima *in vitro* utvrđeno je da su minimalne djelotvorne količine eteričnoga ulja *Mentha piperita* različite ovisno o vrsti patogena, te u radu Moghaddama i sur. (2013.) navode da sedam dana nakon primjene ulja u različitim količinama od 800 ppm i 1600 ppm dolazi do djelomične inhibicije rasta micelija gljive *Drechlera spicifera*, dok je do potpune inhibicije rasta micelija gljive *Fusarium oxysporum* f.sp.*ciceris* došlo kod primjene ulja u količini 1600 ppm.

U ispitivanju inhibicijske snage komorača (*Foeniculum vulgare*) i origana (*Origanum vulgare*) na gljivu *Sclerotinia sclerotiorum* Soylu i sur. (2017.) utvrdili su da je jači inhibitorni učinak imalo eterično ulje komorača, dok je ispitivanjem antifungalnih svojstava eteričnog ulja duglazije (*Pseudosuga menziesii*) utvrđeno da je najosjetljivija gljiva od svih ispitivanih bila *Phomopsis helianthi*, dok su vrste roda *Penicillium* i *Microsporum canis* bile najotpornije. Prema istraživanju Teševića i sur. (2009.) minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) eteričnog ulja duglazije bila je, ovisno o vrsti gljive, od 1,5 do 4 µg/mL što nas dovodi do zaključka da različita eterična ulja djeluju različito na istu patogenu gljivu.

Osim ispitivanih patogena i vrste eteričnih ulja inhibicijsko djelovanje na fitopatogene gljive ovisi i o primijenjenim količinama eteričnih ulja (Park i sur., 2017.).

U ispitivanju djelovanja eteričnih ulja *Origanum vulgare* (origano), *Monarda didyma* (monarda) i *Thymus* (timijan) protiv uzročnika sive plijesni jagoda (*Botrytis cinerea*) Adebayo i sur. (2013.) utvrđuju da učinak eteričnih ulja na rast gljive *Botrytis cinerea* ovisi o primijenjenim dozama. Antifungalno djelovanje *Monarda didyma* i *Origanum vulgare* je bilo zadovoljavajuće tek primjenom u količini 51,2 µg/mL, dok ulje timijana je potpuno inhibiralo porast micelija pri količini 200 µg/mL.

Ispitivanjem inhibitorne aktivnosti eteričnih ulja kao alternativa fungicidima na rast zemljišnih gljiva *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Neocosmospora solani*, *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Phytium* sp. i *Phytophthora* sp. El-Mohmayed i sur. (2013.) utvrdili su da je značajno smanjen rast micelija povećanjem primijenjenih količina eteričnih ulja. Potpuna inhibicija rasta gljiva uočena je pri koncentraciji svih testiranih eteričnih ulja od 1,5% dok je minimalni rast micelija utvrđen pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji.

Istraživanjem učinka ekstrakta i glavnih sastojaka eteričnog ulja *Petroselinum crispum* (peršin) na fitopatogenu gljivicu *Colletotrichum acutatum* utvrđeno je da svi ekstrakti, zajedno s eteričnim uljem značajno inhibiraju rast *C. acutatum* u koncentracijama koje su veće od 100 µg/mL. Analiza ulja *P. crispum* je pokazala da je glavna komponenta peršinapiol koja uz to pokazuje značajan inhibitorni učinak protiv istraživane gljive *C. acutatum*. Pineda i sur. (2017.) dolaze do zaključka da peršin može biti dobar izvor spojeva za kontrolu *C. acutatum*.

Handique i Singh (1990.) su testirali antifungalno djelovanje eteričnog ulja limunske trave (*Cymbopogon*) protiv tri biljna patogena: *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Pri primjeni 100 ppm ulja limunske trave porast *Rhizoctonia solani* se smanjio za 67 % dok se rast *S. sclerotiorum* smanjio za 40 %, a eterično ulje limunske trave u količini 100 ppm nije bilo djelotvorno protiv *Sclerotium rolfsii*. Eterično ulje limunske trave primijenjeno u količini 1000 ppm inhibiralo je porast gljiva *R. solani* i *S. sclerotium* te je također uzrokovalo inhibiciju *S. rolfsii* za 80 %.

Viuda i sur. (2007.) istraživali su antifungalni potencijal eteričnih ulja origana (*Origanum vulgare*), timijana (*Thymus vulgaris*) i klinčića (*Syzygium aromaticum*) na dvije plijesni koje su povezane s kvarenjem hrane: *Aspergillus niger* i *Aspergillus flavus*. Za određivanje antifungalne aktivnosti korištena je metoda razrjeđivanja agara. Tri analiza eterična ulja imala su antifungalno djelovanje na obje testirane plijesni. Ulje origana je najjače inhibiralo rast plijesni, a slijede ga ulja klinčića i timijana. *Aspergillus flavus* je bio osjetljiviji na eterično ulje timijana od *Aspergillus niger* dok je ulje klinčića jače inhibiralo rast *Aspergillus niger*.

U laboratorijskom i stakleničkom pokusu se istraživalo herbicidno djelovanje ulja biljnog podrijetla i identificiranje aktivnog sastojka u ulju s herbicidnim djelovanjem. Dvadeset i pet različitih eteričnih ulja primijenjeno je na lišće maslačka u laboratoriju. Eterična ulja crvene majčine dušice, cimeta i klinčića bila su najviše fitotoksična dok su na izbojke bijele lobode, pelinolisnog limundžika i divljeg sirka u stakleniku eterična ulja imala antifungalni utjecaj nakon 1 sat do 1 dan od primjene. Utvrđeno je da eterično ulje cimeta ima visoko herbicidno djelovanje i da je eugenol glavna i aktivna komponenta ovog ulja. Temeljem izloženih rezultata Tworkoski (2017.) navodi da eterična ulja mogu biti korisna kao „prirodni herbicidni proizvodi“ za sustave ekološkog uzgoja.

Ferhout i sur. (1999.) su istraživali utjecaj ulja timijana (*Thymus vulgaris*) i ulja cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) na porast *Malassezia furfur* i *Candida albicans*. Za *M. furfur* je utvrđeno da je osjetljiviji na ulje cimeta dok je *C. albicans* bio osjetljiviji na ulje timijana. Autori su također utvrdili da je aktivnost eteričnog ulja najvećim dijelom posljedica djelovanja njihovih glavnih sastojaka, a koji su u ovom slučaju karvakrol i cinamaldehyd.

Zambonelli i sur. (1996.) testirali su eterična ulja *Thymus vulgaris* (timijan), *Lavandula* (lavanda) i *Mentha piperita* u in vitro uvjetima protiv patogenih gljivica *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium solani* i *Colletotrichum lindemuthianum*. Sva tri testirana ulja inhibiraju porast micelija ispitivanih gljiva. Najučinkovitijim se pokazalo ulje timijana s fungicidnim djelovanjem koje se pripisuje timolu te da ispitivana ulja uzrokuju degeneraciju hifa gljiva.

Antifungalno djelovanje osam eteričnih ulja (*Lavandula sp.*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Coriandrum sativum* i *Laurus nobilis*) testirano je u in vitro uvjetima protiv *Phytophthora cinnamomi* i *Pyrenochaeta lycopersici* te protiv *Verticillium dahliae* koristeći različite količine (do 1600 ppm). Giamperi i sur. (2011.) utvrdili su fungistatično i fungicidno djelovanje ulja, a najefikasnijim eteričnim uljem su bila eterična ulja origana, timijana, paprene metvice i korijandera.

Antifungalno djelovanje četiri eterična ulja *Foeniculum vulgare* (komorač), *Thymus vulgaris* (timijan), *Eugenia caryophyllata* (klinčić) i *Salvia officinalis* (kadulja) testirano je u in vitro uvjetima protiv *Penicillium digitatum*, uzročnika truleži sgruma. Utjecaj ulja na porast gljive ispitan je metodom izravnog kontakta i metodom isparavanja ispitivano je antifungalno djelovanje ova četiri eterična ulja na *P. digitatum* koji je odgovoran za trulež agruma. Najjače antifungalno djelovanje utvrđeno je kod obje metode primjenom obadva ispitivana ulja u količini 600ppm pri čemu su ulja potpuno inhibirala rast micelija gljive. Ulja kadulje i komorača nisu imala nikakvo inhibirajuće djelovanje na ovu gljivu (Omidbaigi i sur., 2007.).

U radu Grgić i sur. (2016.) istraživana je utjecaj 22 eterična ulja (anis, timijan, kim, paprena metvica, lavanda, kadulja, matičnjak, ružmarin, mirta, cimet list, bosiljak, bijeli bor, eukaliptus, cedar, bergamot, mandarina, čempres, pačuli, đumbir, gorka naranča, sandal, kamfor) na porast micelija *Botrytis cinerea*, uzročnika sive plijesni. Pokus je proveden u uvjetima in vitro na PDA podlozi u 2 ponavljanja. Ulja su primijenjena u tri količine (3, 5 i

7 µl), a porast micelija mjeran je nakon 3 i 9 dana. Sva ulja, izuzev ulja gorke naranče, sandala i kamfora, pokazala su određeno antifungalno djelovanje. U odnosu na kontrolu, najbolji učinak imala su ulja timijana i anisa, dok je za ulja gorke naranče, sandala i kamfora utvrđen stimulativni učinak na rast gljive *B.cinerea*.

Eterična ulja *Erigeron canadensis* i *Myrtus communis* testirana su u in vitro uvjetima na porast micelija fitopatogenih gljivica *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* i *Colletrotrichum lindemuthianum*. U ovom istraživanju Curini i sur. (2003.) su utvrdili da oba eterična ulja pokazuju slabu fungicidnu aktivnost. Eterično ulje *Myrtus communis* je inhibiralo rast micelija za 60 % ukoliko je primijenjeno u količini 1600 ppm dok je u istoj količini eterično ulje *Erigeron canadensis* imalo antifungalno djelovanje samo na gljivu *Colletrotrichum lindemuthianum*.

U istraživanju Ozcakmak i sur. (2012.) određen je kemijski sastav eteričnih ulja iz matičnjaka (*Melissa officinalis*) i kadulje (*Salvia officinalis*) pomoću plinske kromatografije / masene spektrometrije (GC / MS) te je utvrđeno da su 1,2-propandiol (31,26%) i α -thujone (24,92 %) glavni sastojci analiziranih eteričnih ulja. Također je ispitan antifungalni učinak ovih eteričnih ulja na gljivu *Penicillium verrucosum*. Kako bi se ispitalo njihovo antifungalno djelovanje, razrijeđenja eteričnih ulja pripremljena su u metanolu u sedam različitih koncentracija. Njihova antifungalna aktivnost određena je s obzirom na minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC) i minimalnu fungicidnu koncentraciju (MFC). Vrijednosti MIC-a matičnjaka i kadulje na *P. verrucosum* ukazuju da je kadulja imala dvostruko jače fungistatično djelovanje protiv *P. verrucosum* u odnosu na ulje matičnjaka. Rezultati ovoga istraživanja sugeriraju da se eterična ulja matičnjaka i kadulje mogu smatrati prirodnim antifungalnim sredstvima koja se mogu koristiti za inaktivaciju *P. verrucosum*.

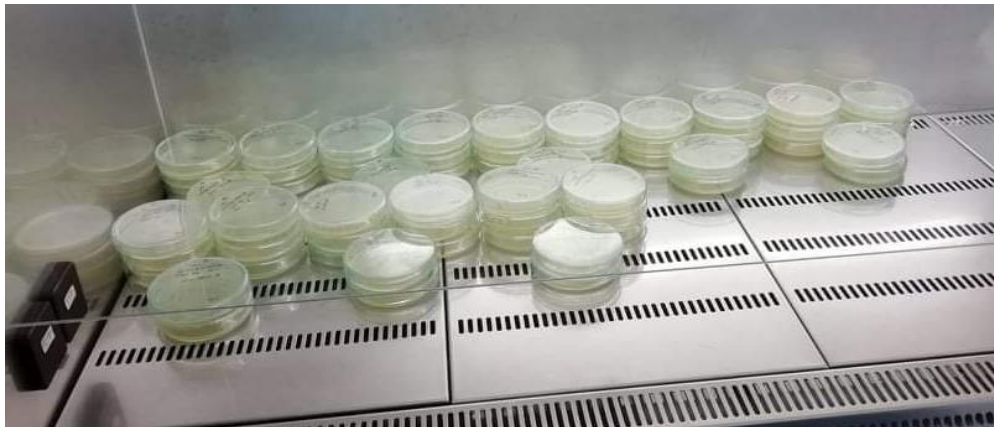
Da bi se istražile potencijalne metode biološke kontrole protiv fitopatogenih gljiva nakon berbe jabuka Quadi i sur. (2017.) su proveli ispitivanje antifungalnog djelovanja eteričnog ulja *Melissa officinalis*. Određivanje antifungalnog djelovanja eteričnog ulja *M. officinalis* provedeno je u in vitro uvjetima. Za provođenje istraživanja odabrane su tri fitopatogene gljive koje uzrokuju propadanje jabuka: *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* i *Rhizopus stolonifer*. Rezultati sugeriraju da eterično ulje *M. officinalis* ima dobar potencijal kao za suzbijanje bolesti jabuka nakon berbe.

Abdellatif i sur. (2014.) su ispitivali antifungalno djelovanje eteričnog ulja dobivenog iz lišća *Melissa officinalis*. Kemijski sastav ulja je određen hidrodestilacijom. Identificirano je šezdeset i tri spoja u eteričnom ulju. Glavna komponenta bila je geraniol (44,20 %). Ostale značajno zastupljene komponente su bile neralno ulje (30,20 %) i citronelal (6,30 %). Rezultati ukazuju da je eterično ulje melise imalo jaku antimikrobnu aktivnost protiv pet patogenih bakterija, *Candida albicans* i dvije fitopatogene gljive.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema PDA podloge

Hranjivu podlogu kuhamo s destiliranom vodom u omjeru 500 ml destilirane vode koju presipamo u tikvicu te dodajemo 21 g gotovog krumpir dekstroznog agara i 1,40 g tehničkog agara koje odvažemo pomoću digitalne vage. Smjesa se kuha 1 sat u konstantno kipućoj vodi u loncu. Nakon toga tikvicu poklopimo aluminijskim čepom, umotamo u papir te stavljamo u autoklav na sterilizaciju. Sterilizacija traje 20 minuta na temperaturi 120 °C. Antibiotik prethodno odvažemo tako da na 500 ml hranjive podloge primjenjujemo 0,50 g antibiotika koji razmutimo u 2 ml sterilne destilirane vode te dodajemo u steriliziranu hranjivu podlogu (u tikvicu) kada se temperatura podloge snizi na 60 °C. Sterilizirane Petrijeve zdjelice poslažu se u laminar (komora za rad u čistom), zatim se pipetom pripremljenu podlogu prenosi u Petrijeve zdjelice u volumenu od 10 ml po svakoj zdjelici. PDA podloga je u tekućem stanju pa je potrebno da se za daljnji rad ohladi i postane čvrsta.



Slika 1. Priprema pokusa u laminaru (izvor: Brajković, 2019.)

3.2. Provođenje pokusa

Istraživanje antifungalnog djelovanja eteričnih ulja matičnjaka i mirte na porast micelija osam fitopatogenih gljiva provedeno je u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Cilj je bio utvrditi antifungalno djelovanje eteričnih ulja matičnjaka i mirte koje smo primjenili u tri količine (5, 15 i 25 μ l). Prilikom rada korišteno je sterilizirano posuđe, metalna pinceta, plamenik, metalni kružni rezač i 96 % etilni alkohol.



Slika 2. Eterična ulja matičnjaka i mirte (izvor: Brajković, 2019.)

Nakon pripreme PDA podloge slijedila je inokulacija u laminaru. Za inokulaciju je korišten sedam dana star micelij osam fitopatogenih gljiva: *Macrophomina phaseolina*, *Monilia laxa*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Verticillium dahliae*.

Kako bismo dobili čiste kulture gljiva diskove podloge s razvijenim micelijem gljiva promjera 5 mm sterilnim priborom prenijeli smo na sredinu Petrijevih zdjelica. Micelij gljive je okrenut dolje, prema podlozi prilikom nanošenja. Nakon inokulacije Petrijeve zdjelice smo prenijeli u termostat u kojemu smo ih držali sedam dana na temperaturi 22 °C.

Nakon što su se gljive razvile postavili smo pokus u 4 ponavljanja za svaku varijantu. Prije postavljanja pokusa komoru za rad u čistom je potrebno dezinficirati etilnim alkoholom. Nakon toga, na sredinu svake Petrijeve zdjelice se pincetom postavi okrugli isječak filter papira (5 mm) na koji se mikro pipetom nakapa određena količina eteričnog ulja (5, 15 ili 25 μ l). Na 4 mjesta koja su dijagonalno raspoređena 10 mm od ruba nacijepi se čista kultura gljive. Kružni isječki podloge s micelijem gljive izvađeni su pomoću sterilnog bušaća promjera 5 mm. U kontrolnoj varijanti umjesto aplikacije eteričnog ulja na filter papir apicira se sterilna destilirana voda. Nakon toga Petrijeve zdjelice postavljene su u termostat komoru na temperaturu od 22 °C i režim svjetla 12 sati dan / 12 sati noć.



Slika 3. Primjena eteričnih ulja (izvor: Brajković, 2019.)

Zonu inhibicije smo mjerili (mm) sedam dana nakon nacipljivanja.

4. REZULTATI

Macrophomina phaseolina

Ulje mirte ne inhibira porast micelija kod primjenjenih količina od 5 i 15 μ l, a kod najveće primjenjene količine (25 μ l) statistički vrlo značajno inhibira rast micelija u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na primjenu ulja u količinama od 5 i 15 μ l.

Ulje matičnjaka ne inhibira porast micelija kod najmanje primjenjene količine ulja od 5 μ l a statistički vrlo značajno inhibira rast micelija gljive kod primjenjenih količina od 15 i 25 μ l u odnosu na kontrolu i u odnosu na primjenu ulja u količini od 5 μ l (Tablica 1.).

Monilia laxa

Ne postoje statistički značajne razlike u porastu micelija gljive između primjenjivanih količina ulja mirte i matičnjaka.

Ulja mirte i matičnjaka pri svim primjenjenim količinama statistički vrlo značajno inhibira rast micelija *Monilia laxa* u odnosu na kontrolu (Tablica 1.).

Alternaria helianthi

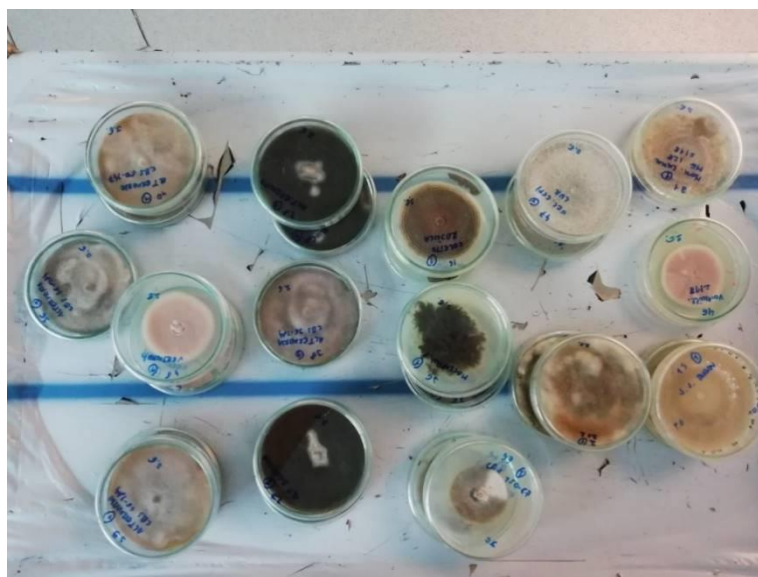
Ulje mirte i matičnjaka u primjenjenim količinama ulja 15 i 25 μ l statistički vrlo značajno inhibiraju rast micelija *Alternaria helianthi* u odnosu na kontrolu, dok primjenom ulja u količini od 5 μ l nije utvrđen statistički značajno slabiji porast micelija u odnosu na kontrolu. Također, oba ulja primjenjena u količini od 25 μ l statistički vrlo značajno inhibiraju porast micelija u odnosu na primjenu ulja u količini 5 μ l te statistički značajno u odnosu na primjenu ulja u količini 15 μ l (Tablica 1.).

Alternaria radicina

Eterična ulja mirte i matičnjaka niti pri najvećoj primjenjenoj količini (25 μ l) nisu statistički značajno inhibirala porast micelija *Alternaria radicina* u odnosu na kontrolu (Tablica 1.).

Tablica 1. Utjecaj eteričnih ulja mirte i matičnjaka na gljive *M. phaseolina*, *M. laxa*, *A. helianthi*, *A. radicina*

	<i>Macrophomina phaseolina</i>		<i>Monilia laxa</i>		<i>Alternaria helianthi</i>		<i>Alternaria radicina</i>	
	MIRTA	MATIČ-NJAK	MIRTA	MATIČ-NJAK	MIRTA	MATIČ-NJAK	MIRTA	MATIČ-NJAK
5	0	0	20,58	25,58	6,58	8,58	3,17	4,08
15	0	12,63	23,33	21,33	11,33	14,83	4,67	12,33
25	5,42	16,5	25,37	28,83	19,42	21,08	5,5	15
kontrola	0	0	6,38	6,38	5,25	5,25	5,62	5,62
LSD	1,97	2,86	5,47	4,63	5,30	5,54	3,10	11,26
0,01	2,87	4,16	8,35	6,74	7,72	8,06	4,52	16,39
0,05								



Slika 4. Porast micelija 8 fitopatogenih gljiva (izvor: Brajković, 2019)

Sclerotium cepivorum

Ulje mirte u količini 15 i 25 μ l statistički vrlo značajno inhibira porast micelija *Sclerotium cepivorum* u odnosu na kontrolu i primjenu ulja u količini od 5 μ l.

Ulje matičnjaka u količini od 25 μ l statistički vrlo značajno inhibira porast micelija gljive u odnosu na kontrolu i primjenu ulja u količini 5 i 15 μ l (Tablica 2.).

Sclerotinia sclerotiorum

Ulja mirte i matičnjaka ne inhibiraju rast micelija *Sclerotinia sclerotiorum* niti kod jedne primjenjene količine (5,15 i 25 μ l) odnosno micelij gljive je potpuno prerastao Petrijevu zdjelicu (Tablica 2.).

Botrytis cinerea

Ulje mirte ne inhibira porast micelija gljive *Botrytis cinerea* niti kod najveće primjenjene količine (25 μ l) odnosno micelij gljive je potpuno prerastao Petrijevu zdjelicu kao i kod kontrole.

Ulje matičnjaka u količini od 5 i 15 μ l ne inhibira statistički značajno porast micelija gljive u odnosu na kontrolu dok u količini od 25 μ l porast micelija je statistički vrlo značajno manji u odnosu na kontrolu (Tablica 2.).

Verticillium dahliae

Ne postoje statistički značajne razlike u porastu micelija gljive *Verticillium* između primjenjivanih količina ulja mirte 5, 15 i 25 μ l u odnosu na kontrolu.

Ulje matičnjaka kod primjenjivanih količina od 5, 15 i 25 μ l statistički značajno inhibira rast micelija *Verticillium dahliae* u odnosu na kontrolu (Tablica 2.).

Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja mirte i matičnjaka na gljive *S. cepivorum*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *V. dahliae*

	<i>Sclerotium cepivorum</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Verticillium dahliae</i>	
	MIRTA	MATIČ-NJAK	MIRTA	MATIČ-NJAK	MIRTA	MATIČ-NJAK	MIRTA	MATIČ-NJAK
5	0,58	1,67	0	0	0	0	7,58	11,25
15	19,83	9	0	0	0	3,58	0	7,33
25	21,58	27,75	0	0	0	11,33	3,83	13,67
kontrola	0	0	0	0	0	0	0	0
LSD	2,25	7,19	0	0	0	5,51	7,57	10,67
0,01	3,27	10,46	0	0	0	8,02	11,01	15,52
0,05								



Slika 5. Porast micelija uz primjenu ulja matičnjaka (25 μ l)

(izvor: Brajković, 2019.)

5. RASPRAVA

Eterična ulja su koncentrirani prirodni proizvodi aromatičnih biljaka intenzivnog mirisa koja se upotrebljavaju još od davne prošlosti u alternativnoj medicini. Ona u sebi sadrže niz kemijskih spojeva koji mogu zaustaviti ili usporiti rast bakterija i drugih mikroorganizama (Bakkali i sur., 2008.).

U našim istraživanjima utvrdili smo da ulja mirte i matičnjaka imaju najbolji antifungalni utjecaj u primjenjenim količinama od 15 i 25 μ l kod rasta micelija gljive *Alternaria helianthi* u odnosu na kontrolu. Ulja mirte i matičnjaka pri svim primjenjivanim količinama (5, 15 i 25 μ l) i temperaturi 22 °C inhibiraju rast micelija gljive *Monilia laxa*, dok je jedino ulje matičnjaka (ne i mirte) značajno inhibiralo porast micelija *Verticilium dahliae* kod. U istraživanju koje su proveli Budzyńska i sur. (2013.) utvrđeno je da je ulje matičnjaka izazvalo snažan antifungalni učinak na *Candida* sp. i vrstu *C. albicans*.

Primjenom ulja matičnjaka u količinama 15 i 25 μ l na micelij gljive *Macrophomina phaseolina* ima vrlo značajan inhibicijski učinak u odnosu na kontrolu sedmi dan nakon inokulacije dok primjenom količine ulja u količini 5 μ l ne inhibira porast micelija gljive. U istraživanju koje su proveli Ćosić i sur. (2014.) istraživao je utjecaj jedanaest eteričnih ulja (anis, metvica, gorka naranča, cimet, kim, bor, kadulja, timijan, klinčićevac, lavanda) na porast micelija *Macrophomina phaseolina* te je utvrđeno da su tri dana nakon naciepljivanja eterična ulja timijana, metvice, anisa, cimeta i klinčićevca imala statistički značajno jače fungistatično djelovanje, dok su ostala eterična ulja u odnosu na kontrolu imala stimulirajući učinak na rast micelija. Nakon šest dana samo je kod timijana zabilježeno inhibitorno djelovanje na porast micelija gljive *Macrophomina phaseolina*.

Eterična ulja matičnjaka i mirte niti kod jedne primjenjene količine ulja ne inhibiraju rast micelija gljiva *Alternaria radicina* i *Sclerotinia sclerotiorum* odnosno u svim slučajevima micelij gljive je potpuno prerastao Petrijevu zdjelicu. Ulje matičnjaka prijenjeno u količinama 5 i 15 μ l nema značajan negativan utjecaj na rast gljiva *Botrytis cinerea* i *Sclerotium cepivorum* pri dok je isto ulje statistički značajno inhibiralo rast gljiva kada je primjenjeno u količini 25 μ l. Grgić i sur. (2010.) proučavali su utjecaj dvadeset dva eterična ulja (anis, timijan, kim, paprena metvica, lavanda, kadulja, matičnjak, ružmarin, mirta, cimet list, bosiljak, bijeli bor, eukaliptus, cedar, bergamot, mandarina, čempres, pačuli,

đumbir, gorke naranča, sandal i kamfor) na porast micelija *Bortytis cinerea*, uzročnika sive plijesni. Sva ulja i u svim primjenjenim količinama (3, 5 i 7 μ l), izuzev ulja gorke naranče, sandala i kamfora pokazala su određeno antifungalno djelovanje pa tako i ulja matičnjaka i mirte.

Eterično ulje mirte nije imalo negativan učinak na rast micelija gljivice *Macrophomina phaseolina* pri temperaturi 22 °C i količinama 5 i 15 μ l dok statistički vrlo značajno inhibira rast micelija gljive u odnosu na kontrolu primjenom u količini 25 μ l. Ulje mirte je sedmi dan od nacjepljivanja imalo statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljive *Sclerotium cepivorum* kada je prijenjeno u količinama 5 i 25 μ l u odnosu na kontrolu, a primjenom ulja u količini 5 μ l micelij gljive je potpuno prerastao Petrijevu zdjelicu.



Slika 6. Čista kultura gljive *Sclerotinia cepivorum* (izvor: Brajković, 2019.)

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog laboratorijskog istraživanja o antifugalnom djelovanju eteričnih ulja mirte i matičnjaka na osam fitopatogenih gljiva: *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Scerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Verticillium dahliae* pri temperaturi 22°C i različitim količinama ulja može se zaključiti da:

- inhibitorni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti eteričnog ulja, primjenjenoj količini ulja i vrsti gljive na koju je ulje primjenjeno
- ulje matičnjaka je pokazalo značajan negativan utjecaj na porast micelija *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina* primjenom većih količina ulja (15 i 25 µl) dok primjenom najmanje količine ulja nije inhibiralo porast micelija gljiva
- ulje matičnjaka nije inhibirao rast micelija *Sclerotinia sclerotiorum* niti kod jedne primjenjene količine ulja
- ulje mirte je pokazalo značajano antifugalno djelovanje na porast micelija gljiva *Alternaria helianthi*, *Sclerotinia cepivorum* i *Monilia laxa*
- eterično ulje mirte ne inhibira rast micelija gljiva *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Verticillium dahliae* niti kod jedne primjenjene količine

7. POPIS LITERATURE

1. Abdellatif, F., Boudjella, H., Zitouni, A., Hassani, A. (2014.): Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *Experimental and Clinical Sciences J.*, 13: 772–781.
2. Adebayo, O., Dang, T., Belenger, A., & Khanizadeh, S. (2013.): Antifungal Studies of Selected Essential Oils and Commercial Formulation against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Research*, 2(1): 217-226.
3. Amini, M., Safaie, N., Salmani, J., Shams-Bakhsh, M. (2012.): Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. *Trakia Journal of Sciences*, 10(1): 1-8.
4. Bhagwat, M.K., Datar, A.G. (2014.): Antifungal activity of herbal extracts against plant pathogenic fungi. *Arch Phytopath Plant Protect* 47(8): 959-965.
5. Combrinck, S., Regnier, T., Kamatou, G.P.P. (2011.): In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Ind Crops Prod.*, 33(2): 344–349.
6. Curini, M., Bianchi, A., Epifano, E., Bruni, R., Torta, L., Zambonelli, A. (2003.): Composition and in vitro Antifungal Activity of Essential Oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. *Chemistry of Natural Compounds*, 39: 191–194.
7. 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.
8. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D. (2014.): The Effect of Essential Oils on the Development of Phytopathogenic Fungi. U: Sharma N. (ur.) „Biological Controls for Preventing Food Deterioration – Strategies for Pre- and Postharvest Management. Wiley Blackwell, UK, 273-292..

9. Da Cruz Cabral, L., Pinto, F.V., Patriarca, A. (2013.): Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int J Food Microbiol*, 166:1-14.
10. Dimitrov, I. (2000.): Aroma i fitoterapija: Liječenje biljem i eteričnim uljima. Sirač.
11. El-Mohamedy, R. S., Abdel-Kader, M. M., Abd-El-Kareem, F., El-Mougy, N. S. (2013.): Essential oils, inorganic acids and potassium salts as control measures against the growth of tomato root rot pathogens in vitro. *Journal of Agricultural Technology*, 9(6): 1507-1520.
12. Ferhout, H., Bohatier J., Guillot, J., Chalchat, J. C. (1999.): Antifungal Activity of Selected Essential Oils, Cinnamaldehyde and Carvacrol against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. *Journal of essential oil research*, 11(1): 119-129.
13. Giamperi, L., Fraternali, D. Ricci, D. (2011.): Essential Oil Composition and Antifungal Activity of Aerial Parts of *Ballota nigra* ssp *foetida* Collected at Flowering and Fruiting Times. *Sage Journal*. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900733>
14. Grgić, S., Čosić, J., Rebekić, A., Vrandečić, K. (2016.): Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *Botrytis cinerea*. *Poljoprivreda*, 22(2):29-33.
15. Handique, A. K., Singh, H. B. (1990.): Antifungal action of lemongrass oil on some soil-borne plant pathogens. *Indian Perfumer*, 34(3): 232-234.
16. Ivić, D. (2016.): Bijela trulež (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) na rajčici. *Glasilo biljne zaštite*, 16(5): 500-504.
17. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., (2007.): Antifungal Activities Of Thyme, Clove And Oregano Essential Oils. *Wiley Online Library*.
18. Hylgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012.): Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.*, 3(12): 1–24.

19. Kalembe, D., Kunicka, A. (2003.): Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
20. Kedia, A., Jha, D. K., Dubey, N. K. (2015.): Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. U: A. Mendez-Vilas (ur.), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Bajados, Spain: Formatex Research Center, 208-214.
21. Li, Y., Shao, X., Xu, J., Wei, Y., Xu, F., Wang, H. (2017.): Effects and possible mechanism of tea tree oil against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo test. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(3): 219-227.
22. Miličević, T. (2016.): Siva plijesan rajčice (*Botrytis cinerea* Pers.). *Glasilo biljne zaštite*, 16(5): 497- 499.
23. Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H. K., Farhadi, N., Hosseini, S. M. A. (2013.): Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(4): 506-512.
24. Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., Michailides, T. (2010.): Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100: 1340-1351.
25. Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J., Stashenko, S. (2010.): Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1): 372-378.
26. Ogah, C.O., Coker, H.B., Adepoju-Bello AA. (2016.): Organophosphate and carbamate pesticide residues in beans from markets in Lagos State, Nigeria. *Journal of Innovative Research in Engineering and Sciences (IJIRAE)*, 2(1):50-61.
27. Omidbaigi, R., Zare, R., Taheri,H. (2007.): Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. <https://www.researchgate.net/>
28. Ouadia,Y.E., Manssourib, M., Bouyanzera, L, Majidib, H., Bendaifc. H., Elmsellema, Shariatid M.A., Melhaouic, A., Hammoutia, A. (2017.): Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from

north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microbial Pathogenesis*, 107: 321-326.

29. Ozcakmak, S., Dervisoglu, M., Yilmaz, A. (2012.): Antifungal activity of lemon balm and sage essential oils on the growth of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(12): 3079-3084.
30. Park, J. Y., Kim, S. H., Kim, N. H., Lee, S. W., Jeun, S. C., Hong, J. K. (2017.): Differential Inhibitory Activities of Four Plant Essential Oils on In Vitro Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Causing Fusarium Wilt in Strawberry Plants. *The Plant Pathology Journal*, 33(6): 582-588.
31. Pineda, R., Vizcaino, S., Garcia, C. M., Gill, J.G., Durango, D. (2017.): Antifungal activity of extracts, essential oil and constituents from *Petroselinum crispum* against *Colletotrichum acutatum*. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín*, 71 (3): 8563-8572.
32. Soylu, S., Yigitbas, H., Soylu, E. M., Kurt, S. (2007.): Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1021-1030.
33. Tešević, V., Milosavljević, S., Vajs, V., Đorđević, I., Soković, M., Lavadinović, V., Novaković, M. (2009.): Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) from Serbia. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(10): 1035-1040.
34. Tworkoski, T. (2017.): Herbicide effects of essential oils. *Weed Science*, 50(4): 425-431.
35. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Turon, C., Marín, S. (2004.): Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. *J. Appl. Microbiol* 96(4): 716-724.
36. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., Efthimiadou, A. (2013.): Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not. Bot. Horti. Agrobot.*, 41(1): 86-92.

37. 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.
38. Yilmaz, A., Ermis, E., Boyraz, N. (2016.): Investigation of in vitro and in vivo anti-fungal activities of different plant essential oils against postharvest apple rot diseases *Colletotrichum gleosporioides*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 67(1): 122-131.
39. Wildwood, C. (2002.): *Aromaterapija: Enciklopedija eteričnih ulja, njihovih pripravaka i primjene*. Zagreb.

8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak eteričnih ulja matičnjaka i mirte na porast micelija 8 fitopatogenih gljiva: *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Verticillium dahliae*.

Ulje mirte i matičnjaka pokazala su statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljive *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Monilia laxa* i *Verticillium dahliae* pri najvećoj količini ulja od 25 μ l. Ulje mirte nije pokazalo inhibitorni učinak na gljive *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*.

Ključne riječi: eterično ulje, inhibicijski utjecaj, porast micelija

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of essential oils of lemon balm and myrtle on the growth of mycelium of 8 phytopathogenic fungi: *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* and *Verticillium dahliae*.

Myrtle and lemon balm oil showed a statistically very significant inhibitory effect on the growth of mycelium of the fungus *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Monilia laxa*, *Verticillium dahliae* at the highest oil content of 25 μ l. Myrtle oil did not show an inhibitory effect when applied on phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.

Key words: essential oils, inhibitory effect, mycelial growth

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Utjecaj eteričnih ulja mirte i matičnjaka na gljive *M. phaseolina*, *M. laxa*, *A.helianthi*, *A.radicina*

Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja mirte i matičnjaka na gljive *S. cepivorum*, *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *V. dahliae*

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Priprema pokusa u laminaru (izvor: Brajković, 2019.)

Slika 2. Eterična ulja matičnjaka i mirte (izvor: Brajković, 2019.)

Slika 3. Primjena eteričnih ulja (izvor: Brajković, 2019.)

Slika 4. Porast micelija 8 fitopatogenih gljiva (izvor: Brajković, 2019)

Slika 5. Porast micelija uz primjenu ulja matičnjaka (25 μ l) (izvor: Brajković, 2019.)

Slika 6. Čista kultura gljive *Sclerotinia cepivorum* (izvor: Brajković, 2019.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Antifugalno djelovanje eteričnih ulja matičnjaka i mirte

Irena Brajković

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak eteričnih ulja matičnjaka i mirte na porast micelija 8 fitopatogenih gljiva: *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* i *Verticillium dahliae*. Ulje mirte i matičnjaka pokazala su statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljive *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Monilia laxa* i *Verticillium dahliae* pri najvećoj količini ulja od 25 µl. Ulje mirte nije pokazalo inhibitorni učinak na gljive *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*.

Rad je izrađen: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: Jasenka Ćosić

Broj stranica: 30

Broj slika: 6

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 39

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: eterično ulje, inhibicijski utjecaj, porast micelija

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, član

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

Antifungal effect of essential oils of lemon balm and myrtle

Irena Brajković

Summary:

The aim of this study was to determine the effect of essential oils of lemon balm and myrtle on the growth of mycelium of 8 phytopathogenic fungi: *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* and *Verticillium dahliae*. Myrtle and lemon balm oil showed a statistically very significant inhibitory effect on the growth of mycelium of the fungus *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria radicina*, *Sclerotium cepivorum*, *Monilia laxa*, *Verticillium dahliae* at the highest oil content of 25 µl. Myrtle oil did not show an inhibitory effect when applied on phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek.

Mentor: Jasenka Ćosić

Number of pages: 30

Number of figures: 6

Number of tables: 2

Number of references: 39

Number of attachments: 0

Original in: Croatian

Key words: essential oils, inhibitory effect, mycelial growth

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, president
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of biotechnical sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1