

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na vrste kompleksa Diaporthe/Phomopsis

Župarić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:298913>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



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

Marko Župarić

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA VRSTE
KOMPLEKSA *DIAPORTHE/PHOMOPSIS***

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marko Župarić

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA VRSTE
KOMPLEKSA *DIAPORTHE/PHOMOPSIS***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, član

Osijek, 2021.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 2 |
| 2.1. Gljive | 2 |
| 2.1.1. <i>Diaporthe/Phomopsis</i> kompleks | 3 |
| 2.2. Eterična ulja..... | 8 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 12 |
| 3.1. Postavljanje pokusa | 14 |
| 3.2. Statistička obrada podataka | 16 |
| 4. REZULTATI | 17 |
| 4.1. <i>Diaporthe helianthi</i> | 17 |
| 4.2. <i>Diaporthe linearis</i> | 18 |
| 4.3. <i>Phomopsis cotoneastri</i> | 20 |
| 4.4. <i>Diaporthe angelicae</i> | 21 |
| 4.5. <i>Diaporthe caulivora</i> | 23 |
| 4.6. <i>Diaporthe phaseolorum</i> | 24 |
| 4.7. <i>Diaporthe longicolla</i> | 25 |
| 4.8. <i>Diaporthe meridionalis</i> | 27 |
| 5. RASPRAVA..... | 29 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 30 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 31 |
| 8. SAŽETAK | 33 |
| 9. SUMMARY | 34 |
| 10. POPIS TABLICA | 35 |
| 11. POPIS SLIKA | 36 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA..... | 37 |
| BASIC DOCUMENTATION CARD | 38 |

1. UVOD

Zbog sve veće osviještenosti proizvođača biljaka i konzumenata biljnih proizvoda zaštita bilja ekološki prihvatljivim pripravcima sve više dobiva na značenju diljem svijeta. S druge strane, kemijski fungicidi još uvijek su najzastupljeniji način zaštite biljaka od bolesti diljem svijeta iako oni vrlo negativno djeluju na zdravlje ljudi i životinja, nakon njihove primjene u biljkama, tlu i vodi ostaju rezidui, a na mnoge od njih patogeni organizmi stvaraju rezistentnost što značajno otežava učinkovitu zaštitu.

Posljednjih godina u našoj zemlji najveći dio poljoprivrednih proizvođača okrenuo se integriranoj proizvodnji bilja, a sve više njih prelazi i na ekološku proizvodnju.

Zadnjih se godina sve više istražuje utjecaj eteričnih (esencijalnih) ulja i njihovih komponenti na patogene organizme, između ostaloga i na fitopatogene gljive. Brojnim je istraživanjima utvrđeno da mnoga eterična ulja imaju protugljivično djelovanje na različite uzročnike bolesti biljaka.

Cilj ovoga rada je utvrditi fungistatični učinak eteričnih ulja lavande, timijana i ružmarina na gljive iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis* u *in vitro* uvjetima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Gljive

Gljive pripadaju u skupinu eukariotskih organizama koji uključuju mikroorganizme poput kvasca i plijesni. Ti su organizmi klasificirani kao posebno kraljevstvo koje je odvojeno od ostalih eukariotskih kraljevstava, a to su *Plantae*, *Animalia*, *Protozoa* i *Chromista*.

Karakteristika koja grupira gljive u kraljevstvo drugačije od biljaka, bakterija i nekih protista je hitin u njihovim staničnim stjenkama. Gljive nemaju sposobnost obavljanja fotosinteze. Gljive su poput životinja heterotrofi što znači da hranu (organsku tvar) neophodnu za život ne proizvode sami već uzimaju već organsku tvar koju su proizveli autotrofi. Rast im je sredstvo za pokretljivost, osim spora (od kojih je nekoliko vrsta s flagelama), koje mogu biti prenešene zrakom ili vodom. S druge pak strane gljive su glavni razlagači u ekološkim sustavima, te su kao takve nezamjenjive u kruženju tvari u prirodi. Prethodno navedeno, ali i druge razlike smještaju gljive u jednu skupinu srodnih organizama nazvanu Eumycota (prave gljive ili Eumycetes), koje dijele zajedničkog pretka (iz monofiletske skupine), što je tumačenje koje također snažno podržava molekularna filogeneza. Ova gljivična skupina razlikuje se od strukturno sličnih oomikota. Disciplina biologije posvećena proučavanju gljiva poznata je pod nazivom mikologija (od grčkog μύκης mykes, gljiva). U prošlosti se mikologija smatrala granom botanike, iako je danas poznato da su gljive genetski bliskije povezane sa životinjama nego s biljkama (Zemity i Ahmer, 2005).

Iz perspektive čovjeka, većina gljivica su mikroskopskih veličina i samim time neuočljive zbog veličine svojih struktura i načina života u tlu ili na mrtvoj tvari. Isto tako neke su gljive simbionti biljaka, životinja ili drugih gljivica, dok jedan dio gljiva pripada u grupu parazita na ljudima, životinjama i biljkama. Neke od njih postaju primjetne tijekom formiranja sponosnih organa. Gljive se dugo koriste kao izravni izvor ljudske hrane i to u obliku jestivih gljiva i tartufa, koriste se i kao sredstvo za dizanje kruha te u fermentaciji raznih prehrambenih proizvoda, poput vina, piva i umaka od soje. Od četrdesetih godina prošlog stoljeća gljive se koriste za proizvodnju antibiotika, a u novije vrijeme različiti enzimi, koje proizvode gljive, koriste se u brojnim industrijskim proizvodnjama. Uz sve navedeno, gljive se također koriste kao biološki pesticidi za suzbijanje korova, uzročnika biljnih bolesti i štetnika. Mnoge vrste proizvode bioaktivne spojeve zvane mikotoksini, poput alkaloida i

poliketida, koji su toksični za životinje i ljude. Fruktifikacijske strukture nekih vrsta sadrže psihotropne spojeve i konzumiraju u tradicionalnim duhovnim ceremonijama. Povećanom vlagom u zatvorenim prostorima gljive se mogu stvarati na zidovima kuća, zgrada, ali i štalama, industrijskim postrojenjima i slično, te mogu postati značajni patogeni ljudi i životinja. Gubici usjeva uslijed gljivičnih bolesti ili kvarenja hrane mogu imati velik utjecaj na opskrbu ljudske hrane i lokalna gospodarstva (Piyo i sur., 2009).

Danas se još uvijek malo zna o biološkoj raznolikosti unutar carstva gljiva. Procjenjuje se da unutar carstva postoji 2,2 do 3,8 milijuna vrsta. Od toga je opisano samo oko 148 000 vrsta od kojih je preko 8000 vrsta uzročnika bolesti biljaka. Dodatno, još je najmanje 300 vrsta patogeno za ljude. U pionirskim taksonomskim djelima Carla Linnaeusa, Christiaana Hendrika Persoona i Eliasa Magnusa Friesa iz 18. i 19. stoljeća gljive su klasificirane prema njihovoj morfologiji kao što su boja spora ili mikroskopska svojstva ili prema njihovoj fiziologiji. Napredak u molekularnoj genetici otvorio je put da se DNK analiza uključi u taksonomiju, što je ponekad dovodilo u pitanje povijesne skupine na temelju morfologije i drugih osobina. Filogenetske studije objavljene u prvom desetljeću 21. stoljeća pomogle su preoblikovati klasifikaciju unutar carstva gljiva (Sukatta i sur., 2008).

2.1.1. *Diaporthe/Phomopsis* kompleks

Gljivične vrste iz roda *Diaporthe/Phomopsis* jesu uzročnici raznih bolesti te značajnog gubitka u urodu ali i samoj kvaliteti uroda biljaka koje parazitiraju. Vrste roda *Diaporthe* (nespolni stadij *Phomopsis*) dugi su niz godina poznate kao vrlo destruktivni i ekonomski vrlo značajni uzročnici bolesti velikog broja biljnih vrsta iako ima i vrsta koje su saprofiti i nepatogeni endofiti. Vrste iz ovoga kompleksa izučavali su brojni znanstvenici. Osobito su istraživane one vrste koje su povezane s bolestima soje, suncokreta, vinove loze i agruma.

Iz *Diaporthe/Phomopsis* kompleksa na soji parazitiraju sljedeće vrste (Jurković, 2016):

1. *Diaporthe phaseolorum*
2. *Diaporthe caulivora*
3. *Diaporthe aspalathi*
4. *Diaporthe longicolla*.

Diaporthe caulivora

Diaporthe caulivora jest gljiva uzročnik crne pjegavosti (raka) stabljike soje. Naime, tijekom 40-ih godina 20. stoljeća je utvrđena nova bolest soje na području Sjedinjenih Američkih Država i Kanade. Simptomi ove bolesti su se razlikovali od onih koji su opisani kada je u pitanju palež mahuna i stabljika soje, ali su povezani s uzročnikom paleži mahuna. Ponajprije je uočeno da se gljiva izolirana sa stabljika sa simptomima crne pjegavosti soje razlikuje prema morfološkim i patogenim karakteristikama od *P. sojae*. Nakon mnogih istraživanja, ova gljiva je imenovana kao *Diaporthe phaseolorum*. Posljednja revizija ovoga kompleksa na soji je dala sljedeće rezultate: gljiva je dobila status vrste. Naime, kako izvješćuje USDA-ARS, gljiva je utvrđena u zemljama: Argentina, Brazil, Kanada, Kina, Hrvatska, Italija, Srbija i Sjedinjene Američke Države. Osim soje, ova se gljiva razvija i na *Abutilon theophrasti* i *Dipsacus laciniatus*.

Prinos soje zaražene s *D. caulivora* varira ovisno o sorti, vremenu i intenzitetu zaraze. Rane infekcije rezultiraju značajnim gubitcima. Navodi se i smanjenje uroda od 60%. Isto tako, na području Vojvodine utvrđeno je smanjenje uroda od 9 do 62%. Stupanj zaraze sjemena gljivama varira ovisno o godini i uzgojnom. Osim toga, navodi se da je prosječno zaraženo 12,5% sjemena. *D. caulivora* je izoliran u značajnom postotku (22%) iz uzoraka sjemena s kultivara koji su imali simptome raka stabljika. U Republici Hrvatskoj je u uvjetima prirodne infekcije na području Osijeka u 2002. godini na sjemenu soje najzastupljenija vrsta bio *D. caulivora*.

Simptomi zaraze s *D. caulivora* mogu se vidjeti na stabljici, listu i sjemenu te se prve promjene mogu uočiti na kotiledonima u obliku crveno sivih pjega koje se šire dalje na stabljiku, a kotiledoni otpadaju prije vremena. U našim agroekološkim uvjetima uzgoja prvi simptomi bolesti javljaju se u fazi formiranja mahuna ili češće za vrijeme nalijevanja zrna. Karakteristične promjene nastaju na donjim dijelovima stabljika u pazušcu grana ili pak peteljka listova. U početnoj se fazi uočavaju malene crveno smeđe površinske lezije.

Pjege su jasno odijeljene od zdravog dijela biljke crno smeđim rubom. Dužina pjega kreće se od nekoliko do deset cm. Ukoliko kružno obuhvate stabljiku dovode do sušenja i odumiranja biljaka. Makroskopski vidljivi simptomi mogu se javiti u kasnoj vegetativnoj fazi, ali se odumiranje biljaka javlja od sredine do kraja reproduktivne faze. Gljiva producira fitotoksin i kao posljedica prisutnosti toksina nastaju promjene na listu. Na vršnim listovima javlja se žućenje i nekroza između lisnih žila praćeno gubitkom turgora. Osušeno lišće visi

na stabljici pa se zaražene biljke lako uočavaju. Neki drugi uzročnici bolesti (*Phytophthora sojae*, *Calonectria pyrochroa*, *Fusarium* spp.) također mogu uzrokovati slične simptome na listu, ali kasnija pojava opisanih simptoma na stabljikama jasno razlikuje uzročnika *D. caulivora* od drugih gljiva. Jačina bolesti varira ovisno o toksigenosti izolata. Kod jačih zaraza mahune se suše i u njima se ne formira sjeme, a ako se formira ono je sitno, deformirano i nedovoljno naliveno.

Stavljanjem dijelova stabljika u vlažne uvjete nakon 5-7 dana u okviru pjega formiraju se brojni periteciji. Periteciji su crne boje uronjeni u tkivo kore, a na površinu izlaze vratovi koji vremenom postaju vrlo dugački. Periteciji su na biljkama soje pojedinačni ili češće u grupama i formiraju tvorevine u obliku ispupčenja. Veličina peritecija na prirodno zaraženim stabljikama soje iznosi 180-365 x 245-390 μm , širina vrata peritecija u bazi je 75-130 μm i vrhu 45-70 μm . Dužina vrata peritecija je do 750 μm . U peritecijima se nalaze askusi s po osam askospora koje se oslobađaju kroz otvor na vratu plodišta u obliku kapljica, u početku prozirno žućkaste, kasnije žute boje. Askusi su eliptičnog izduženog oblika, hijalini s tankim stjenkama i na vrhu imaju dva prstena. Askospore su dvostanične, hijaline, sužene u predjelu septe i u svakoj stanici imaju po dvije kapi ulja.

Sjetva zdravog sjemena, otpornijih sorata, duboko zaoravanje biljnih ostataka i plodored jesu osnovne mjere za suzbijanje crne pjegavosti. Međutim, postoje razlike u tolerantnosti između sorata, a kako navode neka istraživanja, ranijom sjetvom se može izbjeći zaraza sorata koje ranije dozrijevaju, dok se kod sorata koje dozrijevaju kasnije smanjuje intenzitet napada. Kada su u pitanju kemijske mjere, one se kod nas ne koriste odnosno nema fungicida s dozvolom za tu namjenu. Ako se radi o slabijim zarazama, dovoljno je jedno do dva tretiranja, a kada se radi o jakim zarazama tada se potpuna zaštita ne može ostvariti niti većim brojem tretiranja.

Diaporthe longicolla

Diaporthe longicolla je biljni patogen i uglavnom je odgovoran za bolest soje koja se naziva trulež sjemena. U drugim biljnim vrstama, kao što su na primjer mangrovi *Sonneratia caseolaris*) *D. longicolla* može živjeti i kao endofit. Utvrđeno je da *D. longicolla* također stvara brojne citotoksične i antimikrobne sekundarne metabolite, osobito one iz grupe fomoksantona. *D. longicolla* prvi su put 1985. godine opisali Thomas W. Hobbs i sur. na Odjelu za biljnu patologiju na Državnom sveučilištu Ohio.

Gljiva *D. longicolla* odgovorna je za truljenje sjemenki soje. Uzrokuje ozbiljnu infekciju i može smanjiti klijavost do 90%. Piknidi se razvijaju u redovima prije sazrijevanja soje.

Diaporthe phaseolorum

D. phaseolorum je biljni patogen koji ima veliki broj domaćina, a inficira, između ostalih biljnih vrsta, soju, suncokret, kikiriki, *Abutilon theophrasti* i druge. *D. phaseolorum* je savršeni (teleomorfni, spolni) stadij uzročnika bolesti mahuna i stabljike soje. Nesavršeni (anamorfni, nespolni) stadij nosi naziv *Phomopsis sojae*. Ovo je česta bolest većine područja uzgoja soje u Sjedinjenim Državama, ali i u drugim područjima uzgoja soje uključujući i Hrvatsku. Gubici su rezultat smanjenja prinosa i loše kvalitete zrna/sjemena.

Diaporthe phaseolorum mogu zaraziti bilo koji nadzemni dio biljke; bolest može biti prisutna bez pokazivanja simptoma. Infekcija u ranoj sezoni obično se odvija bez pokazivanja simptoma. Sredinom sezone simptomi se pojavljuju u obliku sitnih crnih točkica (piknidija) na otpalom lišću ili apscidiranim peteljka.

Simptomi u kasnoj sezoni (piknidije) pojavljuju se na mrtvim stabljikama, granama i sjemenskim mahunama. Jako zaraženo sjeme često neće uspjeti niknuti.

Vizualni simptomi uključuju:

- Svijetlosmeđe pjege na kotiledonima ili nižim dijelovima stabljika,
- Male crne točkice (piknide) koje se pojavljuju u pravilnim nizovima (redovima) duž nekrotičnog tkiva stabljike, grane i peteljke lista,
- zaraženo sjeme sa simptomima: ispucane ljuske sjemena, smežurana površina, piknidi na ovojnici sjemena.

Diaporthe phaseolorum je prisutan u cijelom svijetu gdje god se soja proizvodi. Uvjeti koji pogoduju zarazi ovim patogenom uključuju:

- toplo i vlažno vrijeme, posebno tijekom razvoja i sazrijevanja mahuna,
- sjetva zaraženog sjemena i ponovljena sjetva soje,
- odgođena žetva, oštećenja od kukaca i štete od tuče dovode do zaraze sjemenom.

Gljiva nepovoljne uvjete preživljava kao micelij u zaraženom sjemenu i biljnim ostacima.

Jače širenje bolesti može biti posljedica sekundarnih infekcija. Sekundarne će se infekcije dogoditi kada se konidije tijekom vegetacije šire na zdrave biljke.

Od mjera zaštite najznačajnije su plodored i sjetva zdravog sjemena. Dostupne su otporne sorte, ali one se često ne koriste.

Iznimno važna vrsta iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis* je i uzročnik sive pjegavosti stabljika suncokreta *Diaporthe helianthi*.

Diaporthe helianthi

Diaporthe helianthi je gljivični patogen koji uzrokuje sivu pjegavost stabljika suncokreta. Osnovni simptom bolesti je stvaranje velikih pjega na stabljikama suncokreta. Za povoljnih uvjeta pjege mogu biti vrlo velike i dovesti do dezorganizacije tkiva stabljika što ima za posljedicu njihovo lomljenje i polijeganje. Utvrđeno je da je ova bolest osobito štetna u južnim i istočnim područjima Europe, iako se može naći i u Sjedinjenim Državama i Australiji.

Simptomi ove bolesti se mogu vidjeti na listu, stabljici, ali i na sjemenu. Naime, prve promjene se javljaju na donjem dijelu lišća i to obično prije ili u vrijeme cvatnje (u Hrvatskoj najčešće u lipnju). Na rubnom dijelu lista, najčešće na vrhu, se vide nekrotične promjene koje se šire uz glavne lisne žile. Nekroze uglavnom imaju oblik slova V. Lišće se suši i ostaje visiti na stabljici do kraja vegetacije. Simptomi na stabljici su karakteristični, a javljaju se na mjestu spoja peteljke i stabljike. U početku su pjege blijedo smeđe boje koja se brzo mijenja u tamno smeđu, povećavaju se i dobivaju eliptičan izgled, a rubovi pjega su tamnije boje. Sa starošću dobivaju sivkastu, skoro crnu boju pa od opisanog simptoma potječe i naziv bolesti u našem jeziku „siva pjegavost stabljike suncokreta“. Taj naziv možda i nije najbolji za bolest koju izaziva *D. helianthi*, jer osim na stabljici gljiva uzrokuje isto tako veoma karakteristične simptome na lišću. Pjege na stabljikama locirane su najčešće na donjim dijelovima, a ukoliko su uvjeti za razvoj bolesti povoljni pjege se šire i na ostale dijelove. One prstenasto obuhvaćaju stabljiku dovodeći do prijevremenog sušenja i loma biljke. Usljed zaraze ovom gljivom formiraju se manje glave bez sjemena ili sa sjemenom loše kakvoće. Kad se stabljike prerežu u zoni pjega uočava se propadanje tkiva kore koje se manje ili više širi u parenhim srži te se zbog toga stabljika razmekšava i postaje lako lomljiva. Gljiva luči fitotoksin fomezin koji potpomaže patološki proces degradacije tkiva suncokreta.

Otpornost genotipova suncokreta prema *D. helianthi* različita je te bi za sjetvu trebalo birati otpornije. Ova gljiva se može održavati, osim na ostacima suncokreta, i na samoniklom suncokretu te korovima koji mogu biti izvor inokuluma. Zato je plodored važan čimbenik u smanjenju budućih infekcija. Primjenom svih ostalih preventivnih mjera moguće je utjecati

na smanjenje infekcija. Primjena fungidica pozitivno utječe na smanjenje intenziteta zaraze te u pravilu na povećanje prinosa zrna i ulja. U RH je registriran veći broj navedenih pripravaka koji imaju dozvolu za suzbijanje sive pjegavosti. Zaštitu suncokreta ne treba obavljati niti prerano, ali niti prekasno. Na temelju provedenih pokusa smatra se kako je najbolje primijeniti fungicide u punoj butonizaciji dakle, kada suncokret ima razvijenih 10-12 pari listova. Kod primjene fungicida ima poteškoća zbog habitusa biljaka te pretežno akropetalne translokacije fungicida (Jurković, 2016).

2.2. Eterična ulja

Kako bi se smanjile negativne posljedice upotrebe sintetičkih fungicida kao što su onečišćenje okoliša, fitotoksičnost i rezistentnost, provode se istraživanja kako bi se procijenila učinkovitost i pouzdanost različitih preventivnih i ekološki prihvatljivih mjera zaštite poput agrotehničkih i fizikalnih metoda, biopreparata i kemikalija s malim negativnim utjecajem na okoliš, poput eteričnih (esencijalnih.) ulja (Bittner i sur., 2009.). Eterična ulja su proizvodi ekstrahirani iz različitih dijelova aromatičnih biljaka, posebno iz cvjetova, lišća i plodova. Sadrže aromatične spojeve koje biljke proizvode, a koji imaju alelopatsko i antimikrobno djelovanje te privlače oprašivače. Ove su tvari već dugo predmet proučavanja zbog njihovih baktericidnih i fungicidnih svojstava kao posljedice prisutnosti spojeva koji se mogu klasificirati među alkaloide, fenole, flavonoide, monoterpene, seskviterpene i izoprenoide.

U mnogim usjevima problem uzročnika bolesti koji se prenose sjemenom jedna je od najvećih prijetnji za uspjeh proizvodnje jer može uzrokovati slabiju klijavost sjemena, propadanje mladih biljaka i smanjenje prinosa. Stoga je kontrola patogenih organizama prisutnih u/na sjemenu od vitalnog značaja, posebno za organsku proizvodnju, gdje su na raspolaganju manje učinkovita sredstva za zaštitu bilja.

Sve su veći zahtjevi za smanjenjem upotrebe kemijskih sredstava za zaštitu bilja osobito u proizvodnji biljaka za ljudsku ili životinjsku ishranu. Zbog toga tvari dobivene iz biljaka, poput hidro-alkoholnih ekstrakata ili eteričnih ulja zasigurno mogu imati važnu ulogu u iznalaženju novih prihvatljivih biopreparata. Jedna biljka može proizvoditi veći broj spojeva vrlo širokog spektra djelovanja, a što je u vezi s njihovom različitom kemijskom strukturom.

Eterična ulja su aromatske tekućine koje se dobivaju iz biljnih dijelova različitim metodama (Burt, 2004.). Proces dobivanja eteričnih ulja provodi se hidrodestilacijom i hidrodifuzijom svježih ili osušenih biljaka. Eterična ulja su kompleksne mješavine koje mogu imati preko

100 komponenti, dok samo nekoliko komponenti predstavlja većinu sastava samog ulja. Poznata su dva tipa analitičkih metoda koje se koriste za određivanje komponenti ovisno o tome je li sama komponenta već poznata, ili se traži nova, do tada neotkrivena komponenta. Ukoliko je poznata, ispituje se brzo-skenirajućim masenim spektrometrom koji je povezan s plinskim kromatografom. Ukoliko se traži nova strukturna identifikacija koriste se velike količine čistog uzorka ispitivanog ulja, a ispitivanje se vrši ^{13}C -NMR spektroskopijom (Tomi i sur., 1995.).

Izraz "esencijalno ulje" (EO) osmislio je u 16. stoljeću švicarski reformator medicine Paracelsus von Hohenheim. Eterična ulja obično su složene smjese prirodnih spojeva, i polarnih i nepolarnih. Poznata su po svojim antiseptičkim i ljekovitim svojstvima (analgetici, sedativi, protuupalno, spazmolitičko i antikancerogeno djelovanje), koriste se i u balzamiranju, a zbog svog antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja kao prirodni aditivi u hrani i prehrambeni proizvodi. Međunarodna organizacija za standardizaciju (ISO) (ISO / D1S9235.2) definira esencijalno ulje kao proizvod dobiven destilacijom vodom ili parom ili mehaničkom obradom ili suhom destilacijom prirodnih materijala. Pojavljuju se kao tekuće, hlapljive, prozirne i obojene smjese nekoliko aromatičnih spojeva. EO se dobivaju iz svih biljnih dijelova, uglavnom iz biljaka i začina, iako se trenutno ispituju novi izvori EO, na primjer iz hrane i biljnog otpada (Yang i Clausen, 2007.).

Poznato je oko 3000 eteričnih ulja, od kojih je 300 komercijalno važno, a uglavnom se koriste na tržištu okusa i mirisa. U prirodi EO imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od neprijatelja. Što se tiče ostalih biljnih metabolita, uloga EO-a je zaštita biljnog organizma od nekih patogenih mikroorganizama, djelovanje odbijanja prema kukcima koji djeluju kao prenositelji kuge i smanjenje apetita kod nekih biljojeda (izazivanjem neugodnog okusa do biljke). S druge strane, oni također mogu privući neke kukce kako bi pospješili raspršivanje peludi i sjemena. Dakle, EO mogu igrati ulogu u interakciji biljaka s okolinom. Glavne kategorije spojeva su terpeni i terpenoidi, a rijetko se mogu naći i spojevi koji sadrže dušik i sumpor, kumarini i homolozi fenilpropanoide. Terpeni su velika grupa ugljikovodika koji se javljaju u prirodi, a potječu iz izoprenske jedinice (C_5H_8), s različitim kemijskim svojstvima i biološkim svojstvima. Sintetiziraju se u citoplazmi biljnih stanica putem mevalonske kiseline polazeći od acetyl CoA. Monoterpeni ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}$) i seskviterpeni ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) uglavnom su glavni terpeni, ali također postoje i duži lanci kao što su diterpeni ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}$), triterpeni ($\text{C}_{30}\text{H}_{40}$) itd. Primjeri terpena uključuju p-cimene, limonene, terpinene, sabinene i α - i β -pinene. Monoterpeni su izrađeni od spajanja dviju izoprenskih jedinica.

Oni čine 90% eteričnih ulja i omogućuju veliku raznolikost struktura. Neki od glavnih spojeva uključuju monoterpeneske ugljikovodike (poput limonena, p-cimena, α -pinena i α -terpinena) i oksigenirane monoterpeneske (poput karvakrola, timola i kamfora). Seskviterpeni nastaju iz triju izoprenskih jedinica. Proširenje lanca povećava broj ciklizacija koje omogućuju veliku raznolikost struktura. Građa i funkcija seskviterpena usporedivi su s onima monoterpena. Terpenoidi su spojevi koji se odnose na terpeneske, s određenom funkcionalnošću kisika ili nekim preslagivanjem. Timol, karvakrol, linalil acetat, linalool, piperiton, citronelal, geraniol i mentol smatraju se najpoznatijim terpenoidima. Unutar svake skupine, molekule mogu biti jednostavno nezasićeni ugljikovodici ili sadržavati funkcionalne skupine, a u ovom posljednjem slučaju to su kiseline, alkoholi, aldehidi, ketoni, esteri. Kemijski sastav eteričnih ulja razlikuje se među vrstama i na njega utječu čimbenici kao što su zemljopisni položaj, okoliš, stupanj zrelosti biljaka u trenutku berbe i način ekstrakcije (Wilson i sur., 1997.).

Kako bakterije imaju mogućnost razvijanja otpornosti na antibiotike ne začuđuje činjenica kako je utjecaj eteričnih ulja na rast i razvoj različitih mikroorganizama već duži niz godina tema znanstvenih istraživanja. Takvim istraživanjima pokušavaju se pronaći druga rješenja kojima bi se mogla pristupiti prevenciji i liječenju bakterijskih bolesti. Važna prednost eteričnih ulja jest to što nisu štetna za okoliš te jednostavnost njihove primjene.

Eterično ulje ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) sadrži 1,8-cineol (7 – 27,5 %), α -pinen (3 - 23,4 %), kamfor (3 - 50 %) te mircen (0 - 10 %). Glavne komponente eteričnog ulja lavande prave (*Lavandula angustifolia* ssp. *angustifolia*) su linalol (16 - 28 %), linalil acetat (26 - 47,5 %), 1,8-cineol (5,1 - 15,5 %), lavandulil acetat (1,3 - 4,3 %) te α -terpineol (2,3 - 3,75 %). Eterično ulje timijana (*Thymus vulgaris*) sadrži timol (45 - 79,15 %), p-cimen (3,27 - 21,5 %) i karvakrol (4,63 %) (Reddy i sur., 1998.).

Eterična ulja i komponente od stabljika/lišća i cvjetova *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*, koja raste divlje u južnoj Sardiniji (Italija), ekstrahirani su hidrodestilacijom te je testirana njihova antifungalna aktivnost. Utvrđena je snažna antifungalna aktivnost eteričnih ulja na patogene gljivice *Rhizoctonia solani* i *Fusarium oxysporum*. Eterična ulja su pokazala veću aktivnost, čak i protiv najosjetljivijih gljivica, u usporedbi s pojedinačnim sastojcima. Autori navode da se to može objasniti time da i manje zastupljeni spojevi imaju utjecaj na protu gljivično djelovanje ili da je antifungalna aktivnost rezultat sinergizma između različitih spojeva u ekstraktima (Palfi, 2017).

Eterično ulje ružmarina pokazalo je snažno antifungalno djelovanje protiv *Aspergillus flavus* (PTCC = 5004). Utvrđeno je da je ulje ružmarina, u razrjeđenju 1, 1/2 i 1/4, pokazalo snažnije antifungalno djelovanje od antibiotika. Umjerenu antifungalnu aktivnost pokazao je borneol u 10 % - tnom razrjeđenju. Fungicid Benomil (10 % - tni) nema inhibitorni učinak na *A. flavus*. Autori zaključuju da je veliki postotak antifungalne aktivnosti ulja ružmarina vezan za sadržaj monoterpena, posebno α -pinena kao glavne komponente (Moghtader i sur., 2011.).

Bioaktivnost eteričnog ulja timijana kao i razvijene formulacije – koncentrata za emulziju (EC) testirana je u pokusima *in vitro* i *in vivo* na gljivicu *Monilinia fructigena*. *In vitro* ispitivanja su pokazala da i eterično ulje i razvijena formulacija značajno inhibiraju porast micelija izolata gljivice *M. fructigena*. U *in vivo* ispitivanjima na inokuliranim plodovima jabuke pokazano je da je procesom formuliranja značajno smanjena isparljivost ulja s tretirane površine i postignuta inhibicija razvoja truleži ploda 64,7 do 72,1 % u usporedbi s kontrolom. Istraživači su razvili EC formulaciju eteričnog ulja timijana za uporabu u poljoprivredi (Tanović i sur, 2013).

3. MATERIJALI I METODE

Cilj istraživanja bio je utvrditi fugnistatični učinak eteričnih ulja lavande, ružmarina i timijana u količinama 5, 15, 25 i 50 μL na gljive iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis* (*Diaporthe helianthi*, *Diaporthe linearis*, *Phomopsis cotoneastri*, *Diaporthe angelicae*, *Diaporthe caulivora*, *Diaporthe phaseolorum*, *Diaporthe longicolla*, *Diaporthe meridionalis*).

Ovo istraživanje provedeno je 2020. godine u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

Na slici 1 prikazana su eterična ulja koja su korištena prilikom provedbe ovoga eksperimenta.



Slika 1. Eterična ulja koja su potrebna za izvođenje pokusa (lavanda, ružmarin i timijan)

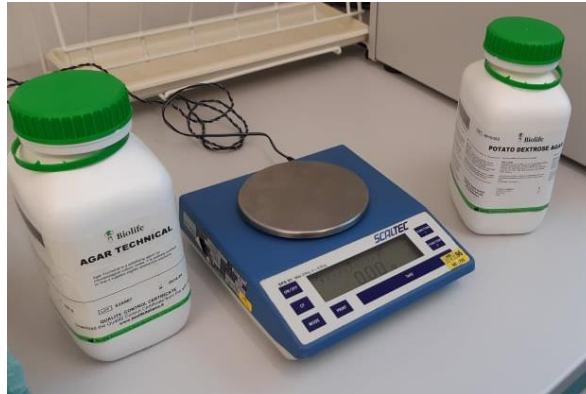
(Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Osim eteričnih ulja, u navedenom je istraživanju korišten i ostali pribor koji je prikazan na sljedećim slikama 2, 3 i 4.



Slika 2. Pribor za postavljanje pokusa

(Izvor: Marko Župarić, 2020.)



Slika 3. Tehnički agar i krumpir dekstrozni agar
(Izvor: Marko Župarić, 2020.)



Slika 4. Pipete
(Izvor: Marko Župarić, 2020.)

3.1. Postavljanje pokusa

Hranjive podloge kuhaju se s destiliranom vodom. U Erlenmeyerovu tikvicu, u kojoj se nalazi 500 mL destilirane vode, dodaje se 21 g krumpir dekstroznog agara i 1,40 g tehničkog agara koje prethodno odvažemo pomoću digitalne vage. Smjesa se kuha oko 1h u konstantno kipućoj vodi u loncu. Nakon toga potrebno je tikvicu poklopiti aluminijskim čepom, umotati u novine te staviti u autoklav na sterilizaciju. Sterilizacija traje 20 minuta na temperaturi 120 °C, a ukupan rad autoklava traje 90 minuta.

Na slici 5 prikazana je priprema za izlivanje hranjive podloge iz Erlenmeyerove tikvice u sterilizirane Petrijeve zdjelice. Petrijeve zdjelice slažu se u posebne aluminijske stalke te se potom stavljaju u autoklav koji ih sterilizira na 120 °C. Nakon završetka procesa bitno je ne otvarati petrijevke do trenutka nasipavanja hranjive podloge.



Slika 5. Izlivanje hranjive podloge u Petrijeve zdjelice
(Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Nakon što se izlivena hranjiva podloga ohladi, stavlja se u hladnjak kako je prikazano na slici 6 gdje se čuvaju do trenutka naciepljivanja gljiva i apliciranja eteričnih ulja koje koristimo u istraživanju.



Slika 6. Pripremljene hranjive podloge

(Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Čiste kulture gljiva koje istražujemo buše se pomoću metalnog kružnog rezača, uz sami rub Petrijeve zdjelice, a potom se pomoću sterilne laboratorijske igle uzimaju isječki i stavljaju na određeno mjesto u Petrijevu zdjelicu. Gljive se stavljaju nasuprotno na četiri mjesta, a u samo središte zdjelice pomoću pincete stavlja se okrugli sterilni filter papir na koji se aplicira pokusom predviđena količina eteričnog ulja.

Na slici 7 prikazana je termostatska komora koja je postavljena na temperaturu od 22 °C i svjetlosni režim 12 sati dan/12 sati noć. Komora se redovito puni destiliranom vodom kako bi se održala zadana klima.



Slika 7. Termostat komora
(Izvor: Marko Župarić, 2020.)

3.2. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci statistički su obrađeni u programu Statistica for Windows.

4. REZULTATI

4.1. *Diaporthe helianthi*

Tablica 1 prikazuje zonu inhibicije za *Diaporthe helianthi* 6. dan od nacjepljivanja. Nakon šestog dana može se uočiti kako je ulje lavande u količini 50 µl potpuno inhibiralo porast micelija u odnosu na ostale primjenjene količine dok je ulje timijana potpuno inhibiralo porast gljive i pri najmanjoj primjenjenoj količini 5 µl. Ulje ružmarina u količini 50 µl statistički je značajno inhibiralo porast gljive u odnosu na ostale primjenjene količine.

Uspoređujemo li učinak različitih ulja primjenjenih u istoj količini vidimo da je ulje timijana u svim količinama statistički vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na ulje ružmarina te u količinama 5, 15 i 25 µl u odnosu na ulje lavande. Ulje lavande je statistički značajno jače inhibiralo rast micelija u odnosu na ulje ružmarina pri količinama 5 i 15 µl, a statistički vrlo značajno jače pri količinama 25 i 50 µl.

Tablica 1. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe helianthi*

| <i>Ulje</i> | 5 µl | 15 µl | 25 µl | 50 µl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 1,91 | 4,66 | 15,08 | 30 | 1,29 1,88 |
| <i>Ružmarin</i> | 0,75 | 2,41 | 1,16 | 4,41 | 1,71 2,50 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0,88 | 1,57 | 1,21 | 1,48 | |
| <i>0,01</i> | 1,33 | 2,38 | 1,84 | 2,24 | |

Tablica 2 prikazuje zonu inhibicije za *Diaporthe helianthi* 9. dan od nacjepljivanja.

Tablica 2. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe helianthi*

| <i>Ulje</i> | 5 μl | 15 μl | 25 μl | 50 μl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 1,83 | 2,25 | 21,66 | 1,52 2,21 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 1,08 | 0,33 | 0 | 1,71 2,49 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0 | 0,80 | 1,01 | 1,66 | |
| <i>0,01</i> | 0 | 1,21 | 1,53 | 2,52 | |

Devet dana od nacjepljivanja ulje lavande primjenjeno u količini 50 μ l statistički je vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na sve ostale količine. Ulje ružmarina nije inhibiralo porast gljive niti pri najvećoj količini (50 μ l). Ulje timijana u potpunosti je inhibiralo porast *D. helianthi* pri svim primjenjenim količinama.

4.2. *Diaporthe linearis*

Tablica 3 prikazuje vrijednosti zone inhibicije za *Diaporthe linearis* 6. dan od nacjepljivanja. Ulje timijana je pri svim primjenjenim količinama potpuno inhibiralo rast gljive te je statistički vrlo značajno jače inhibiralo rast micelija u odnosu na druga dva eterična ulja primjenjena u istoj količini.

Tablica 3. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaphorte linearis*

| <i>Ulje</i> | 5 µl | 15 µl | 25 µl | 50 µl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------|
| <i>Lavanda</i> | 1,66 | 7 | 3,58 | 10,83 | 2,16 3,14 |
| <i>Ružmarin</i> | 8 | 1,08 | 2,08 | 4 | 1,68 4,44 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 1,09 | 1,66 | 1,18 | 2,33 | |
| <i>0,01</i> | 1,65 | 2,52 | 1,78 | 3,53 | |

U tablici 4 prikazana zona inhibicije za *Diaphorte linearis* 9. dan od nacjepljivanja. Ulje lavande je pri primijenjenoj količini 5 µl statistički značajno, odnosno vrlo značajno slabije djelovalo na porast gljive u odnosu na ostale primijenjene količine. Ulje ružmarina je imalo najjače antifungalno djelovanje pri količini 5 µl, a ulje timijana je statistički jače inhibiralo porast gljive kod primjene ulja u količinama 15, 25 i 50 µl u odnosu na djelovanje ulja u količini 5 µl.

Tablica 4. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaphorte linearis*

| <i>Ulje</i> | 5 µl | 15 µl | 25 µl | 50 µl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 3,41 | 2,66 | 10,58 | 1,85 2,70 |
| <i>Ružmarin</i> | 6,66 | 0,41 | 2 | 2,58 | 1,29 1,88 |
| <i>Timijan</i> | 29,16 | 30 | 30 | 30 | 0,83 1,20 |
| <i>LSD 0,05</i> | 1,77 | 1,65 | 0,73 | 1,52 | |
| <i>0,01</i> | 2,68 | 2,50 | 1,10 | 2,30 | |

4.3. *Phomopsis cotoneastri*

U tablici 5 prikazane su vrijednosti zone inhibicije za *Phomopsis cotoneastri* 6. dan od nacjepljivanja. Šest dana od nacjepljivanja najjače antifungalno djelovanje imalo je ulje timijana dok su ulja ružmarina i lavande imala statistički vrlo značajno slabije fungistatično djelovanje.

Tablica 5. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Phomopsis cotoneastri*

| <i>Ulje</i> | 5 µl | 15 µl | 25 µl | 50 µl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 2,08 | 1,41 | 9,66 | 7,75 | 1,73 2,52 |
| <i>Ružmarin</i> | 0,91 | 1,16 | 5,33 | 4 | 1,31 1,91 |
| <i>Timijan</i> | 29,75 | 30 | 30 | 30 | 0,24 0,34 |
| <i>LSD 0,05</i> | 1,37 | 0,69 | 1,99 | 0,91 | |
| <i>0,01</i> | 2,08 | 1,04 | 3,02 | 1,38 | |

Prema rezultatima navedenim u tablici 6 ulje lavande 9. dan od nacjepljivanja primjenjeno u količini 5 µl nije pokazalo fungistatičan utjecaj (zona inhibicije 0) dok je u količini 50 µl statistički značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na količine 5, 15 i 25 µl istog ulja.

Ulje ružmarina primjenjeno u količini 50 µl statistički je vrlo značajno inhibiralo porast gljive u odnosu na sve ostale primjenjene količine.

Ulje timijana djelovalo je jako dobro i imalo jako antifungalno djelovanje na gljivu te je i pri najmanjoj primijenjenoj količini od 5 µl gotovo u potpunosti inhibiralo porast micelija. Razlika u djelovanju ulja s povećanjem primjenjene količine nije bilo.

Ulje timijana je u svim primjenjivanim količinama statistički vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na ulje lavande i ružmarina u istim količinama.

Tablica 6. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Phomopsis cotoneastri*

| <i>Ulje</i> | 5 μ l | 15 μ l | 25 μ l | 50 μ l | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-----------|------------|------------|------------|---------------------|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 0,5 | 2,25 | 4,41 | 0,76 1,10 |
| <i>Ružmarin</i> | 0,33 | 0,83 | 2 | 4 | 0,90 1,31 |
| <i>Timijan</i> | 29,33 | 30 | 30 | 30 | 0,54 0,79 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0,94 | 0,60 | 0,58 | 0,97 | |
| <i>0,01</i> | 1,43 | 0,91 | 0,87 | 1,47 | |

4.4. *Diaporthe angelicae*

I šestog i devetog dana od nacjepljivanja ulje lavande primjenjeno u količini 50 μ l statistički je vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na sve ostale primjenjene količine (tablica 7). Isto ulje statistički je vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija ispitivane gljive u odnosu na ulje ružmarina uz primjenu 15, 25 i 50 μ l ulja. Ulje timijana u potpunosti je inhibiralo porast micelija *D. angelicae* pri svim primjenjenim količinama šest dana nakon postavljanja pokusa, a devet dana od postavljanja pokusa zona inhibicije se pri primjeni 5 μ l smanjila.

Tablica 7. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe angelicae*

| <i>Ulje</i> | 5 μl | 15 μl | 25 μl | 50 μl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>Lavanda</i> | 5,75 | 10,16 | 14,33 | 30 | 1,14 1,67 |
| <i>Ružmarin</i> | 6,75 | 3,41 | 5,08 | 9,41 | 1,45 2,11 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 1,29 | 0,94 | 1,60 | 0,17 | |
| <i>0,01</i> | 1,95 | 1,43 | 2,42 | 0,25 | |

Tablica 8. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe angelicae*

| <i>Ulje</i> | 5 μl | 15 μl | 25 μl | 50 μl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>Lavanda</i> | 5,16 | 1,91 | 2,5 | 20,25 | 1,35 1,96 |
| <i>Ružmarin</i> | 5,58 | 0,91 | 2,16 | 2 | 1,22 1,78 |
| <i>Timijan</i> | 28,5 | 30 | 30 | 30 | 1,25 1,81 |
| <i>LSD 0,05</i> | 2,05 | 1,25 | 0,97 | 0,76 | |
| <i>0,01</i> | 3,11 | 1,89 | 1,47 | 1,16 | |

4.5. *Diaporthe caulivora*

U tablici 9 prikazane su zone inhibicije za *Diaporthe caulivora* 6. dan od nacjepljivanja.

Tablica 9. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe caulivora*

| <i>Ulje</i> | 5 μ l | 15 μ l | 25 μ l | 50 μ l | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-----------|------------|------------|------------|---------------------|
| <i>Lavanda</i> | 5,5 | 3,75 | 18,97 | 11,16 | 1,24 1,82 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 3,41 | 17 | 1,24 1,76 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| LSD 0,05 | 0,50 | 0,76 | 1,21 | 1,48 | |
| 0,01 | 0,76 | 1,16 | 1,84 | 2,24 | |

Deveti dan od postavljanja pokusa ulje lavande pri najvećoj primijenjenoj količini od 50 μ l statistički vrlo značajno jače je inhibiralo porast micelija u odnosu na sve ostale primijenjene količine ulja (tablica 10). Pri količini od 5 i 15 μ l ulje ružmarina nije pokazalo nikakav fungistatičan utjecaj jer je micelij prerastao Petrijevu zdjelicu, a pri količini od 25 i 50 μ l antifungalno djelovanje bilo značajno pri čemu je ulje pri 50 μ l statistički vrlo značajno jače djelovalo u odnosu na količine od 25, 15 i 5 μ l. Ulje timijana potpuno je inhibiralo rast gljive.

Tablica 10. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe caulivora*

| <i>Ulje</i> | 5 μ l | 15 μ l | 25 μ l | 50 μ l | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-----------|------------|------------|------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 0,33 | 6,91 | 8,58 | 0,94 1,37 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 2,75 | 7,25 | 0,91 1,33 |
| <i>Timijan</i> | 29,91 | 30 | 30 | 30 | 0,14 0,18 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0,17 | 0,67 | 1,23 | 0,78 | |
| <i>0,01</i> | 0,25 | 1,01 | 1,87 | 1,18 | |

4.6. *Diaporthe phaseolorum*

U tablici 11 prikazane su zone inhibicije za *Diaphorte phaseolorum* 6. dan od nacjepljivanja, a u tablici 12 devetog dana od nacjepljivanja.

Tablica 11. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaphorte phaseolorum*

| <i>Ulje</i> | 5 μ l | 15 μ l | 25 μ l | 50 μ l | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|-----------|------------|------------|------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 2,83 | 0,58 | 12,41 | 7,91 | 1,67 2,43 |
| <i>Ružmarin</i> | 3,66 | 1,91 | 1,91 | 9 | 0,88 1,28 |
| <i>Timijan</i> | 29,25 | 30 | 30 | 30 | 1,22 1,78 |
| <i>LSD 0,05</i> | 2,05 | 1,18 | 1,03 | 0,97 | |
| <i>0,01</i> | 3,11 | 1,78 | 1,55 | 1,47 | |

Eterično ulje lavande u količini 50 μ l deveti dan od postavljanja pokusa statistički je značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na količinu 25 μ l istog ulja. Pri količinama

ulja 5 i 15 μ l nije utvrđeno fungistatično djelovanje niti ulja lavande niti ulja ružmarina. Ulje timijana u potpunosti je inhibiralo rast gljive. Također, ulje timijana je statistički vrlo značajno inhibiralo rast micelija pri svim količinama u odnosu na preostala dva ulja. Devetog dana od nacjepljivanja zona inhibicije pri primjeni ulja timijana u količini 5 μ l se smanjila pri čemu je ta zona inhibicija bila statistički vrlo značajno manja u odnosu na zonu inhibicije pri primjeni ulja u većim količinama.

Tablica 12. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe phaseolorum*

| <i>Ulje</i> | 5 μl | 15 μl | 25 μl | 50 μl | LSD 0,05 0,01 |
|-----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 0 | 2,25 | 6,91 | 0,72 1,05 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 1,58 | 6,16 | 0,30 0,44 |
| <i>Timijan</i> | 24 | 30 | 30 | 30 | 1,25 1,81 |
| <i>LSD 0,05</i> | 1,53 | 0 | 0,60 | 0,74 | |
| <i>0,01</i> | 2,31 | 0 | 0,91 | 1,13 | |

4.7. *Diaporthe longicolla*

U tablici 13 prikazane su zone inhibicije za *Diaphorte longicolla* šesti dan od nacjepljivanja, a u tablici 14 devetog dana od nacjepljivanja.

Eterično ulje lavande šestog dana od postavljanja pokusa potpuno je inhibiralo rast micelija u količini 50 μ l, a ulje timijana pri svim korištenim količinama. Najslabije antifungalno djelovanje imalo je ulje ružmarina. Ista situacija je ostala i devetog dana nakon postavljanja pokusa.

Tablica 13. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe longicolla*

| <i>Ulje</i> | <i>5 μl</i> | <i>15 μl</i> | <i>25 μl</i> | <i>50 μl</i> | <i>LSD</i> <i>0,05</i> <i>0,01</i> |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 10,66 | 25,33 | 30 | 1,66 2,41 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 0 | 11,41 | 0,89 1,30 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0 | 1,92 | 0,67 | 1,09 | |
| <i>0,01</i> | 0 | 2,91 | 1,01 | 1,65 | |

Tablica 14. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe longicolla*

| <i>Ulje</i> | <i>5 μl</i> | <i>15 μl</i> | <i>25 μl</i> | <i>50 μl</i> | <i>LSD</i> <i>0,05</i> <i>0,01</i> |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 0,5 | 6,16 | 29,58 | 1,17 1,70 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 0 | 8,66 | 0,72 1,05 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0 | 0,10 | 0,60 | 1,21 | |
| <i>0,01</i> | 0 | 1,51 | 0,91 | 1,84 | |

4.8. *Diaporthe meridionalis*

Sljedeća tablica (tablica 15) prikazuje porast micelija *Diaporthe meridionalis* 6. dan od nacjepljivanja te rezultate odnosno iznose porasta pri određenoj količini eteričnog ulja.

Tablica 15. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe meridionalis*

| <i>Ulje</i> | <i>5 µl</i> | <i>15 µl</i> | <i>25 µl</i> | <i>50 µl</i> | <i>LSD</i> <i>0,05</i> <i>0,01</i> |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 0 | 11,16 | 30 | 1,34 1,95 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 0 | 7 | 0,24 0,34 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0 | 0 | 1,64 | 0,29 | |
| <i>0,01</i> | 0 | 0 | 2,48 | 0,44 | |

Eterično ulje lavande u količini od 25 µl 6. dan mjerenja inhibicije imalo je vrlo značajne razlike u odnosu na količinu od 15 µl te da je značajno jače inhibiralo porast micelija. Količina ulja od 5 µl i 15 µl nije imala negativan utjecaj na porast micelija gljive, drugim riječima ulja nisu inhibirala rast gljive te se isto vidi u 9. danu mjerenja inhibicije.

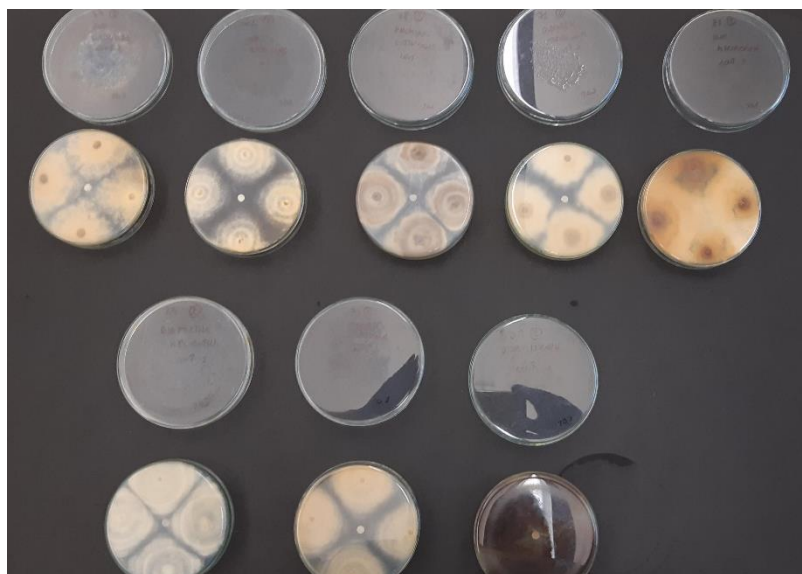
9. dan od postavljanja pokusa eterično ulje ružmarina u svim količinama od 5 µl, 15 µl, 25 µl i 50 µl nije imalo negativan utjecaj na micelij gljive *Diaporthe meridionalis*, odnosno micelij je prerastao Petrijevu zdjelicu te to ulje nije imalo fungistatičan utjecaj.

Iz podataka koji su prikazani u tablici može se zaključiti kako je ulje timijana djelovalo jako dobro i imalo jako antifungalno djelovanje na gljivu/e, te pri najmanjoj primjenjenoj količini od 5 µl, ali i da se s povećanjem količine ulja timijana nije statistički povećao antifungalni učinak. Statistički ulje timijana je pri količini od 5 µl značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na ulje lavande i ružmarina u istoj količini.

Tablica 16. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe meridionalis*

| <i>Ulje</i> | <i>5 μl</i> | <i>15 μl</i> | <i>25 μl</i> | <i>50 μl</i> | <i>LSD</i> <i>0,05</i> <i>0,01</i> |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| <i>Lavanda</i> | 0 | 0 | 0,33 | 8,16 | 0,80 1,17 |
| <i>Ružmarin</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Timijan</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 0 |
| <i>LSD 0,05</i> | 0 | 0 | 0,67 | 0,73 | |
| <i>0,01</i> | 0 | 0 | 1,01 | 1,10 | |

Porast gljiva devet dana nakon nacjepljivanja u prisustvu različitih eteričnih ulja prikazan je na slici 8.



Slika 8. Porast gljiva nakon devet dana
(Izvor: Marko Župarić, 2020.)

5. RASPRAVA

Učinak eteričnih ulja na rast i razvoj gljiva ovisi o vrsti gljive, vrsti i količini primjenjenog ulja, načinu primjene, kemijskom sastavu ulja, zemljopisnom porijeklu biljaka iz kojih je ulje ekstrahirano i vremenu berbe/žetve i dužini inkubacije (Palfi 2017.).

Provedenim istraživanjima u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek utvrdili smo da na sve ispitivane gljive iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis* eterično ulje timijana ima najjače antifungalno djelovanje i to pri svim primjenjenim količinama ulja što se podudara s rezultatima Reddy i sur. (1998.), Soyulu i sur. (2006.), Palfi (2017.) i Palfi i sur. (2018.). Ćosić i sur. (2010.) navode da je na gljivu *Fusarium graminearum* od 11 ispitivanih ulja samo ulje timijana imalo značajno supresivno djelovanje. Ulje timijana je u našem istraživanju u gotovo svim tretmanima i devet dana nakon postavljanja pokusa potpuno inhibiralo rast svih ispitivanih gljiva. Ćosić i sur. (2010.) navode da ulje timijana nije imalo nikakvo antifungalno djelovanje na *Tanatephorus cucumeris*.

U našim je istraživanjima utvrđeno da je na ispitivane gljive najslabije antifungalno djelovanje imalo ulje ružmarina. Prema Ćosić i sur. (2010.) ulje ružmarina primjenjeno u količini 5 μ l je imalo supresivno djelovanje na dvije od 12 ispitivanih gljiva. Dragoni i Vallone (2009.) su ispitivali djelovanje ulja ružmarina na sedam fitopatogenih gljiva te navode da je djelovanje ulja značajno ovisilo o vrsti gljive.

Ulje lavande je imalo značajno antifungalno djelovanje na većinu ispitivanih gljiva pri primjenjenim količinama 25 i 50 μ l. Ipak, u jačini supresivnog djelovanja između ulja timijana i ulja lavande utvrđene su statistički vrlo značajne razlike u korist eteričnog ulja timijana.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog laboratorijskog istraživanja o antifungalnom djelovanju eteričnih ulja ružmarina, lavande i timijana na vrste kompleksa *Diaporthe/Phomopsis* može se zaključiti sljedeće:

1. Različita eterična ulja imaju različito antifungalno djelovanje na različite vrste kompleksa *Diaporthe/Phomopsis*.
2. Isto eterično ulje može imati različito antifungalno djelovanje na različite vrste kompleksa *Diaporthe/Phomopsis*.
3. Antifungalni učinak eteričnih ulja može se pojačavati s povećanjem primjene količine ulja.
4. S povećanjem dužine inkubacije može se smanjivati učinak eteričnih ulja.
5. Ulje timijana ima jak negativni utjecaj na rast micelija gljiva iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis*. Ulje timijana je u našem istraživanju u gotovo svim tretmanima i devet dana nakon postavljanja pokusa potpuno inhibiralo rast svih ispitivanih gljiva.

7. POPIS LITERATURE

1. Bittner, M., Aguilera, M., Hernández, V., Arbert, C., Becerra, J., Casanueva, M. (2009.): Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (Chilean Minimiaceae). *Chileanjar*, 69(1): 30-37.
2. Burt, S., (2004.). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
3. 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.
4. Dragoni, I., Vallone, L. (2009.): Antifungal activity of rosemary essential oil against foodstuffs fungi. *A.I.V.I. giugno*, 17-20.
5. Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2016.): Pseudogljive i gljive ratarskih kultura. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
6. Moghtader M, Salari H, Farahm A. (2011.): Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. *J Ecol Nat Environ.*, 3(6): 210-214.
7. Palfi, M. (2017.): Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u in vitro uvjetima. Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
8. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., Ćosić, J. (2018.): Antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*. *Poljoprivreda*, 24(2): 20-26.
9. Piyo, A., Udomsilp, J., Khang-Khun, P., Thobunluepop, P. (2009.): Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2: S2-S9.
10. Reddy, M. V., Angers, P., Gosselin, A. (1998.): Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberries fruits. *Phytochemistry*, 47: 1515-1520.
11. Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, U.,

- Suppakul, P. (2008.): Antifungal Activity of Clove and Cinnamon Oil and Their Synergistic Against Postharvest Decay Fungi of Grape in vitro. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 42 : 169 – 174.
12. Tanović B, Gašić S, Hrustić J, Mihajlović M, Grahovac M, Delibašić, Stevanović M. (2013.): Development of Thyme Essential Oil Formulation and Its Effect on *Monilinia fructigena*. *Pestic Phytomed* 28(4):273-280
 13. Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., Casanova, J. (1995.): Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, 25-34.
 14. Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M. E. (1997.): Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.*, 81:204-210.
 15. Yang, V.W., Clausen, C.A. (2007.): Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 302-306.

8. SAŽETAK

Cilj je ovoga rada utvrditi fungistatični učinak eteričnih ulja ružmarina, lavande i timijana na osam vrsta iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis*. Ulja su primjenjena u količinama 5, 15, 25 i 50 μ l. Temeljem rezultata provedenih istraživanja može se zaključiti da eterično ulje timijana ima najjače antifungalno djelovanje na ispitivane gljive. Najslabije djelovanje imalo je ulje ružmarina.

Ključne riječi: fungistatični učinak, eterično ulje, zona inhibicije, *Diaporthe/Phomopsis*

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the fungistatic effect of rosemary, lavender and thyme essential oils on eight species from the *Diaporthe/Phomopsis* complex. The oils were applied in amounts of 5, 15, 25 and 50 μ l. Based on the results of the research, it can be concluded that thyme essential oil has the strongest antifungal effect on the examined fungi. Rosemary oil had the weakest effect.

Keywords: fungistatic effect, essential oils, inhibition zone, *Diaporthe/Phomopsis*

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaphorte helianthi*

Tablica 2. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaphorte helianthi*

Tablica 3. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaphorte linearis*

Tablica 4. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaphorte linearis*

Tablica 5. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Phomopsis cotoneastri*

Tablica 6. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Phomopsis cotoneastri*

Tablica 7. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe angelicae*

Tablica 8. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe angelicae*

Tablica 9. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe caulivora*

Tablica 10. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe caulivora*

Tablica 11. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaphorte phaseolorum*

Tablica 12. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaphorte phaseolorum*

Tablica 13. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Phomopsis longicola*

Tablica 14. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Phomopsis longicola*

Tablica 15. Zona inhibicije (mm) 6. dan od nacjepljivanja *Diaporthe meridionalis*

Tablica 16. Zona inhibicije (mm) 9. dan od nacjepljivanja *Diaporthe meridionalis*

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Eterična ulja koja su potrebna za izvođenje pokusa (lavanda, ružmarin i timijan) (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 2. Pribor za postavljanje pokusa (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 3. Tehnički agar i krumpir dekstrozni agar (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 4. Pipete (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 5. Izlivanje hranjive podloge u Petrijeve zdjelice (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 6. Pripremljene hranjive podloge (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 7. Termostat komora (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

Slika 8. Porast gljiva nakon devet dana (Izvor: Marko Župarić, 2020.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na vrste kompleksa *Diaporthe* / *Phomopsis*

Marko Župarić

Sažetak:

Cilj je ovoga rada utvrditi fungistatični učinak eteričnih ulja ružmarina, lavande i timijana na osam vrsta iz kompleksa *Diaporthe/Phomopsis*. Ulja su primjenjena u količinama 5, 15, 25 i 50 μ l. Temeljem rezultata provedenih istraživanja može se zaključiti da eterično ulje timijana ima najjače antifungalno djelovanje na ispitivane gljive. Najslabije djelovanje imalo je ulje ružmarina.

Rad je izrađen : Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: Jasenka Ćosić

Broj stranica: 36

Broj slika: 8

Broj tablica : 16

Broj literaturnih navoda: 15

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: fungistatični učinak, eterično ulje, zona inhibicije, *Diaporthe/Phomopsis*

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, član

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

Antifungal activity of essential oils on pathogens of *Diaporthe* / *Phomopsis* complex

Marko Župarić

Summary:

The aim of this study was to determine the fungistatic effect of rosemary, lavender and thyme essential oils on eight species from the *Diaporthe* / *Phomopsis* complex. The oils were applied in amounts of 5, 15, 25 and 50 µl. Based on the results of the research, it can be concluded that thyme essential oil has the strongest antifungal effect on the examined fungi. Rosemary oil had the weakest effect

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: Jasenka Čosić

Number of pages: 36

Number of figures: 8

Number of tables: 16

Number of refereces: 15

Number of attachemets: 0

Original in: Croatian

Keywords: fungistatic effect, essential oils, inhibition zone, *Diaporthe* / *Phomopsis*

Thesis defended on date:

Reviwers:

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, president
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, member

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