

Antifungalni učinak eteričnih ulja na *Colletotrichum* sp. izoliran s paprike

Borić, Dora

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:286032>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



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](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dora Borić

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA NA *Colletotrichum* sp.

IZOLIRAN S PAPRIKE

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dora Borić

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA NA *Colletotrichum* sp.

IZOLIRAN S PAPRIKE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada :

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

Osijek, 2021.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Gljive..... | 3 |
| 2.2. Eterična ulja..... | 3 |
| 2.3. <i>Colletotrichum sp.</i> na paprici | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 11 |
| 3.1. Priprema PDA podloge | 11 |
| 3.2. Eterična ulja..... | 12 |
| 3.3. Postavljanje pokusa | 13 |
| 4. REZULTATI..... | 15 |
| 4.1. Utjecaj eteričnih ulja u količini 5 μ l..... | 15 |
| 4.2. Utjecaj eteričnih ulja u količini 15 μ l..... | 17 |
| 4.3. Utjecaj eteričnih ulja u količini 25 μ l..... | 20 |
| 5. RASPRAVA..... | 23 |
| 6. ZAKLJUČAK | 25 |
| 7. POPIS LITERATURE | 26 |
| 8. SAŽETAK..... | 30 |
| 9. SUMMARY | 31 |
| 10. POPIS TABLICA..... | 32 |
| 11. POPIS SLIKA | 33 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | 34 |
| BASIC DOCUMENTATION CARD | 35 |

1. UVOD

U današnje vrijeme ljudi sve više polažu pažnju očuvanju svojega zdravlja i proizvodnji hrane visoke kakvoće te se stoga sve češće proizvodnja biljaka provodi po načelima integrirane zaštite uz smanjenu uporabu standardnih kemijskih sredstava u zaštiti bilja te uz primjenu preventivnih mjera zaštite kao i metoda biološke zaštite (Parađiković i sur., 2007.). Sredstva za zaštitu bilja potencijalno su vrlo značajni zagađivači prirode pa je za proizvodnju zdravstveno i nutritivno sigurnih proizvoda potrebno uvođenje novih tehnologija zaštite bilja (da Cruz Cabral i sur., 2013.). Budući da je ekološki uzgoj biljaka sve važniji, eterična ulja svojim svojstvima i djelovanjem potencijalno omogućavaju drugačiji pristup zaštiti od uzročnika biljnih bolesti.

Eterična ulja su složeni, prirodni i hlapljivi spojevi intenzivnog mirisa koji se dobivaju iz biljaka te imaju antibakterijsko, antifungalno i antivirusno djelovanje (Kalemba i Kunicka., 2003.). Poznato nam je oko 3000 različitih eteričnih ulja, a za oko 300 je poznato da imaju komercijalnu važnost te se najviše koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj, agronomskoj i farmaceutskoj industriji (Bakkali i sur., 2008.). Sve je veći interes u znanstvenim istraživanjima za eterična ulja zbog njihovih antimikrobnih i antifungalnih svojstava te su ta svojstva dobro istražena protiv širokog spektra organizama kao što su gljive, bakterije i insekti (Singh i Maurya, 2005.). Kemijski sastav eteričnih ulja je složen te ovisi o vrsti biljke, dijelu biljke iz kojeg se uzima, podrijetlu, sezoni berbe i prerade te o uvjetima skladištenja (Burt, 2004; Tajkarimi i sur., 2010.). Brojni znanstvenici istraživali su utjecaj eteričnih ulja i njihovih komponenti na porast micelija različitih gljiva i plijesni koje mogu uzrokovati kvarenje proizvoda i različite bolesti kod biljaka, ljudi i životinja (Pinto i sur., 2009.).

S ciljem pronalaska novih i ekološki prihvatljivih bio fungicida provode se mnoga ispitivanja antifungalnih svojstava eteričnih ulja i njihovih komponenti na važne fitopatogene gljivice (Ćosić i sur., 2010.; Vitoratos i sur., 2013.). Od iznimnog je značaja pronaći ekološki i zdravstveno prihvatljiva sredstva za zaštitu od patogena kod svježe i minimalno obrađene hrane koju potrošači u posljednje vrijeme sve više koriste.

Dokazana je osjetljivost ljudi na gljivične infekcije patogenim gljivicama te isto tako učinkovitost sintetičkih fungicida u njihovoj kontroli. Opasnost za zdravlje postoji zbog povezanosti sa sintetičkim molekulama te se istražuju metode za razvoj antifungalnih sredstava. Prirodni proizvodi (uključujući i eterična ulja) imaju veliki potencijal u suzbijanju patogenih gljiva. Korištenje eteričnih ulja u kontroli patogena koji uzrokuju kvarenje hrane nakon berbe, ima važno mjesto u ispitivanju alternativnih metoda za očuvanje kvalitete svježih namirnica (Moreira i sur., 2016.).

Cilj ovog rada je istražiti antifungalno djelovanje 12 eteričnih ulja na tri izolata *Colletotrichum* sp. koji su izolirani s paprike.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Gljive

Gljive (lat. fungi) ubrajamo među najbrojnije biotske uzročnike biljnih bolesti. Do danas je otkriveno oko 70 000 vrsta gljiva od kojih je oko 10 000 različitih biljnih patogena. Gljive su eukariotski organizmi, mikroskopskih su veličina, heterotrofni su i jednostavne građe, nemaju klorofil tako da ne mogu vršiti fotosintezu, a hrane se gotovom organskom tvari. Razmnožavaju se vegetativno dijeljenjem hifa i nespolnim sporama koje nastaju transformacijom i fragmentacijom hifa te omogućavaju širenje parazita tijekom vegetacije. Spolnim razmnožavanjem spore nastaje nakon spajanja gameta. Spore nastale spolnim razmnožavanjem omogućuju preživljavanje u nepovoljnim uvjetima okoline ili kada nema povoljnog domaćina za zarazu.

Fitopatogene gljive uzrokuju oko 75% bolesti biljaka. Žive na račun domaćina (parazitiraju ga) i tako domaćinu nanose štetu. U biljku prodiru na tri načina: izravno kroz neozlijeđeno biljno tkivo, kroz mehaničke ozljede biljnog tkiva ili kroz prirodne otvore biljaka. Patogene gljive mogu parazitirati jednu ili više biljnih vrsta (Jurković i sur., 2010.).

2.2. Eterična ulja

Eterična ulja upotrebljavaju se još od davnina, a možemo ih definirati kao koncentrirane prirodne proizvode aromatičnih biljaka intenzivnog mirisa. Sadrže veliki broj sastojaka koji mogu usporiti ili u potpunosti zaustaviti rast bakterija, gljiva i drugih mikroorganizama (Bakkali i sur., 2008.). Od 1987. do 2001. godine u više od 500 radova istražen je velik broj eteričnih ulja i njihovih sastojaka kako bi se utvrdila antimikrobna svojstva koja se koriste protiv bakterija i gljivica. Eterična ulja dobivaju se iz različitih dijelova biljaka kao što su sjemenke, listovi, cvjetovi, pupoljci, kora, drvo, plodovi, korijen i grančice. Nazivaju se i hlapivim uljima. Najčešće nisu obojena, tekuća su, topljiva u organskim otapalima te im je gustoća manja od gustoće vode. Topljiva su u običnom biljnom ulju, u alkoholu, žumanjku i u vosku, djelomice su topljiva u vodi i u većoj mjeri u octu (Wildwood, 2002.). Upotrebljavaju se u različitim industrijama kao što su: kozmetička, farmaceutska i poljoprivredna.

Primjenjuju se za pročišćavanje zraka, osobnu higijenu, ali i za očuvanje kvalitete hrane i usjeva. Potrebno ih je čuvati u tamnim, punim i dobro zatvorenim bočicama te na hladnom i zamračenom mjestu. Temperatura ne smije prelaziti 15 °C. Prodiranje zraka u bočicu dovodi do bržeg starenja i ugušćivanja ulja te ono potamni i većinom postanu kisele reakcije (Dimitrov, 2000.). Glavne komponente eteričnog ulja su alkoholi, fenoli, ketoni, aldehidi i ugljikohidrati te su oni ti koji su odgovorni za njihova svojstva poput mirisa i biološke aktivnosti (Sahin i sur., 2004.).

Wildwood (2002.) navodi kako su eterična ulja podcijenjena kao „otpadni nusproizvodi“ biljnog metabolizma dok su istraživanja pokazala da ih biljke koriste kako bi se zaštitile od bolesti, abiotičkog stresa te za privlačenje kukaca za oprašivanje i odbijanje grabežljivaca. Velika prednost eteričnih ulja je što su jednostavna za primjenu i nisu štetna za okoliš.

Posavac i sur. (2014.) proveli su istraživanje o utjecaju jedanaest eteričnih ulja na porast fitopatogene gljive *Macrophomina phaseolina*. Nakon šest dana najbolje rezultate pokazalo je eterično ulje timijana dok je slabiji antifungalni učinak utvrđen kod ulja lavande, bora i gorke naranče. Učinak eteričnog ulja najviše ovisi o metodi koja se primjenjuje pri ispitivanju. Eterična ulja kojima su glavne komponente veliki fenolni spojevi imaju bolji učinak pri direktnoj primjeni dok ulja koja sadrže nefenolne hlapljive spojeve najbolji učinak imaju kada je patogen izložen isparavanjima ulja.

Istraživanjima je utvrđeno da su često kombinacije različitih eteričnih ulja učinkovitije od djelovanja pojedinih eteričnih ulja kada se kontrolira više različitih gljiva. Yang i Clausen (2007.) su utvrdili da je kombinacija eteričnih ulja timijana i čajevca imala manji inhibitorni učinak nego samo primjena ulja timijana te je zaključeno da u toj kombinaciji eteričnih ulja nema sinergijskog djelovanja. Dodatno je zaključeno da ulje čajevca umanjuje antifungalna svojstva ulja timijana. Prema istraživanju Silve i sur. (2008.) ulja limunske trave *Cymbopogon citratus* (L.) Spreng i njegova komponenta citral imaju jako antifungalno djelovanje na vrste roda *Candida*.

Brojni autori utvrdili su djelovanje eteričnih ulja na porast micelija fitopatogenih gljiva. Spoj anetol, koji je ujedno glavna komponenta anisa, prema istraživanju Huang i sur. (2010.) izoliran je iz biljke *Illicium verum* te ima antifungalno djelovanje na rast micelija gljive *F.graminearum* te *F.oxysporum*. Eterično ulje kumina, limunske trave, origana, timijana i limunskog eukaliptusa inhibirala su rast gljive *F.oxysporum* u iznosim 62%, 66%,

57% i 70% tj. 76%. Ulje origana inhibitorno je djelovalo na rast micelija gljiva *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, no ulja lavande, metvice, bora, ružmarina i kadulje nisu imala nikakav utjecaj na rast micelija kod ispitivanih gljiva prema istraživanju Lee i sur. (2007.). Eterično ulje iz cvijeta krizantema *Chrysanthemum coronarium* ima dobar antifungalni učinak protiv dvanaest biljnih patogena. Glavni spojevi u eteričnom ulju su kamfor, α - i β -pineni i liralil acetati. Eterično ulje je pokazalo dobar učinak u in vitro istraživanjima te uzrokuje značajnu inhibiciju rasta hifa, utvrdili su Alvarez i sur.(2001.).

Lee i sur. (2007.) su utvrdili da eterično ulje slatke naranče nije imalo inhibitorni učinak na razvoj gljiva *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. Isti autori su istraživali ulje timijana te su utvrdili da je ovo ulje imalo značajan inhibitorni učinak na rast micelija gljiva *R. solani* i *C. gloeosporioides* dok eterična ulja lavande, bora, ružmarina, kadulje i metvice nisu imala inhibitorni učinak na rast ispitivanih gljiva.

Pérez-Sánchez i sur. (2007.) istraživali su utjecaj eteričnog ulja *Thymus zygis* na 5 različitih gljiva *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Istraživanjem su utvrdili dobar inhibitorni učinak kod svih gljiva kao i komponente 3-oktanol i α -terpinen u smjesi.

Katooli i sur. (2012.) proveli su istraživanje antifungalnog djelovanja eteričnih ulja timijana i eukaliptusa na šest patogenih gljiva: *Asperigillus flavus*, *Pencillium digitatum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. Eukaliptus je potpuno inhibirao porast micelija *Rhizoctonia solani* i *Pythium ultimum* nakon 30 dana u svim ispitivanim koncentracijama. Timijan je inhibirao porast micelija *Pencillium digitatum* u koncentraciji 75 i 100%, a kod *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani* u svim koncentracijama eteričnih ulja nakon 30 dana. Razlike u učinku do dvanaestog dana nisu bile statistički značajne.

Yilmaz i sur. (2016.) istraživali su antifungalni učinak ulja kadulje, ružmarina, origana, eukaliptusa i komorača na gljive *Penicillium expansum*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Botrytis cinerea*. Prema istraživanju najbolje djelovanje u pokusima imalo je eterično ulje origana. Antifungalna aktivnost smanjivala se od eukaliptusa, komorača i kadulje pa sve do ružmarina.

Zambonelli i sur. (1996.) ispitivali su fungistatično djelovanje eteričnih ulja mente, lavande i timijana na *Colletrotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* i *Pythium ultimum*. Istraživanje je dokazalo da sva eterična ulja inhibiraju porast micelija navedenih gljiva. Najučinkovitije je bilo ulje timijana čije se fungistatično djelovanje pripisuje timolu.

Pineda i sur. (2017.) istraživali su utjecaj eteričnog ulja peršina na gljivu *Colletotrichum acutatum*. Istraživanjem je dokazano da svi ekstrakti inhibiraju rast gljive ukoliko su primjenjeni u količinama većim od 100 µg/mL. Analiza ulja utvrdila je da piol, koji je ujedno glavni sastojak ulja peršina ima značajan inhibitorski učinak na navedenu gljivu.

2.3. *Colletotrichum* sp. na paprici

Paprika (*Capsicum annuum* L.) jednogodišnja je biljna vrsta koja pripada porodici *Solanaceae*. Porijeklom je iz Amerike, točnije iz Meksika, odakle se raširila po cijeloj Americi a kasnije i po Europi. Bogata je ljekovitim sastojcima te se često preporuča u prehrani i najzdravija je kad se jede svježa i neobrađena. S obzirom da cvate više puta tijekom vegetacije, berba se obavlja od sredine lipnja do prvih mrazova koji se počinju pojavljivati u rujnu. Ovisno o sorti koja se uzgaja, može narasti čak do 100 cm. Može se koristiti svježa, osušena, konzervirana ili ukiseljena. U današnje vrijeme najveći svjetski proizvođači paprike su Mađarska, SAD, Španjolska, Južna Amerika, Kina i Italija. U Hrvatskoj „Šafran“ je jedini proizvođač paprike te tu kontinentalna Hrvatska zauzima čak 80% (Lešić i sur., 2004.).

Papriku može zaraziti veliki broj uzročnika bolesti kao što su virusi, gljivice, bakterije. Mnogi od tih uzročnika bolesti ne nanose velike ekonomske štete ako su osigurani povoljni uvjeti za uzgoj paprike. Od gljivičnih uzročnika bolesti najznačajniji su: *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium albo-altrum*, *Verticillium dahliae* te *Leveillula taurica* no sve češće dolazi i do značajne pojave *Colletotrichum* sp. (Matotan, 2004.).

Colletotrichum vrste uzrokuju antraknozu paprike na mnogim kultiviranim vrstama kao i pripadnicima spontane flore (Bailey i Jeger., 1992.). Iz roda *Colletotrichum* papriku parazitira veći broj vrsta, a osim paprike one napadaju i zeljaste pa čak i drvenaste biljne vrste. Antraknozu paprike mogu prouzročiti: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. capsici* i *C. coccodes* (Hadden i Black., 1989.). Gljive iz ovoga roda pripadaju odjelu *Ascomycota*, redu *Glomerellales*. Rod je otkriven 1890. godine u SAD-u dok je u Europi utvrđen 1956. godine. Bolest je rasprostranjena na svim područjima uzgoja paprike, više voli toplija i vlažnija područja. Simptome možemo pronaći na listovima (slika 1), zrelim plodovima paprike (slika 2), ali se mogu javiti i na stabljikama, i korijenu biljaka. Simptome možemo prepoznati u obliku sitnih vodenastih pjega koje u početku zahvaćaju površinski dio ploda a zatim, u povoljnim uvjetima se šire i spajaju, razaraju mesnato tkivo ploda te pjege postaju udubljene formirajući simptome koje nazivamo antraknoza (slika 3).

U uvjetima povećane vlažnosti na pjegama može doći do pojave sitnih crnih tvorevina acervula u kojima se nalaze konidije. Pjege se brzo šire te dolazi do njihovog spajanja, a kod ploda dolazi do truljenja i propadanja. Bolest se širi zaraženim sjemenom kao i zaraženim ostacima biljaka. Neke vrste iz ovoga roda mogu prezimiti u polju u obliku mikrosklerocija. Infekciji pogoduju duži periodi povećanog vlaženja lišća, visoka vlaga zraka i duži period kišnog vremena. Štete su najveće na plodovima pred berbu. Da bi se smanjila zaraza potrebno je primjenjivati preventivne mjere sprječavanja zaraze. Potrebno je posijati zdravo sjeme, rasad paprike mora biti zdrav, a ukoliko postoje sve bolesne biljke treba odstraniti i uništiti. Kemijske mjere suzbijanja su važne, a preventivna primjena fungicida nam daje zadovoljavajuće rezultate (Freeman i sur., 1998.).

Prema Tsrer i Johnson (2000.) do 1990-tih, antraknoza krumpira nije se smatrala ekonomski značajnom bolesti u područjima u kojima se uzgajao krumpir. Ali, u posljednje vrijeme se njena važnost povećala zbog uzrokovanja velike ekonomske štete i zahtijevala je mjere suzbijanja u SAD-u i Izraelu. *C. coccodes* je uzrokovao štete na komercijalnim poljima, smanjio je prinose, zarazio tlo i gomolje.

Chupp i Sharf (1986.) utvrdili su da pri povoljnim uvjetima konidije vrlo brzo kličaju te se zbog toga simptomi bolesti mogu pokazati već nakon 3 do 5 dana.



Slika 1. Simptomi antraknoze na listu paprike (Izvor: www.researchgate.net)



Slika 2. Lezije antraknoze na zrelom plodu paprike (Izvor: Katedra za fitopatologiju)



Slika 3. Antraknozom uništeni plodovi paprike (Izvor: Katedra za fitopatologiju)

Prema istraživanju Matotan i sur. (2009.) u Hrvatskoj, točnije na području Virovitičko-podravske županije utvrđene su ekonomski velike štete na plodovima paprike. Utvrđeno je da je do zaraze došlo preko zaraženog sjemena. Dio proizvođača koristi vlastito sjeme koje je dobiveno iz plodova merkantilnog uzgoja koje je kupljeno na tržnici. Razmjeri štete mogu se pripisati velikoj koncentraciji paprike na malom uzgojnom području, ponovljenoj sadnji na istoj površini ali i nepoštivanju plodoreda. Dillard i Cobb (1998.) utvrdili su da patogen može u zemljištu zadržati vitalnost i do 8 godina. Upotreba inficiranog sjemena te zaraženog zemljišta dovodi do velikog broja oboljelih biljaka te one postaju izvor zaraze za zdrave biljke.

3. MATERIJALI I METODE

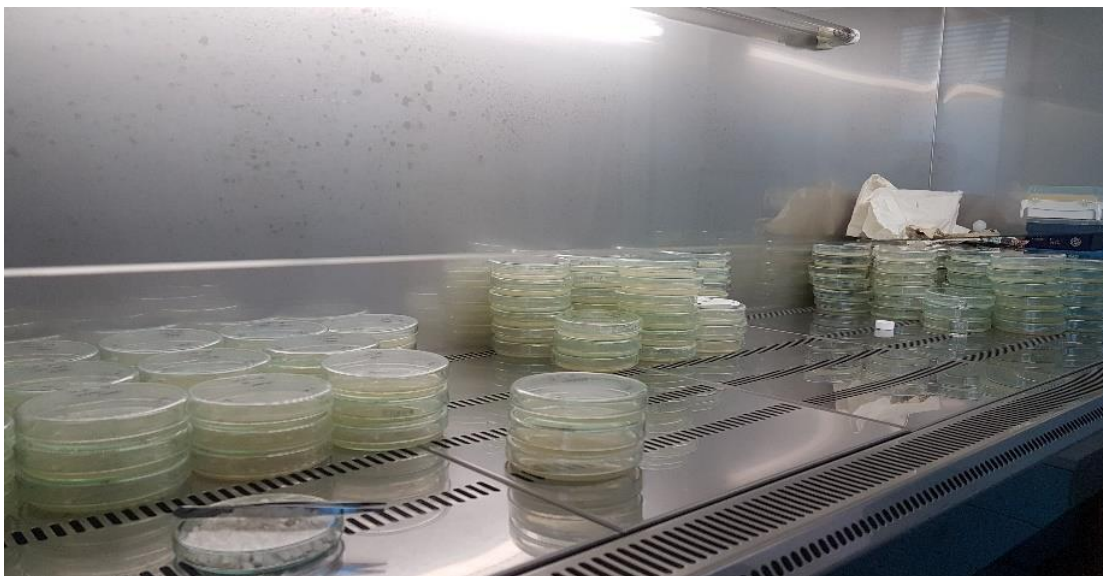
Utvrđivanje inhibitornog djelovanja 12 eteričnih ulja na 3 izolata *Colletotrichum sp.* koji su izolirani s paprike provedeno je u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu na fakultetu Agrobiotehničkih znanosti Osijek.

3.1. Priprema PDA podloge

Pripremu hranjive podloge započinjemo tako da 500 ml destilirane vode naspemo u Erlenmeyer tikvicu te dodajemo 21 g gotovog krumpir dekstroznog agara i 1,4 g tehničkog agara (slika 4) koje prije toga odvažemo pomoću digitalne vage. Smjesa se zatim kuha 1 sat u vodenoj kupelji, odnosno dok se agar ne otopi. Nakon toga tikvicu zatvorimo aluminijskim čepom te stavljamo u autoklav na sterilizaciju. Sterilizacija traje 20 min na temperaturi 120 °C, a rad autoklava sveukupno traje otprilike sat i pol vremena. Kada se temperatura podloge spusti na 60 °C dodajemo u otopinu 0,50 g antibiotika otopljenog u 2 ml sterilne destilirane vode. Petrijeve zdjelice koje su sterilizirane u autoklavu poslažu se laminaru (slika 5), zatim se prethodno pripremljena podloga pipetom razlijeva u Petrijeve zdjelice. Nakon što izlijemo podloge u Petrijeve zdjelice i one se ohlade, stavljamo ih u hladnjak na čuvanje.



Slika 4. Krumpir dekstrozni i tehnički agar (Izvor: Borić, 2019.)



Slika 5. Priprema pokusa u laminaru (Izvor: Borić, 2019.)

3.2. Eterična ulja

U istraživanju je korišteno 12 eteričnih ulja kako bi se utvrdilo djelovanje na 3 izolata *Colletotrichum sp.* s paprike. Eterična ulja su: bor (*Pinus sylvestris* L.), klinčić (*Syzygium aromaticum* L.), eukaliptus (*Eucalyptus globulus* L.), lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), slatka naranča (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), cimet kora (*Cinnamomum verum* Bercht & Presl), timijan (*Thymus vulgaris* L.), čajevac (*Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel.), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), anis (*Pimpinella anisum* L.) i čempres (*Cupressus sempervirens* L.).

Eterična ulja korištena su u količinama 5, 15 i 25 μ l.

3.3. Postavljanje pokusa

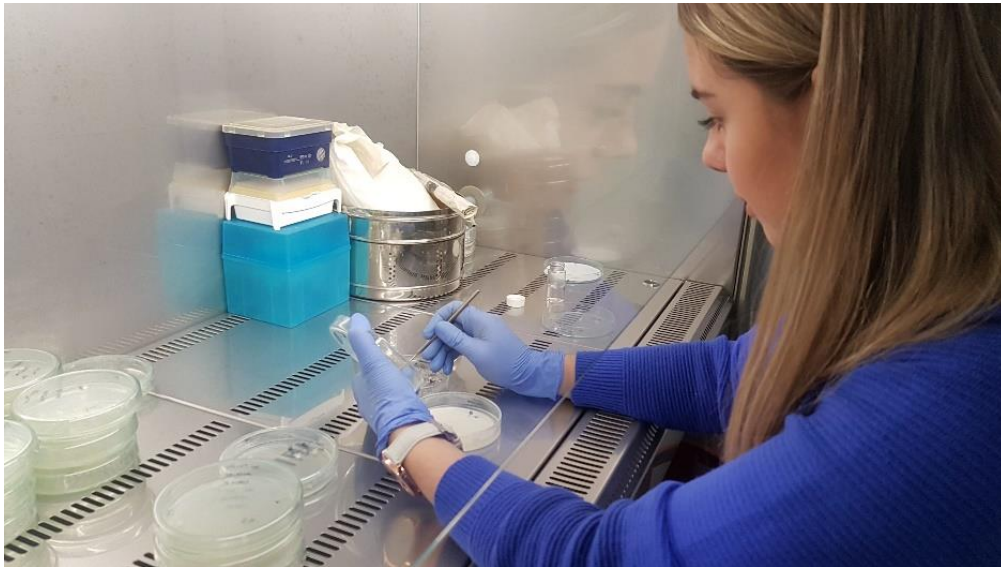
Prije postavljanja samog pokusa potrebno je *Colletotrichum* sp. precijepiti na PDA podlogu i inkubirati u termostatu na 22°C u trajanju 10 do 14 dana kako bi se razvile čiste kulture koje ćemo koristiti u pokusu. Cilj istraživanja je bilo utvrditi učinak 12 eteričnih ulja primijenjenih u količinama 5, 15 i 25 µl na porast 3 izolata *Colletotrichum* sp. Prilikom istraživanja korišteno je sterilizirani pribor: metalna pinceta i metalni kružni rezač. Sav pribor je potrebno sterilizirati na plameniku i u 70% etanolu. Kada su nam PDA podloge pripremljene precijepujemo gljive na podloge te zatim apliciramo eterična ulja u pokusom predviđenim količinama.



Slika 6. Pipetiranje eteričnog ulja na podlogu (Izvor: Borić, 2019.)

Pokus je postavljen u tri ponavljanja za svaku varijantu. Prije postavljanja pokusa potrebno je radne površine dezinficirati etilnim alkoholom. Na svaku Petrijevu zdjelicu potrebno je napisati naziv gljive, naziv eteričnog ulja, primijenjenu količinu ulja, broj ponavljanja i datum rada. U sredinu Petrijeve zdjelice stavljen je kružni isječak filter papira veličine 5 mm i na njega se stavi određena količina eteričnog ulja mikro pipetom (slika 6). Na četiri mjesta na hranjivoj podlozi koja su dijagonalno raspoređena nacijepi se čista kultura gljive koja se buši pomoću metalnog kružnog rezača, uz sami rub Petrijeve zdjelice, a potom se pomoću laboratorijske igle uzima isječak i postavlja na određeno mjesto (slika 7 i 8).

Ispod Petrijeve zdjelice s pripremljenom hranjivom podlogom stavlja se uzorak s označenim mjestima gdje je potrebno staviti gljivu iz čiste kulture. U kontrolnoj varijanti umjesto eteričnog ulja koristili smo sterilnu destiliranu vodu. Zatim se Petrijeve zdjelice stavljaju u termostatsku komoru na temperaturu 22°C i relativnu vlažnost zraka 70% pri režimu svjetla 12 sati svjetlo / 12 sati tama. Mjerenje zone inhibicije smo obavili treći, sedmi i deseti dan od natepljivanja u centimetrima. Pomoću ravnala mjeri se udaljenost od filter papira do ruba micelija gljive.



Slika 7. Precjepljivanje gljiva (Izvor: Borić, 2019.)



Slika 8. Precjepljivanje gljiva (Izvor: Borić, 2019.)

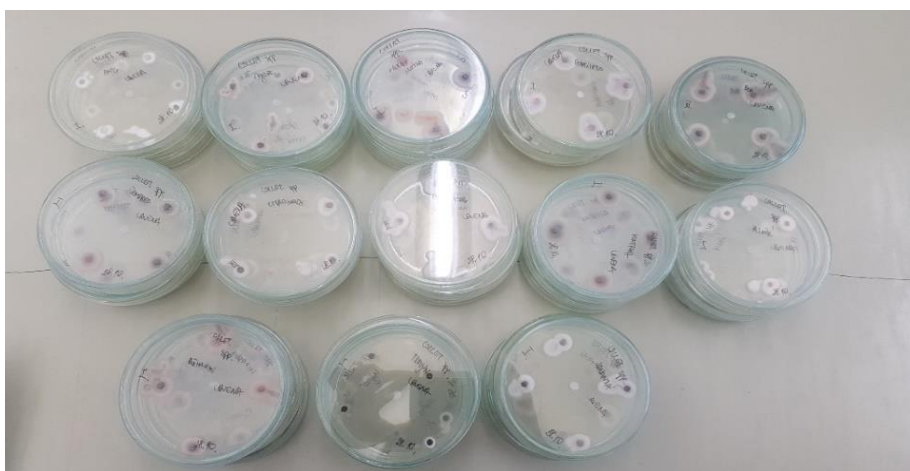
4. REZULTATI

4.1. Utjecaj eteričnih ulja u količini 5 μ l

Mjerenje zone inhibicije se obavlja trećeg, sedmog i desetog dana od nacjepljivanja (Tablica 1). Nakon tri dana od nacjepljivanja nisu utvrđene razlike u djelovanju eteričnih ulja (izuzev timijana) na izolat 1 *Colletotrichum* sp. u odnosu na kontrolu (slika 9). Nakon sedam dana od nacjepljivanja također nisu utvrđene statistički značajne razlike u porastu micelija između kontrole i svih istraživanih ulja izuzev klinčića i timijana. Ulja klinčića i timijana statistički su vrlo značajno inhibirala porast micelija izolata 1 u odnosu na kontrolu. Ista je situacija ostala i deset dana od nacjepljivanja.

Nakon 3 dana od nacjepljivanja statistički značajno slabiji porast micelija izolata 2 u odnosu na kontrolu utvrđen je kod primjene ulja anisa i timijana. Sedam dana od nacjepljivanja ulja timijana i klinčića su statistički vrlo značajno, a ulje kore cimeta statistički značajno inhibirala rast micelija izolata 2 u odnosu na kontrolu. Deset dana od nacjepljivanja sva tri ulja statistički su vrlo značajno inhibirala porast micelija u odnosu na kontrolu i sva ostala ulja uključena u istraživanje.

Eterična ulja timijana i anisa statistički su vrlo značajno inhibirala porast micelija izolata 3 tri dana nakon nacjepljivanja, a sedam i deset dana od nacjepljivanja jedino je ulje timijana statistički vrlo značajno inhibiralo rast gljive.



Slika 9. Utjecaj eteričnih ulja nakon 3 dana od postavljanja pokusa (Izvor: Borić, 2019.)

Tablica 1. Utjecaj eteričnih ulja (5 μ l) na 3 izolata paprike izražen kao zona inhibicije (cm)

| | Izolat 1 | | | Izolat 2 | | | Izolat 3 | | |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana |
| Bor | 1,8 | 0 | 0 | 2,0 | 0,6 | 0 | 1,8 | 0 | 0 |
| Klinčić | 2,3 | 1,5 | 1,0 | 2,3 | 1,5 | 1,0 | 2,1 | 1,5 | 0,9 |
| Eukaliptus | 2,2 | 0 | 0 | 2,3 | 0,7 | 0 | 1,9 | 0 | 0 |
| Naranča slatka | 2,4 | 0,5 | 0 | 2,2 | 0,8 | 0 | 2,1 | 0 | 0 |
| Cimet kora | 2,2 | 0,7 | 0,4 | 2,3 | 1,3 | 0,6 | 2,0 | 1,1 | 0,4 |
| Lavanda | 2,2 | 0 | 0 | 2,1 | 0 | 0 | 2,3 | 0 | 0 |
| Čajevac | 2,3 | 0 | 0 | 2,0 | 0 | 0 | 2,2 | 0 | 0 |
| Anis | 2,4 | 0,7 | 0 | 2,5 | 0 | 0 | 2,4 | 0 | 0 |
| Timijan | 2,7 | 1,7 | 0,8 | 2,6 | 1,9 | 0,8 | 2,5 | 2,2 | 1,7 |
| Citronela | 2,4 | 0,9 | 0 | 2,2 | 1,2 | 0,3 | 2,2 | 0,7 | 0,4 |
| Čempres | 2,0 | 0 | 0 | 2,0 | 0 | 0 | 2,1 | 0,8 | 0 |
| Ružmarin | 2,2 | 0 | 0 | 2,2 | 0 | 0 | 2,2 | 0 | 0 |
| Kontrola | 2,1 | 0,5 | 0 | 2,0 | 0,6 | 0 | 2,0 | 0,7 | 0 |
| LSD 0,05 | 0,34 | 0,55 | 0,36 | 0,30 | 0,64 | 0,28 | 0,27 | 0,61 | 0,64 |
| LSD 0,01 | 0,46 | 0,74 | 0,49 | 0,40 | 0,86 | 0,37 | 0,36 | 0,83 | 0,86 |

4.2. Utjecaj eteričnih ulja u količini 15 μ l

Rezultati mjerenja zone inhibicije obavljenog trećeg, sedmog i desetog dana od nacjepljivanja uz primjenu eteričnih ulja prikazani su u tablici 2. Tri dana od nacjepljivanja samo je eterično ulje timijana statistički vrlo značajno inhibiralo rast micelija *Colletotrichum* sp. izolat 1, izolat 2 i izolat 3 u odnosu na kontrolu. Također, eterično ulje timijana je tri dana nakon nacjepljivanja statistički vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija izolata 1 i 3 u odnosu na sva ostala ispitivana ulja. Isto je ulje statistički vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija izolata 2 u odnosu na sva ulja osim čajevca i anisa. Između djelovanja ulja timijana, anisa i čajevca nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Sedam dana od nacjepljivanja ulja timijana i kore cimeta statistički su vrlo značajno, a ulje klinčića značajno inhibiralo rast izolata 1. Ulja citronele, čempresa, timijana, anisa, kore cimeta i klinčića statistički su vrlo značajno inhibirala porast izolata 2, dok je porast izolata 3 statistički vrlo značajno inhibiralo samo ulje timijana. Ulje bora je statistički značajno inhibiralo rast izolata 2, a ulja klinčića i kore cimeta rast izolata 3.

Deset dana od nacjepljivanja ulje timijana je statistički vrlo značajno inhibiralo porast sva tri ispitivana izolata, ulje kore cimeta porast micelija izolata 1 i 2, a ulje klinčića samo porast izolata 1.

Na slici 10 prikazan je utjecaj ulja lavande na izolat 1, a na slici 11 utjecaj ulja bora na izolat 3.



Slika 10. Utjecaj eteričnog ulja lavande na Colletotrichum sp. izolat 1 (Izvor: Borić, 2019.)



Slika 11. Utjecaj eteričnog ulja bora na Colletotrichum sp. izolat 3 (Izvor: Borić, 2019.)

Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja (15 μ l) na 3 izolata paprike izražen kao zona inhibicije (cm)

| | Izolat 1 | | | Izolat 2 | | | Izolat 3 | | |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana |
| Bor | 1,4 | 0,8 | 0 | 1,9 | 0,7 | 0 | 2,2 | 0,7 | 0 |
| Klinčić | 1,7 | 1,2 | 0,8 | 2,2 | 1,5 | 1,0 | 2,0 | 1,3 | 0 |
| Eukaliptus | 2,0 | 0,7 | 0 | 1,7 | 0 | 0 | 1,6 | 0 | 0 |
| Naranča slatka | 1,7 | 0,6 | 0 | 1,2 | 0,5 | 0 | 1,9 | 0,8 | 0 |
| Cimet kora | 2,3 | 1,7 | 1,3 | 2,1 | 1,3 | 0,9 | 2,2 | 1,3 | 1,0 |
| Lavanda | 2,0 | 0,9 | 0 | 2,3 | 0,8 | 0 | 2,0 | 0 | 0 |
| Čajevac | 2,1 | 1,1 | 0 | 2,8 | 0,6 | 0 | 2,0 | 0,7 | 0 |
| Anis | 2,0 | 0,6 | 0 | 2,6 | 1,5 | 0,6 | 2,3 | 1,1 | 0 |
| Timijan | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 |
| Citronela | 2,0 | 1,0 | 0,4 | 2,0 | 1,0 | 0 | 2,1 | 1,1 | 0 |
| Čempres | 1,9 | 0,9 | 0 | 2,0 | 0,8 | 0 | 1,7 | 0 | 0 |
| Ružmarin | 1,9 | 0 | 0 | 2,3 | 0 | 0 | 2,1 | 0 | 0 |
| Kontrola | 1,8 | 0,5 | 0 | 2,0 | 0,2 | 0 | 1,8 | 0,6 | 0 |
| LSD 0,05 | 0,53 | 0,55 | 0,38 | 0,6 | 0,43 | 0,47 | 0,45 | 0,68 | 0,76 |
| LSD 0,01 | 0,71 | 0,75 | 0,52 | 0,81 | 0,59 | 0,64 | 0,61 | 0,92 | 1,03 |

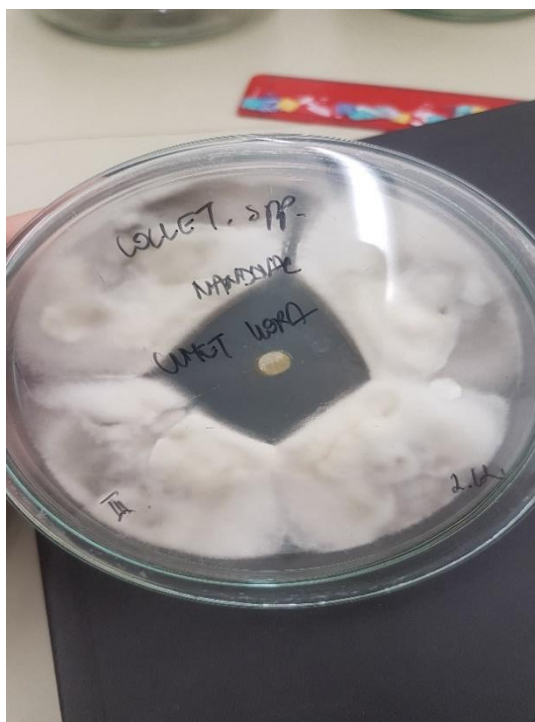
4.3. Utjecaj eteričnih ulja u količini 25 μ l

Tri dana nakon naciepljivanja eterična ulja bora, čajevca, anisa, timijana, citronele i čempresa statistički su vrlo značajno inhibirala porast izolata 1, ulje timijana porast izolata 2, a ulja bora, klinčića, kore cimeta, lavande, čajevca, anisa, timijana, citronele i čempresa porast izolata 3 (Tablica 3).

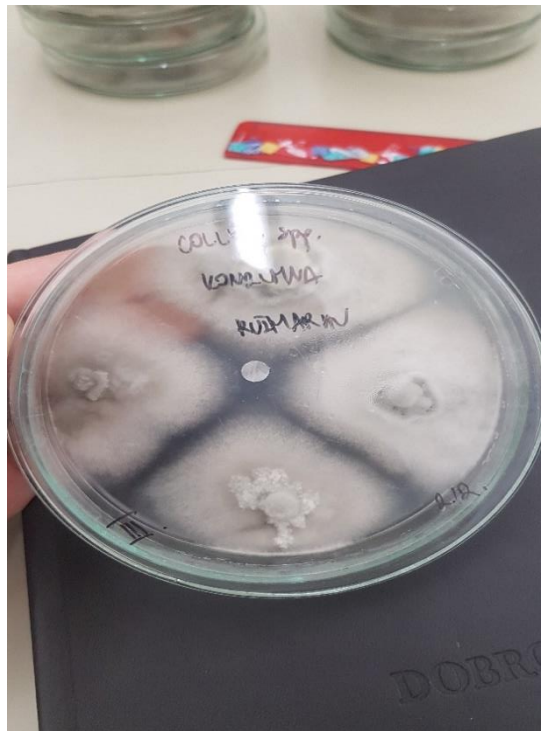
Sedam dana nakon naciepljivanja porast izolata 1 statistički su vrlo značajno inhibirala ulja klinčića, kore cimeta, anisa, timijana, citronele i čempresa, porast izolata 2 eterična ulja klinčića, kore cimeta, čajevca, anisa i timijana, a izolata 3 ulja klinčića, kore cimeta, anisa, timijana i cintronele.

Desetog dana od naciepljivanja ulja klinčića, kore cimeta, anisa, timijana i citronele statistički su vrlo značajno inhibirala porast micelija izolata 1, ulja klinčića, kore cimeta, timijana i anisa porast micelija izolata 2 i izolata 3.

Na slici 12 prikazan je utjecaj ulja kore cimeta na izolat 2, a na slici 13 utjecaj ulja ružmarina na izolat 3.



Slika 12. Utjecaj eteričnog ulja cimeta kore na *Colletotrichum* sp. izolat 2 (Izvor: Borić, 2019.)



Slika 13. Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Colletotrichum* sp. izolat 3 (Izvor: Borić, 2019.)

Tablica 3. Utjecaj eteričnih ulja (25 μ l) na 3 izolata paprike izražen kao zona inhibicije (cm)

| | Izolat 1 | | | Izolat 2 | | | Izolat 3 | | |
|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana | Nakon 3 dana | Nakon 7 dana | Nakon 10 dana |
| Bor | 2,4 | 0,9 | 0 | 1,9 | 0 | 0 | 2,3 | 0,9 | 0 |
| Klinčić | 2,0 | 1,6 | 1,2 | 2,3 | 1,7 | 1,3 | 2,5 | 2,2 | 1,6 |
| Eukaliptus | 2,1 | 0,6 | 0 | 2,1 | 0 | 0 | 1,9 | 1,1 | 0 |
| Naranča slatka | 2,0 | 0,8 | 0 | 2,2 | 0,7 | 0 | 2,2 | 0,9 | 0 |
| Cimet kora | 2,2 | 1,5 | 1,2 | 2,2 | 1,4 | 1,1 | 2,6 | 1,6 | 1,3 |
| Lavanda | 2,2 | 0,9 | 0 | 2,3 | 0,7 | 0 | 2,6 | 1,2 | 0 |
| Čajevac | 2,4 | 0,8 | 0 | 2,4 | 1,3 | 0 | 2,3 | 1,2 | 0 |
| Anis | 2,8 | 1,6 | 0,9 | 2,4 | 1,3 | 0,5 | 2,7 | 2,4 | 1,7 |
| Timijan | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 |
| Citronela | 2,8 | 1,6 | 0,7 | 2,3 | 0,8 | 0 | 2,8 | 1,6 | 0,8 |
| Čempres | 2,4 | 1,3 | 0 | 2,1 | 0,9 | 0 | 2,5 | 1,4 | 0 |
| Ružmarin | 1,9 | 0 | 0 | 2,0 | 0 | 0 | 2,0 | 0 | 0 |
| Kontrola | 1,8 | 0,4 | 0 | 1,9 | 0,3 | 0 | 1,8 | 0,3 | 0 |
| LSD 0,05 | 0,36 | 0,47 | 0,24 | 0,39 | 0,64 | 0,32 | 0,36 | 0,8 | 0,69 |
| LSD 0,01 | 0,48 | 0,63 | 0,32 | 0,53 | 0,86 | 0,44 | 0,49 | 1,1 | 0,94 |

5. RASPRAVA

Primjena kemijskih fungicida još je uvijek najučinkovitiji način zaštite biljaka od uzročnika bolesti. S druge strane, dugotrajna i često prekomjerna uporaba fungicida ekološki je i zdravstveno neprihvatljiva, a dovodi i do pojave rezistentnosti uzročnika bolesti na određene aktivne tvari. Stoga su nastojanja za pronalaskom alternativnih metoda zaštite sve izraženija.

Eterična ulja možemo definirati kao koncentrirane tekućine koje sadrže nestabilne aromatične spojeve koji se dobivaju iz različitih biljnih dijelova (Isman, 2000.). Zbog svojih antimikrobnih svojstava postaju predmet sve većeg broja istraživanja s ciljem proizvodnje ekološki prihvatljivih biofungicida.

Na temelju istraživanja koje smo proveli u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek utvrdili smo da različita eterična ulja imaju različit utjecaj na rast tri različita izolata iz roda *Colletotrichum* što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Lee i sur. (2007.), Pérez-Sánchez i sur. (2007.), Yang i Clausen (2007.) i Palfi i sur. (2019.).

Antifungalno djelovanje u pravilu se povećava s povećanjem primjenjene količine eteričnog ulja, ali to ide do određene količine nakon koje se jačina djelovanja ne povećava (Ćosić i sur., 2010). U našem istraživanju antifungalno djelovanje ulja timijana značajno je jače pri primjeni ulja u količini 15 i 25 μ l (zona inhibicije 3,1 cm) u odnosu na primjenu ulja u količini 5 μ l (zona inhibicije 0,8 cm za izolat 1 i 2 te 1,7 cm za izolat 3). Isti trend uočavamo i za ulje kore cimeta iako su razlike manje.

Brojna istraživanja (Lee i sur., 2007., Ćosić i sur. 2010., Vitoratos i sur. 2013., Posavac i sur. 2014.) ukazuju da učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti ulja odnosno njihovom sastavu. U našem istraživanju najjače antifungalno djelovanje imalo je ulje timijana, a za njim slijede kličić, cimet kora i anis. Eterična ulja ružmarina, čempresa, lavande, slatke naranče, eukaliptusa i čajevca nisu inhibirala rast micelija niti jednog izolata *Colletotrichum* sp. niti kod najveće primjenjene količine. Ćosić i sur. (2010.) navode da je ulje timijana statistički vrlo značajno jače inhibiralo rast micelija 11 fitopatogenih gljiva u odnosu na

kontrolu i 10 drugih eteričnih ulja. Isti autori navode da su eterična ulja slatke naranče, ružmarina i lavande na većinu istraživanih gljiva imala vrlo slabo ili nikakvo inhibitorno djelovanje.

Učinak eteričnih ulja ovisi i o vrsti patogenog organizma na koji se primjenjuje, vremenu berbe biljaka za ekstrakciju ulja, vremenskim uvjetima u godini proizvodnje biljaka te metodi primjene (Ćosić i sur. 2010., Palfi i sur. 2019.). Također, rezultati istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima u pravilu su vrlo različiti pri čemu je antifungalno djelovanje ulja u *in vivo* uvjetima u pravilu značajno slabije (Yilmaz i sur. 2016., Palfi i sur. 2019.).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata antifungalnog učinka 12 eteričnih ulja (bor, klinčić, eukaliptus, lavanda, slatka naranča, kora cimeta, timijan, čajevca, citronela, ružmarin, anis i čempres) na porast 3 izolata *Colletotrichum* sp. možemo zaključiti:

1. Inhibitorni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti gljive na kojoj je primijenjeno, vrsti eteričnog ulja i količini koje je primijenjeno.
2. Najjači antifungalni učinak na sva 3 izolata imalo je eterično ulje timijana.
3. Najslabiji antifungalni učinak na sva 3 izolata imalo je eterično ulje ružmarina.
4. Veća koncentracija eteričnog ulja ne znači nužno i jače antifungalno djelovanje.

7. POPIS LITERATURE

1. Alvarez–Castellanos, P.P., Bishop, C.D., Pascual, M. (2001.): Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *J. Phytochemistry*, 57(1): 99-102.
2. Burt, S. (2004.): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food - a review. *Int. J. Food Microbiol*, 94(3): 223-253.
3. Bailey, J.A., Jeger, M.J. (1992.): *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. CAB International. Wallingford, UK.
4. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008.): Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-476.
5. Chupp, C., Sharf, A.F. (1986.): *Vegetable diseases and their control*. The Roland Press Company, New York, 454-455.
6. 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.
7. Da Cruz Cabral L., Pinto FV., Patriarca A., (2013.): Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int. J. Food Microbiol*. 166(1): 1-14.
8. Dillard, H.R., Cobb, A.C. (1998.): Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. *Plant Dis*. 82: 235-238.
9. Dimitrov, I. (2000.): *Aroma i fitoterapija: Liječenje biljem i eteričnim uljima*. Sirač.
10. Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998.): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for antracnose disease of various fruits. *Plant Diseases* 82: 596-605.
11. Hadden, J.F., Black, L.L. (1989.): Antracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. *Proceeding of the International Symposium on Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics*. Asian Vegetable Research and Development Centre, Taiwan, 189-199.

12. Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W. (2010.): Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component trans-Anethole. *Molecules*, 15: 7558-7569.
13. Isman, M., B. (2000.): Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19:603-608.
14. Jurković, D., Čosić, J., Vrandečić, K., (2010.): Bolesti cvijeća i ukrasnog bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.
15. Kalembe, D., Kunicka, A. (2003.): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10): 813-829.
16. Katooli, N., Maghsoldo, R., Honari, H., Razavi, S. (2012.): Fungistatic activity of Essential oil of Thyme and Eucalyptus against of Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1(1): 1-4
17. Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C. (2007.): Antifungal Activity of Five Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathology J.*, 23(2): 97-102 7-1742.
18. Lešić, R., Borošić, J., Butorac, I., Herak-Čustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2004.): *Povrćarstvo* (2. dopunjeno izdanje). Zrinski d.d., Čakovec.
19. Matotan, Z., Matotan, S. (2009.): Antraknoza plodova paprike ekonomski sve značajnija bolest paprike u Podravini. *Glasnik zaštite bilja*, 6: 150-153.
20. Matotan, Z. (2004.): *Suvremena proizvodnja povrća*. Nakladni zavod Globus, Zagreb.
21. Moreira, MR., Alvarez, MV., Ponce, AG. (2016): *Postharvest Management Approaches for Maintaining Quality of Fresh Produce*. Springer International Publishing.
22. Palfi, M., Vrandečić, K., Popijač, V., Čosić, J. (2019.): Utjecaj eteričnih ulja na fitopatogene gljive. *Poljoprivreda* 25(1):32-40.
23. Parađiković, N., Baličević, R., Vinković, T., Parađiković, D., Karlić, J. (2007.): Biološke mjere zaštite u proizvodnji gerbera i presadnica rajčice. *Agronomski glasnik*, 69(5):355-364.

24. Pérez-Sánchez, R., Infante, F., Gálvez, C., Ubera, J.L. (2007.): Fungitoxic Activity Against Phytopathogenic Fungi and the Chemical Composition of *Thymus zygis*. Essential Oils, Food Science and Technology International, 13(5): 341-347.
25. 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., 71 (3): 8563-8572.
26. Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2009.): Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal Med Microbiol, 58: 1454-1462.
27. Posavac, I., Čosić, J., Vrandečić, K. (2014.): Utjecaj eteričnih ulja na porast *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid: Glasnik Zaštite Bilja, Vol 37, No.5: 70-74
28. Sahin, F., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H., (2004.): Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* spp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control, 15: 549-557.
29. Silva, C., Gutteres, B., Weisheimer, S.S., Schapoval, E.E.S. (2008.): Antifungal Activity of the Lemongrass Oil and Citral Against *Candida* spp. Braz J Infec Dis, 12(1): 63-66.
30. Singh, G., Maurya, S. (2005.): Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils. Natural Product Radiance, 4(3): 179-192.
31. Tajkarimi, M.M., Ibrahima, S.A., Cliver, D.O. (2010): Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9): 1199–1218.
32. Tsrer, L., Johnson, D.A. (2000): *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*". APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
33. 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 Agrobo, 41(1):86-92.
34. Wildwood, C. (2002.): Aromaterapija: Enciklopedija eteričnih ulja, njihovih pripravaka i primjene. Zagreb.

35. 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.
36. Yang, V.W., Clausen, C.A. (2007.): Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 302-306.
37. Yilmaz, A., Ermis, E., Boyraz, N. (2016.): Investigation of in vitro and in vivo antifungal 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.

8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj 12 eteričnih ulja (bora, klinčića, eukaliptusa, lavande, slatke naranče, kore cimeta, timijana, čajevca, citronele, ružmarina, anisa i čempresa) na 3 izolata *Colletotrichum* sp. Ulja su primijenjena u količinama 5 μ l, 15 μ l i 25 μ l.

Statistički najznačajniji negativni utjecaj na porast micelija imalo je eterično ulje timijana dok je najslabiji učinak utvrđen za ulje ružmarina. Veća koncentracija eteričnog ulja ne znači nužno i jače antifungalno djelovanje.

Ključne riječi: eterično ulje, rast micelija, antifungalno djelovanje

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of 12 essential oils (pine, clove, eucalyptus, lavender, sweet orange, cinnamon bark, thyme, tea tree, citronella, rosemary, star anise, cypress) on 3 fungal isolates of *Colletotrichum* sp. Different concentrations of essential oils 5 μ l, 15 μ l and 25 μ l were applied.

The statistically most significant inhibitory effect on the growth of mycelium had thyme essential oils while the weakest effect was found for rosemary. A higher concentration of essential oil does not necessarily mean a stronger antifungal effect.

Key words: essential oil, mycelium growth, antifungal effect

10. POPIS TABLICA

| | |
|---|----|
| Tablica 1. Utjecaj eteričnih ulja (5 μ l) na 3 izolata paprike izražen kao zona inhibicije (cm) | 16 |
| Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja (15 μ l) na 3 izolata paprike izražen kao zona inhibicije (cm) | 19 |
| Tablica 3. Utjecaj eteričnih ulja (25 μ l) na 3 izolata paprike izražen kao zona inhibicije (cm) | 22 |

11. POPIS SLIKA

| | |
|--|----|
| Slika 1. Simptomi antraknoze na listu paprike (Izvor: www.researchgate.net) | 8 |
| Slika 2. Lezije antraknoze na zrelom plodu paprike (Izvor: Katedra za fitopatologiju) | 9 |
| Slika 3. Antraknozom uništeni plodovi paprike (Izvor: Katedra za fitopatologiju) | 9 |
| Slika 4. Krumpir dekstrozni i tehnički agar (Izvor: Borić, 2019.)..... | 11 |
| Slika 5. Priprema pokusa u laminaru (Izvor: Borić, 2019.)..... | 12 |
| Slika 6. Pipetiranje eteričnog ulja na podlogu (Izvor: Borić, 2019.)..... | 13 |
| Slika 7. Precjepljivanje gljiva (Izvor: Borić, 2019.)..... | 14 |
| Slika 8. Precjepljivanje gljiva(Izvor: Borić, 2019.)..... | 14 |
| Slika 9. Utjecaj eteričnih ulja nakon 3 dana od postavljanja pokusa (Izvor: Borić, 2019.) | 15 |
| Slika 10. Utjecaj eteričnog ulja lavande na <i>Colletotrichum</i> sp. izolat 1 (Izvor: Borić, 2019.) | 18 |
| Slika 11. Utjecaj eteričnog ulja bora na <i>Colletotrichum</i> sp. izolat 3 (Izvor: Borić, 2019.). | 18 |
| Slika 12. Utjecaj eteričnog ulja cimeta kore na <i>Colletotrichum</i> sp. izolat 2 (Izvor: Borić, 2019.)..... | 20 |
| Slika 13. Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na <i>Colletotrichum</i> sp. izolat 3 (Izvor: Borić, 2019.)..... | 21 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

**ANTIFUNGALNI UČINAK ETERIČNIH ULJA NA *COLLETOTRICHUM SP.* IZOLIRAN S
PAPRIKE**

Dora Borić

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj 12 eteričnih ulja (bora, klinčića, eukaliptusa, lavande, slatke naranče, kore cimeta, timijana, čajevca, citronele, ružmarina, anisa i čempresa) na 3 izolata *Colletotrichum sp.* Ulja su primijenjena u količinama 5 µl, 15 µl i 25 µl. Statistički najznačajniji negativni utjecaj na porast micelija imalo je eterično ulje timijana dok je najslabiji učinak utvrđen za ulje ružmarina.

Rad je izraden pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Broj stranica: 33

Broj grafikona i slika: 13

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 37

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: eterično ulje, rast micelija, antifungalno djelovanje

Dan 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 u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agricultural Biotechnology Sciences Osijek
University Graduate Studies, Course Plant protection

Graduate thesis

ANTIFUNGAL EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON *COLLETOTRICHUM SP.* ISOLATED FROM PEPPERS

Dora Borić

Summary:

The aim of this study was to determine the effect of 12 essential oils (pine, clove, eucalyptus, lavender, sweet orange, cinnamon bark, thyme, tea tree, citronella, rosemary, star anise, cypress) on 3 fungal isolates of *Colletotrichum* sp. Different concentrations of essential oils 5 µl, 15 µl and 25 µl were applied. The statistically most significant inhibitory effect on the growth of mycelium had thyme essential oils while the weakest effect was found for rosemary.

Thesis performed at: Faculty of Agricultural Biotechnology Sciences Osijek

Mentor: PhD Full Professor Jasenka Ćosić

Number of pages: 33

Number of figures: 13

Number of tables: 3

Number of references: 37

Original in: Croatian

Key words: essential oil, mycelium growth, antifungal effect

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. PhD Professor Karolina Vrandečić, president
2. PhD Professor Jasenka Ćosić, mentor
3. PhD Associate Professor Jelena Ilić, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agricultural Biotechnology Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.