

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na gljivu *Botrytis cinerea*

Grgić, Slavko

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:453599>

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

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Slavko Grgić, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA GLJIVU *BOTRYTIS*
*CINEREA***

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Slavko Grgić, apsolvent

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA GLJIVU *BOTRYTIS*
*CINEREA***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. Prof. dr. sc. Vlatka Rozman, član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature	4
3. Materijal i metode	9
3.1. Statistička obrada podataka	12
4. Rezultati	13
4.1. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive <i>Botrytis cinerea</i> u prvom mjerenju	13
4.2. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive <i>Botrytis cinerea</i> u drugom mjerenju	15
4.3. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive <i>Botrytis cinerea</i> u trećem mjerenju.....	17
4.4. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive <i>Botrytis cinerea</i> u četvrtom mjerenju.....	19
5. Rasprava.....	21
6. Zaključak.....	23
7. Popis literature	24
8. Sažetak	29
9. Summary	30
10. Popis tablica	31
11. Popis slika	32
TEMELJA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	33
BASIC DOCUMENTATION CARD	34

1. Uvod

Rod *Botrytis* predstavlja raznoliki rod s velikim brojem vrsta koje se razlikuju u svojim biološkim, ekološkim, morfološkim karakteristikama, ali također i po svom području rasprostranjenja. O raznolikosti vrsta govori i podatak da je u zadnjem desetljeću otkriveno 7 novih vrsta, a za 30 vrsta iz ovoga roda su utvrđene detaljne karakteristike. *Botrytis* spp. dugo se vremena smatrao isključivo nekrotičnim patogenom, no utvrđeno je kako neke vrste roda *Botrytis* mogu biti prisutne unutar biljnih tkiva bez da aktiviraju simptome pa se stoga trebaju smatrati endofitima. Ipak, u određenim uvjetima, simptomi se mogu javiti tijekom kasnijih stadija razvoja biljke ili se mogu ispoljiti u obliku propadanja sjemena. Kod brojnih dvosupnica utvrđena je prikrivena zaraza gljivom *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr., a način kojim dođe do razvijanja takvog životnog ciklusa, kao endofita, još uvijek nije dovoljno istražen.

Botrytis vrste uzrokuju velike gubitke, i dok su mnoge ograničene vrstom domaćina koje parazitiraju, *B. cinerea* je izuzetak i ima velik areal rasprostranjenosti. Prema novim podacima, poznato je da *B. cinerea* inficira 586 biljnih rodova (oko 1400 biljnih vrsta), a većina rodova pripada sjemenjačama. Biljke domaćini rasprostiru se u različitim klimatskim područjima, od tropa do hladnih područja, od humidnih do suhih područja. Do zaraze biljaka može doći na otvorenim poljima, u staklenicama/ plastenicima, zatvorenim sustavima proizvodnje, ali također i za vrijeme skladištenja u hladnjačama.

Početak 20. stoljeća predložena je i prihvaćena taksonomija kojom se daje posebno ime za spolni i nespolni stadij gljive. Pa je tako *B. cinerea* ime nespalnog stadija, a *Botryotinia fuckeliana* ime spolnog stadija. Novijim istraživanjima u kojima je provedeno ispitivanje DNA struktura utvrđena je sigurna povezanost nespolnih i spolnih stadija, pa je u sklopu akcije „jedna gljiva - jedno ime“ pokrenuta inicijativa kojom bi oba stadija gljive nosila ime *B. cinerea*. Na simpoziju Botrytisa 2013. godine u Bariju (Italija) prijedlog je prihvaćen pa je opći naziv postao *B. cinerea*.

B. cinerea uzročnik je sive plijesni. Ima dva životna ciklusa, spolni i nespolni, pri čemu je nespolni onaj koji pričinjava štete u biljnoj proizvodnji.

Tijekom nespalnog stadija dolazi do produkcije velikog broja konidija na konidioforima. U osnovi, konidije su kratkog životnog vijeka, ovisno o temperaturi, relativnoj vlažnosti

zraka, mikrobiološkoj aktivnosti te izloženosti sunčevoj svjetlosti. Tijekom zime dolazi do stvaranja sklerocija otpornih na nepovoljne okolišne uvjete.

Sklerocije *B. cinerea* su veličine do približno 4 mm i jedne su od većih unutar roda *Bortyitis*. Sklerocije kliju za vrijeme vlažnih uvijeta u proljeće te proizvode micelij i konidije i izvor su ranih zaraza u početku pokretanja vegetacije.

Spolni stadij, teleomorf, obično se ne pronalazi u prirodi, a uzrok tomu može biti teškoća prepoznavanja spolnih struktura. Utvrđeno je kako se mikrokonidije, koje mogu biti produkt razvoja makrokonidija ili endogena formacija unutar starih hifa, ponašaju poput spermata. Oplodnjom receptivnih struktura sklerocija dolazi do stvaranja apotecija, spolnih struktura, u kojima se stvaraju askusi s askosporama.

Novijim istraživanjima utvrđeno je kako je patogeni razvoj *B. cinerea* znatno složeniji nego što se smatralo. Razvoj bolesti regulira se tijekom infekcije, a gljiva stvara razvojne prilagodbe koje odgovaraju razvojnom stadiju infekcije. Infekcije ovom gljivom su dinamične, tj. odvijaju se značajne modulacije prema povratnoj reakciji biljke domaćina na infekciju. Primjer takve modulacije je uloga malih nekodirajućih molekula RNA (small interfering RNA-s \approx siRNAs) koje djeluju kao receptivne molekule. Poznato je da parazitski organizmi „dostavljaju“ efektore proteina u biljke domaćine, ali prijelaz siRNA gljive *B. cinerea* u biljku domaćina primjer je aktivnog prijenosa siRNA između dva organizma iz različitih carstava. Prijenos siRNA dovodi do „uspavljivanja“ aktivnosti gena biljnih stanica i tkiva, a upravo na taj način siRNA *B.cinerea* ometa gene obrambenog mehanizma biljke, čime pojačava svoju patogenost.

Uočeno je da infekcija gljivom *B. cinerea* može ubrzati zrenje nezrelih rajčica, upravo zbog interakcije između biljke domaćina i patogena koji svoj razvoj može prilagoditi potrebama infekcije. Također, zrelost rajčice utječe na uspješnost infekcije, jer su zelene rajčice otpornije na infekciju. Upravo ovakve vrste koje svojim prilagodbama mogu ubrzati zrenje, a samim time i infekciju, stvaraju opasnost od stvaranja novih supstrata gljiva koji će vrlo lako inficirati domaćina, ili će postati rezistentniji na zaštitne mjere. Pokazalo se kako *B. cinerea* prilagođava svoje enzime, ovisno o specifičnosti, staničnoj stijenci biljke domaćina, što jasno ukazuje na mogućnost prilagodbe infekcije prema domaćinu kojeg patogenizira (Fillinger i Elad, 2015.).

Gubitci na globalnoj razini u biljnoj proizvodnji, izazvani uzročnicima biljnih bolesti tijekom vegetacije kultiviranih biljaka mogu iznositi i do 12% uzmu li se u obzir samo razvijene zemlje (Lee i sur., 2001.). Kako bi se obranile od uzročnika bolesti biljke su razvile mnogobrojne obrambene mehanizme, međutim, prirodni mehanizmi nisu dostatni te su biljke gotovo stalno izložene napadu uzročnika bolesti (Paster i Bullerman, 1988.; Arcury i sur., 2002.). Sintetički fungicidi koji se najviše koriste u suzbijanju fitopatogenih gljiva doprinose kvaliteti i povećanom prinosu usjeva, ali zbog rezistentnosti uzročnika bolesti i rezidua u hrani ili tlu, koji su štetni po čovjeka i okoliš, njihova primjena nastoji se smanjiti (Harris, 2002.).

Alternativa su im različiti biljni spojevi i ekstrakti (Kishore i sur., 2007.) poput eteričnih ulja i njihovih komponenti, a poznato je da više od 1300 biljaka sintetizira spojeve s antimikrobnim djelovanjem (Wilkins i Board, 1989.). Eterična ulja često sadrže velik broj komponenti. Najčešće do tri glavne komponente čine 90% samoga ulja, dok su ostale, u velikom broju slučajeva, zastupljene s manje od 1% (Dorman i Deans, 2000.). Nastojanja su da eterična ulja i biljni ekstrakti postanu alternativa pri suzbijanju biljnih patogena jer su izvor biološki aktivnih spojeva što može dovesti do razvoja novih, sigurnijih načina zaštite biljaka od uzročnika bolesti (Al-Reza i sur. 2010.; Veloz- Garcia i sur., 2010.).

Cilj ovoga istraživanja bio je u *in vitro* uvjetima utvrditi utjecaj 22 eterična ulja, primijenjenih u koncentracijama 3, 5 i 7 μ l, na porast micelija *B. cinerea*, odnosno utvrditi utjecaj na porast micelija tijekom 3, 6, 9 i 12 dana od inokulacije.

2. Pregled literature

Uzročnik sive plijesni *Botrytis cinerea* poznat je kao gljiva koja brzo razvija rezistentnost na primjenjivane fungicide pa je tako taj problem najizraženiji u zaštiti vinograda. Kao i u svijetu, tako i u Hrvatskoj, siva plijesan je jedna od ekonomski najznačajnijih bolesti i čini štete u visini 50-60 % u kontinentalnom dijelu zemlje (Topolovec- Pintarić, 2000.).

Prema navodima Maceljškog i sur. (2006.) izravne štete od napada uzročnika sive plijesni u Hrvatskoj se kreću od 3 do 15%, dok višegodišnji prosjek šteta iznosi 4,1%.

Visoka relativna vlažnost zraka (90%), vlažnost biljnih dijelova i povoljne temperature za razvoj (1-30 °C, optimum 15-20°C) smatraju se najvažnijim okolišnim uvjetima koji utječu na infekciju gljivom *B. cinerea* (Jurković i sur., 2010.).

Eterična ulja su aromatske tekućine koje se dobivaju iz biljnih dijelova različitim metodama (Burt, 2004.).

Proces dobijanja eteričnih ulja provodi se hidroddestilacijom 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 prepoznavanje 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 indentifikacija koriste se velike količine čistog uzorka ispitivanog ulja, a ispitivanje se vrši ¹³C-NMR spektroskopijom (Tomi i sur., 1995.).

Eterična ulja predstavljaju alternativni oblik zaštite s izraženim antifungalnim (Soliman i Badeaa, 2002.), antibakterijskim, insekticidnim i nematocidnim svojstvima (Pandey i sur., 2000.).

Utjecaj eteričnih ulja i njihovih komponenti na porast micelija, produkciju i klijavost spora i dužinu kličnih cijevi u *in vitro* uvjetima istraživali su brojni znanstvenici.

Veći broj eteričnih ulja biljnog porijekla pokazao je dobro djelovanje protiv širokog spektra fitopatogenih gljiva u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Baruah i sur., 1996.; Caccioni i sur., 1998.; Reddy i sur. 1998.; Sharma i Verma, 2004.).

Također je utvrđeno pozitivno djelovanje ulja na smanjenje produkcije mikotoksina (Tahmasebi i sur., 2012.).

Treba napomenuti da djelovanje eteričnih ulja ovisi o kemijskom sastavu samog ulja, primijenjenoj koncentraciji ulja, ali i o podneblju iz kojeg bilje dolazi, kao i o okolišnim i agroekološkim uvjetima rasta same biljke (Dorman i Deans, 2000.).

Biološki učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti gljive, kemijskom sastavu ulja koji je u vezi s biljnom vrstom iz koje je ulje dobiveno i njezinim zemljopisnim porijeklom, o primijenjenoj količini ulja te o načinu aplikacije (Ćosić i sur., 2014.).

Neka ulja imaju slabije ili jače antifungalno djelovanje u *in vitro* uvjetima na veći broj uzročnika biljnih bolesti, dok pojedina ulja imaju stimulativni utjecaj na rast micelija nekih fitopatogenih gljiva (Al-Reza i sur., 2010.; Ćosić i sur., 2010.; Lee i sur., 2007.; Singh i sur., 1992., Sukata i sur., 2008.).

Ćosić i sur. (2010.) proveli su ispitivanje antifungalnog djelovanja 11 vrsta eteričnih ulja na 14 uzročnika biljnih bolesti. Utvrdili su da ulje timijana ima vrlo jak antifungalni učinak na 13 ispitanih uzročnika bolesti te je u potpunosti inhibiralo rast micelija *Diaporthe helianthi*, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* i *Phomopsis viticola*. U sastavu timijana najveći udio imaju timol (45 – 48%) i p-cimen (18,5 – 21,5 %). Od ostalih ispitivanih ulja dobar antifungalni učinak imala su ulja lista cimeta, klinčićevca te anisa. Eterično ulje lista cimeta pokazalo je odlične rezultate kod pet uzročnika bolesti. Potpuna inhibicija utvrđena je za *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. helianthi* i *P. viticola* dok je isto ulje gotovo u potpunosti (98,23%) inhibiralo rast micelija *Phomopsis longicolla*. Utvrđena inhibicija za *Colletotrichum coccodes* iznosila je 90%. Najveći udio u sastavu ulja lista cimeta otpada na eugenol (Wang i sur., 2010.). Za razliku od navedenih ulja, eterična ulja kadulje, bora i gorke naranče stimulirala su porast micelija nekoliko ispitivanih gljiva.

Eterično ulje i ekstrakti iz biljke noćni jasmin nepovoljno utječu na rast *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Navedeno ulje inhibira porast micelija ispitivanih gljiva do 80% (Al- Reza i sur., 2010.).

In vitro istraživanje koje su proveli Lee i sur., (2007.) s pet uzročnika biljnih bolesti (*B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Pythium ultimum*, *R. solani*) pokazalo je da od 39 ispitanih ulja, eterično ulje origana ima najjače antifungalno djelovanje pri čemu je

inhibiralo porast micelija za 55 do 93%. Ulja eukaliptusa i kumina su također imala dobar učinak pri čemu se inhibicija porasta micelija kretala između 50 i 91%, odnosno između 41% do 83%.

Singh i sur. (1992.) utvrdili su antifungalni utjecaj eteričnog ulja slatke naranče na velik broj uzročnika biljnih bolesti. Utvrđeno je jako fungistatično djelovanje na *H. oryzae*, *F. oxysporum*, *F. vudum*, *F. verticillioides*, *C. falcatum*, dok je potpuna inhibicija rasta micelija utvrđena za *A. niger*, *A. flavus*, *R. solani*, *P. debaryanum*, *C. gloeosporioides*.

Suprotno navedenom, Lee i sur., (2007.) utvrdili su da ulje slatke naranče nije imalo inhibitorni učinak na razvoj gljiva *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *R. solani*, *B. cinerea* i *P. ultimum*, što potvrđuje tezu o utjecaju velikog broja čimbenika na učinak eteričnih ulja.

Novak (2012.) je utvrdila da ulje klinčićevca značajno smanjuje klijavost konidija i dužinu kličnih cijevi gljive *Passalora fulva* dok je ulje lista cimeta imalo najslabiji antifungalni učinak na klijavost konidija iste gljive.

U *in vivo* uvjetima najjače antifungalno djelovanje imala su ulja magnolije (*Magnolia liliflora*), drva eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora*), noćnog jasnima (*Cestrum nocturnum*), komorača (*Foeniculum vulgare*), origana (*Origanum syriacum* var. *bevanii*), limunske trave (*Cymbopogon citratus*) te bosiljka (*Ocimum basilicum* i *Ocimum gratissimum*) (Al-Reza i sur., 2010.; Bajpai i Kang, 2012.; Fandohan i sur., 2004.; Lee i sur., 2007.; Soyly i sur., 2007.).

Bajpai i Kang (2012.) utvrdili su u *in vivo* uvjetima 100% inhibiciju razvoja *P. capsici* na paprici uzgojenoj u stakleniku pri primjeni ulja magnolije (*Magnolia liliflora*).

Al-Reza i sur. (2010.) su dobili slične rezultate pri aplikaciji eteričnog ulja noćnog jasmina (*Cestrum nocturnum*).

Lee i sur. (2007.) su utvrdili da ulje eukaliptusa (*Eucalyptus citriodora*) ima jako fungistatično djelovanje na porast micelija gljive *B. cinerea* te da inhibicija raste povećanjem primijenjene količine ulja.

In vivo testom provedenim na kukuruzu koji je umjetno zaražen gljivom *Fusarium verticillioides* utvrđena su značajna inhibitorna svojstva ulja limunske trave (*Cymbopogon citratus*) i bosiljka (*Ocimum basilicum* i *Ocimum gratissimum*) (Fandohan i sur., 2004.).

Soylu i sur. (2007.) navode da ulja origana i komorača smanjuju rast *Sclerotinia sclerotiorum* na rajčici do 68,9%.

U istraživanju koje su proveli Katooli i sur. (2012.) ispitano je djelovanje eteričnih ulja timijana (*Thymus vulgaris L.*) i eukaliptusa (*Eucalyptus camaldulensis L.*) na porast micelija fitopatogenih gljiva *Penicillium digitatum*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides* i zemljišnih patogenih gljiva *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*. Primjenjena je količina od 10 µl svakoga ulja i to u koncentracijama od 25, 50, 75 i 100%. Kako bi se ostvarila određena koncentracija, ulja su razrijeđena acetonom. Pokus je postavljen na PDA podlozi pri temperaturi 25 °C, a učinak je mjeran tijekom 30 dana. Rezultati su pokazali dobru aktivnost oba ulja, pri čemu je utvrđeno kako je eterično ulje timijana potpuno inhibiralo porast gljive kada je primjenjeno u koncentracijama od 50, 75 i 100%.

Utjecaj eteričnih ulja klinčićevca i cimeta, kao i njihovog sinergističkog djelovanja ispitan je na 6 gljiva uzročnika propadanja grožđa: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis viticola* i *Rhizopus stolonifer*. Istraživanjem sinergističkog učinka utvrđeni su optimalni omjeri ulja klinčićevca i cimeta i iznosili su 3:7, 2:8 i 1:9. Minimalne inhibitorne koncentracije primjenjenih ulja na 6 ispitivanih gljiva iznosile su 400 mg/ml. (Sukatta i sur., 2008.)

Celikel i Kavas (2008.) proveli su ispitivanje 5 eteričnih ulja: timijan, mirta, lovor, kadulja, naranča. Utjecaj navedenih ulja ispitan je na bakterijama *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, a korištene su količine od 5 od 20 µl. Ulje timijana je pokazalo najbolji učinak, dok je kod ulja naranče učinak bio najslabiji.

Ispitivanje plinovitog oblika eteričnih ulja Tanović i sur. (2005.) proveli su koristeći 18 vrsta biljnih eteričnih ulja na porast izolata gljive *B. cinerea*. Korištene su koncentracije od 0,65, 0,32, 0,16, 0,08, 0,04 i 0,02 µl/ml zraka u Petrijevoj zdjelici pipetiranjem ulja na unutrašnju stranu poklopca. Najslabiji učinak pokazale su pare eteričnih ulja naranče i bijelog bora dok je najtoksičnija bila ulja timijana i cimeta.

Daferera i sur. (2003.) su ispitali utjecaj osam eteričnih ulja (origano, timijan, jasenak, mažuran, lavanda, ružmarin, kadulja i buhač) na porast gljiva *B. cinerea*, *Fusarium sp.* (*Fusarium solani* var. *coeruleum*) i bakteriju *Clavibacter michiganensis* subsp.

michiganensis. Porast gljiva i bakterije potpuno su inhibirala ulja origana, timijana, jasenka i mažurana.

Antifungalno djelovanje sedam eteričnih ulja i njihov utjecaj na inhibiciju rasta *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* i *Trichoderma viride* bili su predmet istraživanja Yang i Calusen (2007.). Tijekom 20 tjedana ulja timijana (*Thymus zygis*) i egipatskog geranija (*Pelargonium graveolens*) inhibirala su rast svih gljiva korištenih u pokusu i to prilikom uporabe metode namakanja komada drveta u eterično ulje. Međutim, svoje djelovanje nisu pokazala prilikom uporabe metode u kojoj su gljive izložene plinovitom obliku eteričnih ulja. Autori su pretpostavili kako postoji mogućnost da monoterpeni koji su u sastavu eteričnih ulja, inhibiraju klijanje spora ili njen vegetativni rast prilikom kontakta. Ulje timijana razrijeđeno u omjeru 1:8 djeluje inhibitorno na rast gljiva. Primjerice, ulje kopra (*Anethum graveolens*) prilikom metode u kojoj je gljiva pod utjecajem plinovitog oblika eteričnog ulja, imalo je inhibitorni učinak na rast svih ispitivanih gljiva, dok je prilikom uporabe druge metode ono djelovalo inhibitorno na *A. niger* i *P. chrysogenum*. Izvođenjem obje metode, ulja ružmarina (*R. officinalis*), limunske trave (*Cymbopogon flexuosus*), čajevca (*Melaleuca alternifolia*) i biljke *Carum opticum* pokazala su, suprotno prethodno navedenim uljima, značajno slabije ili nikakvo inhibitorno djelovanje. Ulje ružmarina imalo je inhibitorni učinak oko 10 tjedana na rast gljiva prilikom uporabe metode plinovitog oblika eteričnog ulja, dok je ulje limunske trave u istoj metodi inhibiralo rast *P. chrysogenum* tijekom 12 tjedana. Autori također pretpostavljaju da iako sva ispitivana ulja sadrže ketone koji su u različitim količinama, inhibitorno djelovanje pojedinog ulja je rezultat djelovanja točno određenog ketona ili kombinacije više komponenata koje su sastavni dio ulja.

3. Materijal i metode

Pokusi su provedeni tijekom 2015. godine u Laboratoriju za fitopatologiju na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. U pokusu su korištena 22 eterična ulja (Slika 1.) i izolat gljive *Botrytis cinerea*.

Ispitivan je utjecaj eteričnih ulja anisa (*Pimpinella anisum* L.), timijana (*Thymus vulgaris* L.), kima (*Carum carvi* L.), paprene metvice (*Mentha x piperita* L.), lavande (*Lavandula officinalis* Chaix.), kadulje (*Salvia officinalis* L.), matičnjaka (*Melissa officinalis* L.), ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), mirte (*Myrtus communis* L.), lista cimeta (*Cinnamomum verum* Presl.), bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), bijelog bora (*Pinus sylvestris* L.), eukaliptusa (*Eucalyptus globulus* L.), cedra (*Cedrus atlantica* Manetti), bergamota (*Citrus bergamia* Rissoet. Poit.), mandarine (*Citrus reticulata* Blanco), čempresa (*Cupressus sempervirens* L.), pačulija (*Pogostemon patchouli* Benth.), đumbira (*Zingiber officinale* Roscoe), gorke naranče (*Citrus aurantium* L.), sandala (*Santalum album* L.) i kamfora (*Cinnamomum camphora* L.) na rast micelija gljive *B. cinerea*.



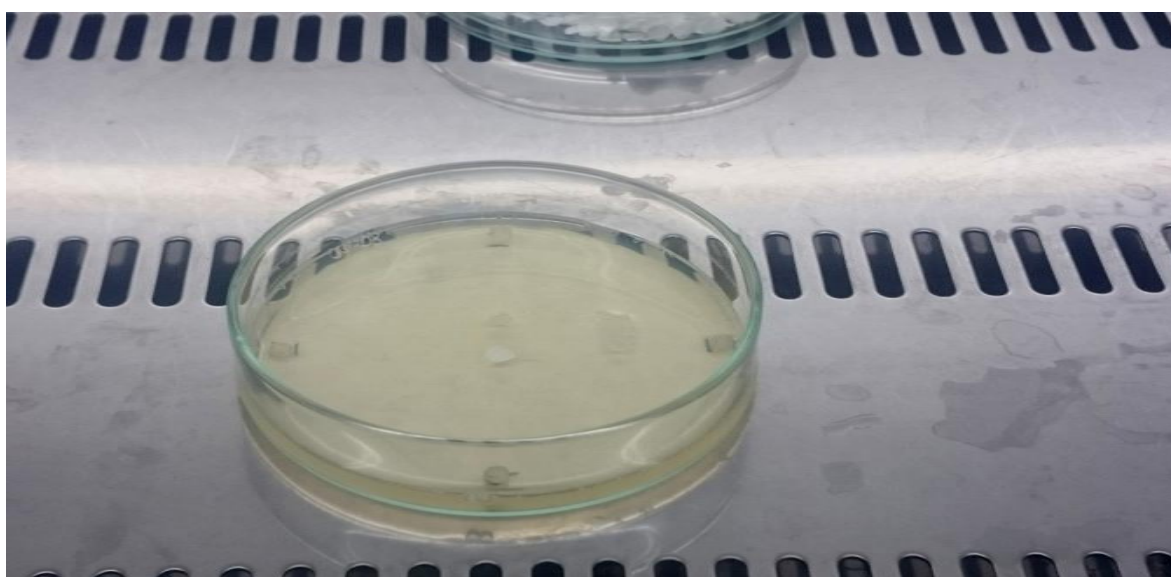
Slika 1. Eterična ulja korištena u pokusu (foto: S. Grgić, 2015.)

Eterična ulja primijenjena su u količinama 3, 5 i 7 μ l po Petrijevoj zdjelici s 10 ml KDA podloge (krumpir-dekstrozni agar), a u kontrolnoj varijanti je korištena destilirana voda.

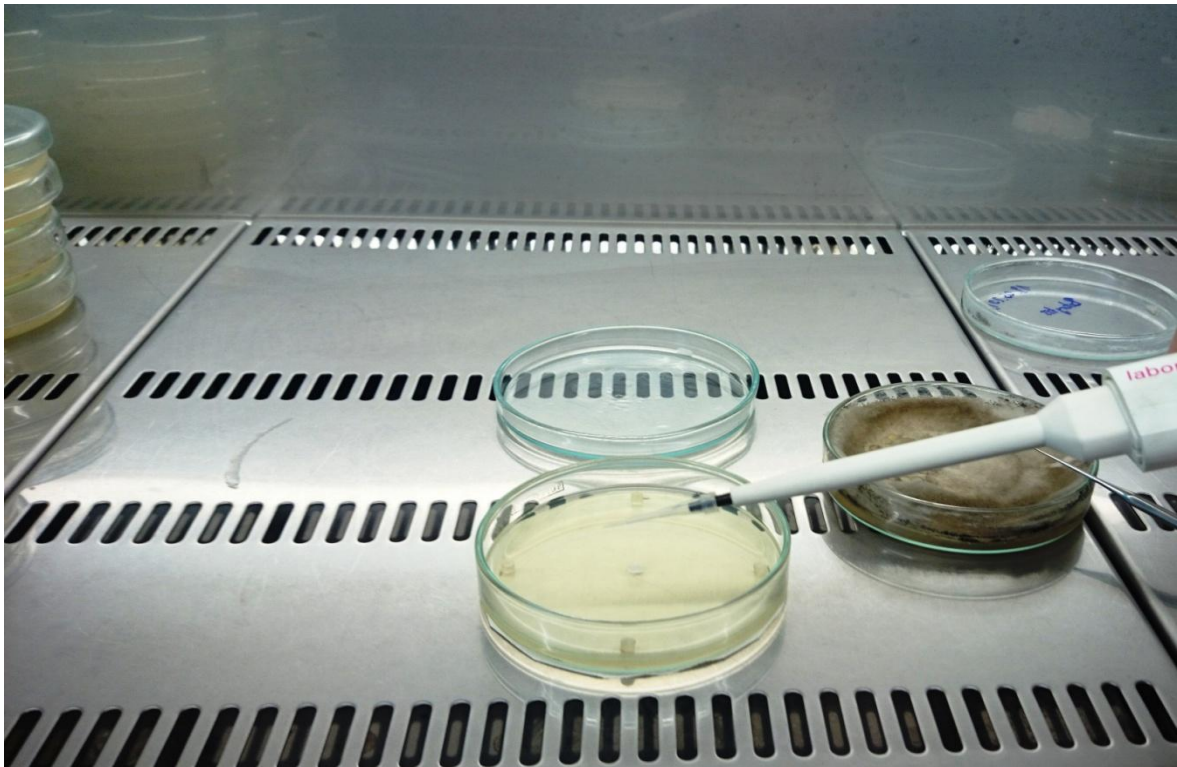
Petrijeve zdjelice su prethodno sterilizirane u uređaju za sterilizaciju vrućom vodenom parom (autoklav). Sam postupak sterilizacije obavlja se pri temperaturi od 121 °C, uz tlak od 1,5 bara u vremenskom periodu od 20 minuta.

KDA je gotova smjesa za podlogu, a kako bi dobili krutu podlogu, dodaje se tehnički agar. Smjesi se potom dodaje pola litre destilirane vode te se, u tikvici, smjesa kuha u vodenoj kupelji. Nakon što je podloga rastopljena, tikvica se zamota u papir i stavlja u autoklav na 20 min pri temperaturi od 121°C i tlaku 1,5 bar. Nakon što se autoklav isključi i tlak padne, tikvica se vadi iz autoklava i ostavlja na hlađenje do 60°C. Dodaje se antibiotik streptomycin kako bi se spriječio razvoj bakterija, tikvica se ponovno zatvara i protrese, a takav sadržaj se zatim izlijeva u sterilizirane Petrijeve zdjelice.

Sterilni filter papir promjera 5 mm postavljen je u sredinu Petrijeve posude (promjera 90 mm) na KDA podlogu, a 5 mm od ruba zdjelice unakrsno su postavljena 4 kružna isječka (Ø 5 mm) čiste kulture gljive *B. cinerea* (Slika 2.). Na filter papir nanešena su eterična ulja. Nanošenje eteričnih ulja obavljeno je mikropipetom u komori za rad u sterilnim uvjetima (Slika 3.).



Slika 2. Raspored kružnih isječaka gljive i filter papira u Petrijevoj zdjelici (foto: S. Grgić, 2015.)



Slika 3. Nanošenje eteričnog ulja na filter papir u središtu zdjelice (foto: S. Grgić, 2015.)

Nakon nacjepljivanja gljive Petrijeve zdjelice inkubirane su u termostatu komori (Slika 4.) na temperaturi od 22°C tijekom 12 dana pri svjetlosnom režimu 24 sata tama. Pokus je postavljen u 2 ponavljanja. Zone inhibicije mjerene su 3., 6., 9., i 12. dan od nacjepljivanja.



Slika 4. Inkubirane Petrijeve zdjelice u termostatu komori (foto: S. Grgić, 2015.)

3.1. Statistička obrada podataka

Učinak pojedinog ulja i primijenjenih koncentracija pojedinog ulja ispitan je faktorijalnom analizom varijance, a razlike između ispitivanih razina primijenjenih tretmana ispitane su LSD testom. Statistička obrada podataka napravljena je pomoću program Enterprise Guide 5.1. of the SAS System for Windows (Copyright© 2012 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USD).

4. Rezultati

4.1. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* u prvom mjerenju

Prvo mjerenje zona inhibicije eteričnih ulja provedeno je tri dana od inokulacije.

Učinak ulja, količine te interakcije ulja i količina na porast micelija u prvom mjerenju je značajan, ali kvadratni eta koeficijent ukazuje na to da vrsta ulja ima najveći učinak na rast micelija gljive, dok je utvrđeno kako je učinak količine i interakcije ulja i količina vrlo nizak (tablica 1).

Tablica 1. Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcije na porast micelija *B.cinerea*, 3 dana nakon inokulacije

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	Značajnost	Kvadratni eta koeficijent
Ulje	22	1281,40	P<0,01	0,93
Količina ulja	2	183,40	P<0,01	0,01
Ulje x količina	44	18,80	P<0,01	0,03
Pogreška	207	4,0		0,03

LSD testom utvrđeno je da su sva ispitivana ulja imala određeni utjecaj na porast micelija tri dana nakon inokulacije, a ovisno o vrsti ulja taj utjecaj je bio fungistatičan ili, suprotno tome, stimulativno je djelovao na početni porast micelija ispitivane gljive. Uočeno je da su sva eterična ulja, izuzev ulja gorke naranče, kamfora i sandala imala fungistatičan učinak, izražen u većoj ili manjoj mjeri (tablica 2).

Najbolji učinak utvrđen je kod ulja anisa, timijana, kima, mente i matičnjaka kod kojih je zabilježena najveća zona inhibicije.

U odnosu na kontrolu, eterična ulja gorke naranče, kamfora i sandala dodatno su stimulirala porast gljive *B. cinerea*.

Tablica 2. Zona inhibicije (mm) u prvom mjerenju, 3 dana nakon inokulacije

Količina Ulje	3μl	5μl	7μl
<i>Carum carvi</i>	30,87 ± 0,31 a ^{AB}	32,63 ± 0,13 a ^A	32,75 ± 0,14 a ^A
<i>Cedrus atlantica</i>	10,63 ± 4,01 e ^F	13,38 ± 1,07 d ^{DE}	15,25 ± 1,45 fg ^{EF}
<i>Cinnamomum camphora</i>	0,38 ± 0,24 g ^I	4,75 ± 0,95 f ^F	3,88 ± 1,07 jk ^{HI}
<i>Cinnamomum verum</i>	17,00 ± 0,29 d ^D	18,88 ± 0,24 c ^C	18,75 ± 1,01 de ^D
<i>Citrus aurantium</i>	4,13 ± 0,43 f ^{HI}	2,88 ± 0,13 f ^F	2,63 ± 0,24 k ^I
<i>Citrus bergamia</i>	10,25 ± 1,03 e ^F	18,00 ± 1,06 c ^C	18,13 ± 1,60 de ^{DE}
<i>Citrus reticulata</i>	9,63 ± 0,47 e ^F	10,00 ± 0,61 e ^E	7,25 ± 1,20 i ^G
<i>Cupressus sempervirens</i>	9,63 ± 0,66 e ^F	13,00 ± 2,33 d ^{DE}	16,88 ± 0,63 efg ^{DE}
<i>Eucalyptus globulus</i>	11,13 ± 1,07 e ^{EF}	9,88 ± 1,57 e ^E	15,00 ± 1,24 g ^{EF}
<i>Kontrola</i>	4,38 ± 0,24 f ^{HI}	4,63 ± 0,63 f ^F	4,63 ± 0,55 jk ^{GHI}
<i>Lavandula officinalis</i>	27,63 ± 0,72 b ^{BC}	30,63 ± 0,97 a ^{AB}	28,63 ± 0,55 c ^{BC}
<i>Melissa officinalis</i>	24,00 ± 0,89 c ^C	31,88 ± 0,13 a ^A	31,88 ± 0,47 ab ^{AB}
<i>Mentha x piperita.</i>	30,50 ± 1,37 ab ^{AB}	32,63 ± 0,13 a ^A	28,25 ± 1,36 c ^C
<i>Myrtus communis</i>	17,75 ± 1,05 d ^D	18,13 ± 2,56 c ^C	17,25 ± 1,20 efg ^{DE}
<i>Ocimum basilicum</i>	16,63 ± 1,01 d ^D	27,00 ± 0,87 b ^B	30,13 ± 0,66 bc ^{ABC}
<i>Pimpinella anisum</i>	32,50 ± 0,00 a ^A	32,13 ± 0,55 a ^A	32,88 ± 0,24 a ^A
<i>Pinus sylvestris</i>	15,13 ± 0,63 d ^{DE}	16,50 ± 1,02 c ^{CD}	20,13 ± 0,83 d ^D
<i>Pogostemon patchouli</i>	9,38 ± 0,68 e ^{FG}	11,38 ± 0,83 d ^{DE}	12,13 ± 0,47 h ^F
<i>Rosmarinus officinalis</i>	17,88 ± 0,66 d ^D	17,88 ± 1,52 c ^C	17,63 ± 0,60 ef ^{DE}
<i>Salvia officinalis</i>	24,38 ± 0,31 c ^C	27,13 ± 0,38 b ^B	28,88 ± 0,90 c ^{BC}
<i>Santalum album</i>	2,63 ± 0,97 fg ^{HI}	3,13 ± 0,43 f ^F	2,50 ± 0,29 k ^I
<i>Thymus vulgaris</i>	31,25 ± 0,43 a ^{AB}	32,63 ± 0,13 a ^A	31,88 ± 0,24 ab ^{AB}
<i>Zingiber officinale</i>	5,50 ± 0,41 f ^{GH}	5,25 ± 0,60 f ^F	6,13 ± 0,55 ij ^{GH}

Za prosječne vrijednosti (usporedba po stupcima) označene istim malim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti $P < 0,05$, a za prosječne vrijednosti označene velikim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti od $P < 0,01$.

4.2. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* u drugom mjerenju

Drugim mjerenjem, nakon šest dana, utvrđeno je inhibitorno djelovanje 10 eteričnih ulja na porast micelija ispitivane gljive. Kao i u prvom mjerenju, nakon provedene faktorijalne analize varijance utvrđen je značajan učinak ulja, količina i njihove interakcije na porast micelija gljive. Također, vrsta ulja imala je najveći učinak na porast micelija, u odnosu na komponente količine ulja i interakcije ulja i količine (tablica 3).

Tablica 3. Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcije na porast micelija *B.cinerea*, 6 dana nakon inokulacije

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	Značajnost	Kvadratni eta koeficijent
Ulje	9	1749,40	P<0,01	0,77
Količina ulja	2	611,90	P<0,01	0,06
Ulje x količina	18	148,73	P<0,01	0,13
Pogreška	90	8,0		0,04

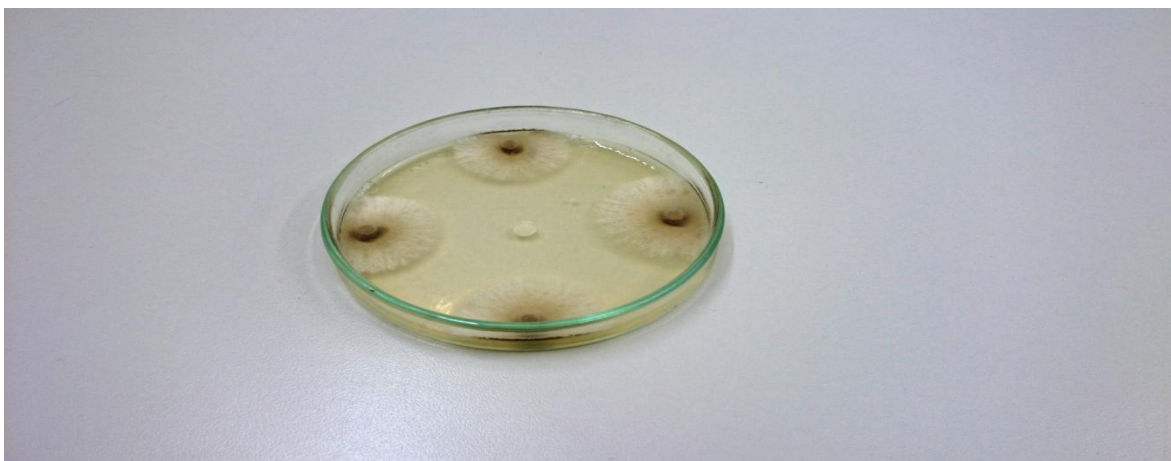
Šest dana nakon postavljanja pokusa broj ulja s antifungalnim učinkom se smanjio. Negativan učinak na porast micelija gljive *B.cinerea* utvrđen je kod eteričnih ulja timijana, paprene metvice, anisa, lavande, ružmarina, kima, cimeta, pačulija, melise i đumbira. Kod svih ostalih ulja, na svim koncentracijama, utvrđeno je potpuno prorastanje Petrijeve zdjelice micelijem gljive. Također, u kontrolnoj varijanti, u kojem je korištena destilirana voda utvrđeno je potpuno prorastanje u drugom mjerenju.

U drugom mjerenju najboljim se pokazalo eterično ulje timijana, i to u svim korištenim koncentracijama. Tako je primjerice, pri 3 μ l ulje timijana imalo 19% bolji učinak od ulja lavande, 59% od ulja ružmarina te čak 96% bolji učinak od ulja đumbira. Pri koncentraciji od 5 μ l ulja timijana i paprene metvice su imala gotovo indentičan učinak (1% bolji učinak timijana), a učinak ulja lavande također se statistički nije razlikovao od dva prethodno navedena ulja. Razlika između učinka ulja timijana i lavande iznosi 8%. Pri korištenju 3 μ l najveća razlika je između učinka timijana i ulja pačulija i iznosi 96 % (tablica 4).

Tablica 4. Zona inhibicije (mm) u drugom mjeranju, 6 dana nakon inokulacije

Količina Ulje	3 μ l	5 μ l	7 μ l
<i>Carum carvi</i>	0,00 \pm 0,00 d ^D	19,13 \pm 2,59b ^{CD}	27,13 \pm 1,61b ^A
<i>Cinnamomum verum</i>	0,63 \pm 0,38d ^D	13,38 \pm 1,07 d ^E	2,88 \pm 1,21d ^C
<i>Lavandula officinalis</i>	25,00 \pm 0,91b ^B	29,75 \pm 1,48a ^{AB}	27,63 \pm 0,55b ^A
<i>Melissa officinalis</i>	0,00 \pm 0,00 d ^D	0,00 \pm 0,00 d ^D	13,00 \pm 0,20c ^B
<i>Mentha x piperita</i>	29,00 \pm 1,32 a ^A	32,13 \pm 0,31a ^A	27,88 \pm 1,56b ^A
<i>Pimpinella anisum</i>	0,88 \pm 0,59d ^D	24,00 \pm 5,20b ^{BC}	28,75 \pm 3,13ab ^A
<i>Pogostemon patchouli</i>	0,00 \pm 0,00 d ^D	0,63 \pm 0,13d ^E	1,25 \pm 0,43d ^C
<i>Rosmarinus officinalis</i>	12,63 \pm 1,42c ^C	13,13 \pm 0,66c ^D	12,00 \pm 0,68c ^B
<i>Thymus vulgaris</i>	30,63 \pm 0,47a ^A	32,63 \pm 0,13a ^A	31,88 \pm 0,24 a ^A
<i>Zingiber officinale</i>	1,25 \pm 0,72d ^D	2,25 \pm 0,32d ^E	2,63 \pm 0,52d ^C

Za prosječne vrijednosti (usporedba po stupcima) označene istim malim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti $P < 0,05$, a za prosječne vrijednosti označene velikim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti od $P < 0,01$.



Slika 5. Eterično ulje timijana u drugom mjeranju (foto: S. Grgić, 2015.)

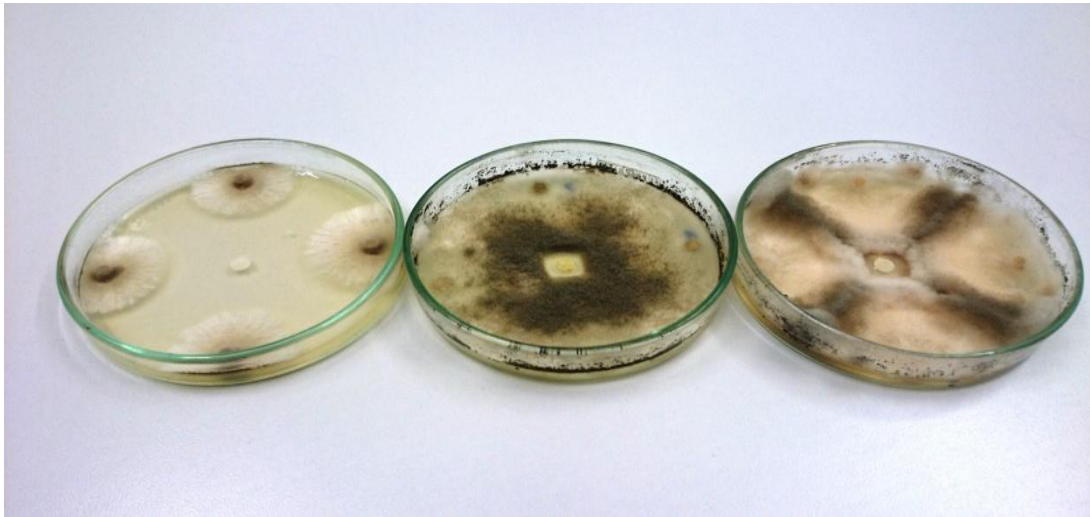
4.3. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* u trećem mjerenju

U mjerenju provedenom devet dana nakon nacjepljivanja gljive utvrđen je fungistatični učinak osam vrsta ulja na porast micelija *B.cinerea*. Faktorijalnom analizom varijance utvrđen je značajan učinak ulja, količine te njihove interakcije na porast micelija (tablica 5), no kao i u prethodno navedenim mjerenjima, vrste ulja imale su najveći učinak na porast micelija, u odnosu na količinu ulja te interakciju ulja i količine.

Tablica 5. Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcija na porast micelija *B. cinerea* 9 dana nakon inokulacije

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	Značajnost	Kvadratni eta koeficijent
Ulje	7	1206,954	P<0,01	0,86
Količina ulja	2	225,278	P<0,01	0,04
Ulje x količina	9	51,863	P<0,01	0,05
Pogreška	57	11,834		0,06

Nakon devet dana od nacjepljivanja antifungalni učinak dodatno je opao, pa je učinak utvrđen kod osam ulja (Tablica 6.): kim, cimet, lavanda, paprena metvica, anis, ružmarin, timijan i đumbir (Slika 6.). Kod svih ostalih ulja, na svim koncentracijama kao i kod kontrolnog uzorka utvrđeno je potpuno prorastanje micelija gljive.



Slika 6. Učinak eteričnih ulja đumbira, kima i cimeta lista (foto: S. Grgić, 2015.)

Ulje timijana pokazalo se kao najučinkovitije u odnosu na ostala ulja pri svim primijenjenim količinama devet dana nakon inokulacije. Pri količini 3 μ l, ulja paprene metvice i lavande nisu pokazala statistički značajno nižu učinkovitost u odnosu na ulje timijana (tablica 6) iako je zona inhibicije kod ulja paprene metvice bila 27 , a kod ulja lavande 37% manja u odnosu na zonu inhibicije kod ulja timijana. Pri većim količinama utvrđene su veće razlike u djelotvornosti spomenutih ulja, pa su tako ulja paprene metvice i lavande pri količini 7 μ l imala 32%, odnosno 57% manju zonu inhibicije u odnosu na ulje timijana.

Navedeni rezultat ukazuje na to da se povećanjem koncentracije povećava učinkovitost ulja timijana u odnosu na učinkovitost ostalih primijenjenih ulja. Također treba spomenuti ulje anisa, koje pri primijenjenim količinama 3 i 5 μ l devet dana nakon inokulacije nije imalo fungistatičan učinak, a pri količini 7 μ l bilo je po djelotvornosti drugo po redu, odmah nakon ulja timijana.

Tablica 6. Zona inhibicije (mm) u trećem mjerenju, 9 dana nakon inokulacije

Količina Ulje	3μl	5μl	7μl
<i>Carum carvi</i>	0,00 ± 0,00 c ^B	0,00 ± 0,00 d ^D	6,13 ± 0,24 e ^E
<i>Cinnamomum verum</i>	0,00 ± 0,00 c ^B	1,13 ± 0,66 d ^D	0,50 ± 0,50 g ^F
<i>Lavandula officinalis</i>	11,75 ± 0,52 b ^A	25,50 ± 3,51 b ^B	21,50 ± 1,70 c ^C
<i>Mentha x piperita</i>	13,63 ± 0,52 ab ^A	16,38 ± 1,97 c ^C	13,75 ± 1,33 d ^D
<i>Pimpinella anisum</i>	0,00 ± 0,00 c ^B	0,00 ± 0,00 d ^D	27,13 ± 0,13 b ^B
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,38 ± 0,94 c ^B	2,63 ± 1,01 d ^D	3,38 ± 1,30 f ^{EF}
<i>Thymus vulgaris</i>	18,75 ± 5,39 a ^A	32,63 ± 0,13 a ^A	31,88 ± 0,24 a ^A
<i>Zingiber officinale</i>	1,25 ± 0,72 c ^B	1,13 ± 0,72 d ^D	2,00 ± 0,61 fg ^F

Za prosječne vrijednosti (usporedba po stupcima) označene istim malim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti $P < 0,05$, a za prosječne vrijednosti označene velikim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti od $P < 0,01$.

4.4. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* u četvrtom mjerenju

U posljednjem mjerenju, nakon 12 dana, utvđen je fungistatični učinak na gljivu *B. cinerea* kod dva ulja. Faktorijskom analizom varijance uviđen je značajan učinak ulja, koncentracije i njihove interakcije na porast micelija. Kao i u svim mjerenjima, vrsta ulja imala je najveći učinak na porast micelija gljive, tj. na količinu ulja i interakciju ulja i primjenjene količine (tablica 7).

Tablica 7. Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcija na porast micelija *B. cinerea* 9 dana nakon inokulacije

Izvor varijacije	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	Značajnost	Kvadratni eta koeficijent
Ulje	1	2440,167	P<0,01	0,47
Količina ulja	2	706,948	P<0,01	0,27
Ulje x količina	2	681,760	P<0,01	0,25
Pogreška	18	0,931		0,003

Dvanaesti dan od inokulacije antifungalni učinak utvrđen je kod eteričnih ulja timijana i đumbira. U svim ostalim uzorcima utvrđeno je potpuno prorastanje Petijeve zdjelice. Ulje timijana pokazalo se kao učinkovitije u dvije od tri ispitivane koncentracije (tablica 8). Tako je pri koncentraciji od 3 μ l bilo djelotvornije ulje đumbira, ali nije utvrđena statistički značajna razlika. Pri 5 μ l ulje timijana bilo djelotvornije za 97%, dok je na 7 μ l djelotvornost bila veća za 94%, uz statistički značajne razlike u odnosu na đumbir.

Tablica 8. Zona inhibicije (mm) u četvrtom mjeranju, 12 dana nakon inokulacije

Količina Ulje	3 μ l	5 μ l	7 μ l
	<i>Thymus vulgaris</i>	0,00 \pm 0,00 a ^A	32,63 \pm 0,13 a ^A
<i>Zingiber officinale</i>	1,13 \pm 0,68 a ^A	0,88 \pm 0,72 b ^B	2,00 \pm 0,61 b ^B

Za prosječne vrijednosti (usporedba po stupcima) označene istim malim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti $P < 0,05$, a za prosječne vrijednosti označene velikim tiskanim slovom nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini značajnosti od $P < 0,01$.

5. Rasprava

Rezultati dobiveni u pokusu u skladu su s istraživanjima drugih istraživača koji su istraživali utjecaj eteričnih ulja na rast i razvoj gljive *B. cinerea*.

Brojni autori su utvrdili jak antifungalni učinak eteričnog ulja timijana (Arras i Usai, 2001.; Reddy i sur., 1998.; Bouchra i sur., 2003.).

Prema Arras i Usai (2001.), među 12 eteričnih ulja, ulje timijana pokazalo je najjači antifungalni učinak na porast micelija četiri ispitivane gljive (*B. cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* i *Alternaria citri*). Ulje timijana je primijenjeno u količini 250 ppm.

Behnam i sur. (2006.) utvrdili su antifungalni učinak paprene metvice na gljive *B. cinerea*, *A. niger* i *Rhizopus stolonifer*.

Wilson i sur. (1997.) su zaključili kako od ispitanih 49 eteričnih ulja, ulja crvenog timijana i lista cimeta imaju najjači antifungalni učinak protiv *B. cinerea*. Rezultati naših istraživanja u skladu su s rezultatima navedenih istraživanja.

Tripathi i sur. (2008.) su ispitivali antifungalni učinak 26 eteričnih ulja među kojima je bilo i ulje đumbira na porast micelija gljive *B. cinerea*. Ulje đumbira je u potpunosti inhibiralo porast ispitivane gljive.

Carta i sur. (1996.) navode da i ulje kadulje ima jako fungistatično djelovanje na *B. cinerea*.

Tanović i sur. (2005.) su utvrdili kako najbolji antifungalni učinak na porast *B. cinerea* imaju ulja timijana, cimeta i anisa, dok je ulje naranče, kao i u ovom istraživanju, pokazalo najslabije djelovanje.

Također su Lee i sur., (2007.) utvrdili da ulje slatke naranče nije imalo inhibitorni učinak na razvoj gljiva *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides*, *R. solani* i *P. ultimum*.

Wang i sur. (2010.) navode kako glavna komponenta eteričnih ulja cimeta i klinčićevca, eugenol, ima jak antifungalni učinak na rast *B. cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*, što objašnjava dobro djelovanje navedenih ulja i u ovom istraživanju.

Sukladno rezultatima autora Daferera i sur. (2003.) koji su proveli ispitivanje 8 eteričnih ulja na 3 biljna patogena, među kojima je i *B. cinerea*, najbolji učinak pokazala su, među ostalima, ulja timijana i origana.

Kako je eterično ulje kima pokazalo djelotvornost u svim mjerenjima, izuzev u četvrtom, i imalo je dobar učinak, rezultati istraživanja u skladu su s istraživanjem Aminifard i Mohammadi (2012.). Autori su ispitivali učinak tri eterična ulja: kima, komorača i mente u koncentracijama od 400 i 600 μ l na plodovima šljive. Sva eterična ulja pokazala su dobar učinak, pri čemu je utvrđeno kako sva ulja u višim koncentracijama pozitivno utječu na karakteristike kvalitete voća kao što su pH, topiva suha tvar, sadržaj ugljikohidrata, postotak propadanja tkiva. Zaključeno je kako ulja inhibiraju infekciju plodova šljive gljivom *B. cinerea*, ali se povećalo i moguće vrijeme skladištenja samih plodova.

Mohammadi i Aminifard (2011.) proveli su istraživanje učinka tri eterična ulja na uzročnika sive plijesni na krastavcu. Kao i u ovom radu, ponovno je utvrđeno antifungalno djelovanje eteričnog ulja kima, koje se pokazalo kao najbolje među navedenima. Također, kao i u prethodno navedenom radu dvojice autora, i ovaj puta su eterična ulja pokazala dobar učinak na kvalitetu ploda, u ovome slučaju krastavca.

Prema navedenim istraživanjima može se utvrditi kako su eterična ulja, ponajprije timijana, a zatim i ostala pokazala dobar učinak sukladno istraživanjima drugih autora, no vidljivo je kako ostaje dosta prostora za utvrđivanje novih činjenica. Ponajprije povećanjem koncentracija, u odnosu na koncentracije korištene u ovom istraživanju, ali i ispitivanjem eventualnih dodatnih pozitivnih svojstava eteričnih ulja na kvalitetu plodova.

6. Zaključak

Ovim istraživanjem provedenim u *in vitro* uvjetima utvrđeno je antifungalno djelovanje 22 eterična ulja na gljivu *Botrytis cinerea*.

Nakon završenog istraživanja i na osnovi dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

- Nakon prvog mjerenja utvrđen je antifungalni i stimulativni učinak određenih ulja na porast micelija gljive u odnosu na kontrolu. Sva eterična ulja, izuzev ulja kamfora, sandala i gorke naranče imala su određeni fungistatični učinak. Pri tome je najbolji učinak utvrđen kod ulja anisa, timijana, kima, mente i matičnjaka, kod kojih je zabilježena najveća zona inhibicije. U odnosu na kontrolu, eterična ulja kamfora, sandala i gorke naranče dodatno su stimulirala porast ispitivane gljive.
- Nakon drugog mjerenja antifungalni učinak zabilježen je kod 10 eteričnih ulja. Kod svih ostalih ulja, uključujući i kontrolnuvarijantu, zabilježeno je potpuno prorastanje Petrijeve zdjelice. Najbolji učinak imalo je ulje timijana u svim korištenim koncentracijama.
- Trećim mjerenjem antifungalni učinak zabilježen je kod 8 eteričnih ulja, gdje je ulje timijana pokazalo najbolji učinak. Zabilježeno je kako veće koncentracije ulja timijana pokazuju bolji učinak.
- Zadnjim mjerenjem, nakon 12 dana, zabilježen je antifungalni učinak 2 eterična ulja, timijana i đumbira. Pri najnižoj koncentraciji ulje đumbira je pokazalo bolji učinak, dok je pri višim koncentracijama učinak eteričnog ulja timijana bio značajno viši (97%).
- Prema rezultatima iz ovog istraživanja ulje timijana, osobito u višim koncentracijama, pokazalo je najbolji antifungalni učinak, tj. imalo je najveću zonu inhibicije te se s toga može smatrati potencijalnim alternativnim oblikom biljne zaštite

7. Papis literature

1. Al-Reza, S. M., Rahman, A., Ahmed, Y. , Kang, S. C. (2010.). Inhibition of Plant Pathogens *In Vitro* and *In Vivo* wiht Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96: 86-92.
2. Aminifard, M. H., Mohammadi, S. (2012.): Essential oils to control *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo* on plum fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol 93. 2:348-353.
3. Arras, G., Usai, M. (2001.): Fungitoxic Activity of 12 Essential Oils against Four Post harvest Citrus Pathogens: Chemical Analysis of *Thymus capitatus* Oil and its Effect in Subatmospheric Pressure Conditions. *Journal of Food Protection®*, 7(5):1025-1029.
4. Arcury, T. A., Quandt, S. A., Russell, G. B. (2002.). Pesticide Safety Among Farmworkers: Perceived Risk and Perceived Control as Factors Reflecting Environmental Justice. *Environ. Health Perspect.*, 110: 233- 240.
5. Bajpai, V.K., Kang, S.C. (2012) *In vitro* and *in vivo* inihbion of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J. Agr. Sci. Tech.* 14, 845-856.
6. Baruah P., Sharma R. K., Singh R. S., Ghosh A. C. (1996.). Fungicidal activity of some naturally occurring essential oil against *Fusarium moniliforme*. *J. Essent. Oil Res.* 8: 411-441.
7. Behnam, S., Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Tehrani, A. S. (2006.): Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogens. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 71(3):1321-1326]
8. Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi Hassani, L. M., Hmamouchi, M., (2003.): Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr.. *J. Ethnopharmacology*, 89(1): 165–169.
9. Burt S., (2004.). Essential oils: their antibacterial properties andpotential applications in foods—a review, *InternationalJournal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
10. Carta, C.M., Moretti, D.I., Peana, A.T. (1996.): Activity of the oil of *Salvia officinalis* against *Botrytis cinerea*. *Journal of Essential Oil Research*, 8: 399-404.

11. Caccioni D. R. L., Guizzardi M., Biondi D. M., Renda A., Ruberto G. (1998.), Relationship between volatile components of Citrus fruits essential oil and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 73-79
12. Celikel N., Kavas G. (2008.): Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 26: 174-181
13. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D. (2014.): The Effect of Essential Oils on the Development of Phytopathogenic Fungi. U knjizi Sharma N. i sur. „Biological Controls for Preventing Food Deterioration – Strategies for Pre- and Postharvest Management“, 273-292. Wiley Blackwell, UK.
14. Ćosić, J., Vrandečić, K., Postić, J., Ravlić, M. (2010.): *In vitro* antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda* 16(2), 25-28.
15. Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polissiou, M. G. (2003.): The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; *Crop protection*, Vol. 22, I. 1: 39-44
16. Dorman, H.J.D., Deans, S.G. (2000.) Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.
17. Fandohan, P., Gbenou, J.D., Gnonlonfin, B., Hell, K., Marasas, W. F., Wingfield, M. J. (2004) Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin contamination in corn. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6824-6829.
18. Fillinger, S., Elad, Y. (2015.): *Botrytis- the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. ISBN 978-3-319-23371-0 (eBook) Springer International Publishing Switzerland 2016., page 6. (doi:10.1007/978-3-319-23371-0)
19. Harris, R. (2002.): Progress with superficial mycoses using essential oils, *International Journal of Aromatherapy*, 12: 83-91.
20. Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K., (2010.): *Bolesti cvijeća i ukrasnog bilja*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.
21. Katooli, N., Maghsodlo, R., Honari, H., Razavi, S. E. (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.

22. Kishore, G.K., Pande, S., Harish, S. (2007.): Evaluation of Essential Oils and Their Components for Broad-Spectrum Antifungal Activity and Control of Late Leaf Spot and Crown Rot Diseases in Peanut, *Plant Disease*, 91(4): 375-379.
23. Lee S. E., J. E. Kim and H. S. Lee, (2001.). Insecticide resistance in increasing interest. *Agri. Chem. Biotechnol.*, 44: 105-112
24. Lee S. O., Choi G. J., Jang K. S., Lim H. K., Cho K. Y., Kim J. C. (2007.). Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against post-harvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 23: 97-102.
25. Maceljiski, M., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Barić, B. (2006.): Štetočinje vinove loze, Zrinski d.d. Čakovec.
26. Mohammadi, S., Aminifard, M. H. (2011.): *In vitro* and *in vivo* Antifungal Activities of Three Essential Oils Against Grey Mould Disease in Cucumber (*Cucumis sativus*). *Asian Journal of Plant Sciences* 10 (5): 287-293
27. Novak, A. (2012.): Karakterizacija patotipova gljivice *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous uzročnika barsunaste plijeni lista rajčice u Hrvatskoj. Doktorski rad. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku.
28. Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H. N. (2000.): Essential Oils as Potent Source of Nematicidal Compounds. *Journal of Phytopathology* Volume 148, Issue 7-8, pages 501–502
29. Paster, N. Bullerman, L. B. (1988.): Mould Spoilage and Mycotoxin Formation in Grains as Controlled by Physical Means. *Int. J. Food Microbiol.*, 7: 257-265.
30. 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.
31. Sharma N., Verma U. K. (2004.): Bioactivity of *Hyptis suaveolens* on storage mycoflora. In „International Conference on Fumigation and Controlled Atmosphere“. Conrad Jupiters, Gold coast, Australia, p. 55.
32. Singh G., Upadhyay R. K., Narayanan C. S., Padamkumari K. P., Rao G. P. (1992.): Fungitoxic activity of volatile oils of *Hyptis suaveolens*. *Fitoterapia*, 63: 462.

33. Soliman, K. M., Badeaa, R. I. (2002.): Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol.*,40(11):1669-1675.
34. Soyly, S., Yigitbas, H., Soyly, E.M., Kurt, S. (2007.): Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1021-1030.
35. Sukatta, U., Haruthaithanasan, V., Chantarapanont, W., Dilokkunanant, U. and 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.
36. Tahmasebi A., Andi S. A., Ahmadi M. R., Ghods Alavi B. S., Tahmasebi A. (2012.). Inhibitory effect of essential oils of *Scerorhachis platyrachis* and *Sclerorhachis leptoclada* on phytopathogenic fungi. *Int. J. of AgriScience*, 2(1): 48-53.
37. Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E. (2005.): Toksičnost etarskih ulja za *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro*. *Pesticidi i fitomedicina*, 20(2): 109-114.
38. Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., Casanova, J. (1995.): Oils, of Individual Components of Essential. "Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy." *J. of Magnetic Resonance Analysis* 1995: 25-34.
39. Topolovec-Pintarić, S. (2000.): Urođena i stečena otpornost *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. na botriticide u vinogradima i suodnos rezistentnih patotipova. Doktorska disertacija. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
40. Tripathi, P., Dubey, N.K., Shukla, A.K. (2008.): Use of some essential oils as postharvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(1): 39-46.
41. Veloz-Garcia, R., Marin-Martinez, R., Veloz-Rodriguez, R., Rodriguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., Monzalez- Chavira, M. M., Anaya-Lopez, J. L., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Perez, A. A., Loarca-Pina, G. and Guevara-Gonzalez, R. G. (2010.): Antimicrobial Activities of Cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) Phenolics- Containing Extract against Fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Ind. Crops Prod.*,31: 134-138.

42. Wang, C., Zhang, J., Chen, H., Fan, Y., Shi, Z. (2010.): Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Tropical Plant Pathology*, 35(3): 137-143.
43. Wilkins, K.M., Board, R.G. (1989.): *Natural antimicrobial systems, U: Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, Gould, G.W. (ur.), Elsevier, London.
44. 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.
45. 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 istraživanja bio je utvrditi utjecaj 22 eterična ulja (anis, timijan, kim, paprena metvica, lavanda, kadulja, matičnjak, ružmarin, mirta, cimet list, bosiljak, bijeli bor, eukaliptus, cedar, bergamot, mandarina, čempres, pačuli, đumbir, gorka naranča, sandal, kamfor) na rast micelija uzročnika sive plijesni (*Botrytis cinerea*). Pokus je proveden u *in vitro* uvjetima na KDA podlozi u 2 ponavljanja. Ulja su primijenjena u tri količine (3, 5 i 7 μ l), a porast micelija mjeren je 4 puta tijekom 12 dana (svaka tri dana jedno mjerenje). Sva ulja, izuzev ulja gorke naranče, sandala i kamfora, pokazala su određeno antifungalno djelovanje. U odnosu na kontrolu, najbolji učinak imala su ulja timijana i đumbira, dok je za ulja gorke naranče, sandala i kamfora utvrđen stimulativni učinak na rast gljive *Botrytis cinerea*.

Ključne riječi: eterična ulja, *Botrytis cinerea*, antifungalno djelovanje, inhibicija

9. Summary

The aim of this study was to determine the effect of 22 essential oils (anise, thyme, cumin, peppermint, lavender, sage, lemonbalm, rosemary, myrtle, cinnamon leaf, basil, white pine, eucalyptus, cedar, bergamot, mandarin, cypress, patchouli, ginger, bitter orange, sandalwood, camphor) on growth of gray mold (*Botrytis cinerea*), while water was used as a control. The experiment was performed *in vitro* on PDA medium in 2 repetitions. Oils were applied at three amounts (3, 5 and 7 μ l), and the mycelial growth was measured 4 times during 12 days (every 3 days). All oils, except oils of bitter orange, sandalwood and camphor, have shown a certain antifungal activity. Compared to the control, the best antifungal activity have shown thyme and ginger oil, while for oils of bitter orange, sandalwood and camphor was determined a stimulating effect on growth of fungus *Botrytis cinerea*.

Keywords: essential oils, *Botrytis cinerea*, antifungal activity, inhibition

10. Popis tablica

Redni broj	Naziv tablice	Broj str.
1.	Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcije na porast micelija <i>B.cinerea</i> , 3 dana nakon inokulacije.....	13
2.	Zona inhibicije (mm) u prvom mjerenju, 3 dana nakon inokulacije.....	14
3.	Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcije na porast micelija <i>B.cinerea</i> , 6 dana nakon inokulacije.....	15
4.	Zona inhibicije (mm) u drugom mjerenju, 6 dana nakon inokulacije.....	16
5.	Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcija na porast micelija <i>B. cinerea</i> 9 dana nakon inokulacije.....	17
6.	Zona inhibicije (mm) u trećem mjerenju, 9 dana nakon inokulacije.....	19
7.	Utjecaj ulja, koncentracije i njihove interakcija na porast micelija <i>B. cinerea</i> 9 dana nakon inokulacije.....	20
8.	Zona inhibicije (mm) u četvrtom mjerenju, 12 dana nakon inokulacije.....	20

11. Popis slika

Redni broj	Naziv slike	Broj str.
1.	Eterična ulja korištena u pokusu (foto: S. Grgić, 2015.).....	9
2.	Raspored kružnih isječaka gljive i filter papira u Petrijevoj zdjelici (foto: S. Grgić, 2015.).....	10
3.	Nanošenje eteričnog ulja na filter papir u središtu zdjelice (foto: S. Grgić, 2015.).....	11
4.	Inkubirane Petrijeve zdjelice u termostatskoj komori (foto: S. Grgić, 2015.)..	11
5.	Eterično ulje timijana u drugom mjerenju (foto: S. Grgić, 2015.).....	16
6.	Učinak eteričnih ulja đumbira, kima i cimeta (foto: S. Grgić, 2015.).....	18

TEMELJA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na gljivu *Botrytis cinerea*
Slavko Grgić

Sažetak

Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj 22 eterična ulja (anis, timijan, kim, paprena metvica, lavanda, kadulja, matičnjak, ružmarin, mirta, cimet list, bosiljak, bijeli bor, eukaliptus, cedar, bergamot, mandarina, čempres, pačuli, đumbir, gorka naranča, sandal, kamfor) na rast uzročnika sive plijesni (*Botrytis cinerea*). Pokus je proveden u *in vitro* uvjetima na KDA podlozi u 2 ponavljanja. Ulja su primijenjena u tri količine (3, 5 i 7 μ l), a porast micelija mjereno je 4 puta tijekom 12 dana (svaka tri dana jedno mjerenje). Sva ulja, izuzev ulja gorke naranče, sandala i kamfora, pokazala su određeno antifungalno djelovanje. U odnosu na kontrolu, najbolji učinak imala su ulja timijana i đumbira, dok je za ulja gorke naranče, sandala i kamfora utvrđen stimulativni učinak na rast gljive *Botrytis cinerea*.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Broj stranica: 32

Broj grafikona i slika: 6

Broj tablica: 8

Broj litetturnih navoda: 45

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: eterična ulja, *Botrytis cinerea*, antifungalno djelovanje, inhibicija

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. Prof. dr. sc. Vlatka Rozman, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Graduate thesis
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Plant production, course Plant Protection

Antifungal influence of essential oils on fungus *Botrytis cinerea*
Slavko Grgić

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of 22 essential oils (anise, thyme, cumin, peppermint, lavender, sage, lemonbalm, rosemary, myrtle, cinnamon leaf, basil, white pine, eucalyptus, cedar, bergamot, mandarin, cypress, patchouli, ginger, bitter orange, sandalwood, camphor) on growth of gray mold (*Botrytis cinerea*), while water was used as a control. The experiment was performed *in vitro* on PDA medium in 2 repetitions. Oils were applied at three amounts (3, 5 and 7 μ l), and the mycelial growth was measured 4 times during 12 days (every 3 days). All oils, except oils of bitter orange, sandalwood and camphor, have shown a certain antifungal activity. Compared to the control, the best antifungal activity have shown thyme and ginger oil, while for oils of bitter orange, sandalwood and camphor was determined a stimulating effect on growth of fungus *Botrytis cinerea*.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: DSc Jasenka Ćosić, Full Professor

Number of pages: 32

Number of figures: 6

Number of tables: 8

Number of references: 45

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: essential oils, *Botrytis cinerea*, antifungal activity, inhibition

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. DSc Karolina Vrandečić, Associate Professor, chair
2. DSc Jasenka Ćosić, Full Professor, mentor
3. DSc Vlatka Rozman, Full Professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d