Antifugalno djelovanje eteričnih ulja na Sclerotinia sclerotiorum

Ižaković, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:236404

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

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

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ema Ižaković

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA *Sclerotinia sclerotiorum*

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ema Ižaković

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA NA *Sclerotinia sclerotiorum*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada :

1. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, predsjednik

2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor

3. izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1.UVOD 1

2.PREGLED LITERATURE 3

3.MATERIJAL I METODE 11

3.1.Priprema PDA podloge 11

3.2.Provođenje pokusa 11

4.REZULTATI 14

4.1. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na temperaturi od 15 °C 14

4.2. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na temperaturi od 20 °C 19

4.3. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na temperaturi od 30 °C 25

5. RASPRAVA 29

6.ZAKLJUČAK 32

7. LITERATURA 33

8. SAŽETAK 36

9.SUMMARY 37

10. POPIS TABLICA 38

11. POPIS SLIKA 39

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1.UVOD

Sclerotinia sclerotiorum je polifagna gljiva koja ima velik broj domaćina te osim kultiviranih biljnih vrsta zaražava i korovne vrste. Najveće štete pričinjava na suncokretu, soji, uljanoj repici i duhanu. Simptomi koje ova gljiva izaziva ovise o samoj biljnoj vrsti, ali isto tako i o organu biljke koji je napadnut. *S. sclerotiorum* tijekom razvoja formira micelij koji je višestaničan, sklerocije i apotecije s askusima i askosporama. Osnovni izvor zaraze su sklerocije, koje mogu prezimjeti ili u biljnim ostatcima ili u tlu. Sklerocije su aseksualne tvorevine, građene od vegetativnih hifa, koje se međusobno isprepliću i čine gusti splet. Razvoj sklerocija je podijeljen u 3 stadija: začetak formiranja sklerocija, rast i sazrijevanje. U prvom stadiju razvoja pojavljuju se mali početni oblici isprepletenih hifa. U drugom stadiju dolazi do povećanja sklerocija, a treći stadij razvoja karakterizira unutarnje sjedinjavanje komponenti i pigmentacija te se na površini sklerocije mogu uočiti kapljice vode. Tijekom sazrijevanja, sklerocije mijenjaju boju, one su prvotno bijele, zatim bež boje, a na kraju poprimaju tamno smeđu ili crnu boju. Crna boja sklerocija potječe od deponiranog melanina koji smanjuje propusnost stanica i štiti sklerocije od UV zračenja, reaktivnog kisika (ROS) i od biološke degradacije enzima proizvedenih od same gljive ili antagonističkog organizma (Erental i sur. 2008.) Sklerocije mogu klijati karpogeno u apotecije ili mogu klijati direktno u micelij, a micelij koji je nastao takvim klijanjem može ostvariti infekciju mehaničkim prodorom u rizoderm. Taj se micelij širi kroz stabljiku, a zahvaćena tkiva propadaju što dovodi do venuća biljke.

Protiv bijele truleži postoji nekoliko mjera zaštite, pri čemu su najvažnije preventivne mjere (plodored i duboko zaoravanje biljnih ostataka). No ukoliko se bolest pojavi, najčešće se upotrebljavaju kemijska sredstva (fungicidi). Međutim, korištenje kemijskih fungicida u poljoprivredi je postalo zabrinjavajuće zbog njihovog negativnog utjecaja na okoliš, nepoželjnog utjecaja na druge organizme i zbog karcinogenih svojstava nekih kemikalija. Zbog brojnih negativnih učinaka pesticida, počeli su se koristiti biološki fungicidi (Bouzidi i Mederbal, 2016.).

DeBach (1964.) je definirao biološku kontrolu kao upotrebu parazita, predatora ili patogena u suzbijanju gustoće populacije drugih štetnih organizama mnogo brže nego što bi se smanjio broj štetnih organizama u njihovoj odsutnosti. Međutim, u biološkoj se zaštiti

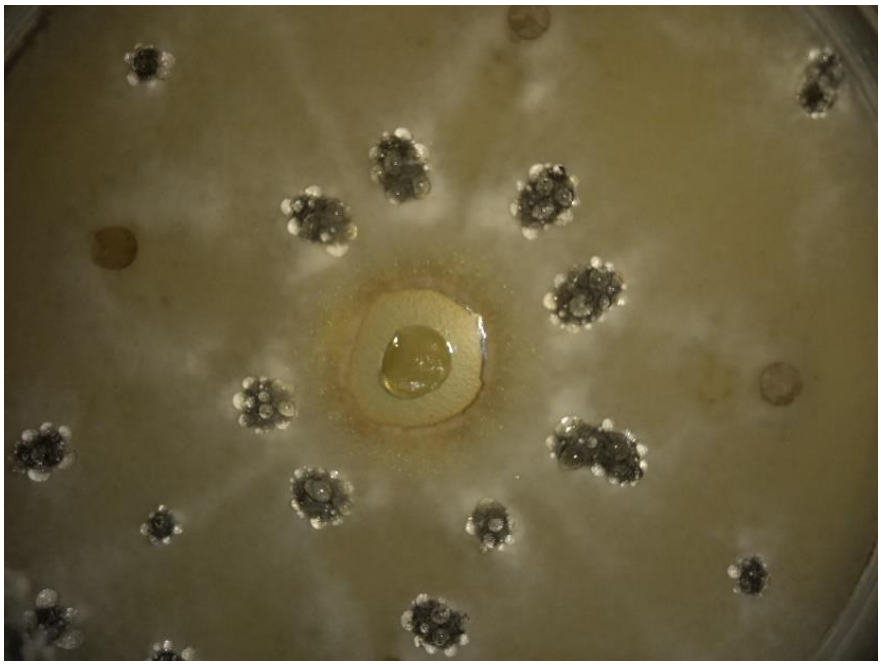
koriste i razni ekstrakti biljaka u koje uključujemo eterična ulja. Isman (2000.) navodi da su eterična ulja koncentrirane, hidrofobne tekućine koje sadrže nestabilne aromatične spojeve koji su dobiveni iz različitih biljnih dijelova. Eterična ulja su poznata po svojoj antimikrobnoj aktivnosti širokog spektra i protiv ljudskih i protiv biljnih patogena. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja ovisi o njihovom hidrofilnom ili lipofilnom karakteru. Također, neki terpenoidi utječu na aktivnosti membranskih enzima i ometaju respiratorne puteve. Određene komponente eteričnih ulja mogu čak i prekinuti ATP fosforilaciju i inhibirati sintezu DNA, RNA, proteina i polisaharida kod gljivičnih i bakterijskih stanica. Vrsta mikroorganizma, struktura stanične stijenke i raspored vanjske membrane može odrediti način djelovanja antimikrobnih sredstava.

Eterična ulja smanjuju rast hifa gljive i potiču degradaciju stanične membrane gljiva. Inhibicija rasta pomoću eteričnih ulja uzrokuje promjene u sastavu stanične stijenke, poremećaje plazmene membrane, dezorganizaciju mitohondrijske strukture i narušavanje enzimske reakcije u mitohondrijskoj membrani kao što su transport elektrona, transport protona i utječe na fosforaciju odnosno na sintezu ATP-a (Knobloch,1989.).

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi antifugalni utjecaj 10 različitih eteričnih ulja na rast i stvaranje sklerocija gljive *S. sclerotiorum.*

2.PREGLED LITERATURE

S. sclerotiorum pripada pododjelu *Ascomycota*, razredu *Discomycetes*, porodici *Sclerotiniaceae* i rodu *Sclerotinia*. Za pripadnike ovoga roda karakteristično je stvaranje sklerocija koje služe kao organi za preživljavanje (Slika 1). Klijanjem sklerocija razvija se ili apotecij (plodonosno tijelo gljive) ili micelij. Također, za ovaj rod je karakteristično da nema konidijski stadij. Ova gljiva najznačajniji je predstavnik roda *Sclerotinia* i uzročnik je bijele truleži na više od 400 biljnih vrsta. Osim kultiviranih biljnih vrsta kao što su uljana repica, suncokret, duhan, soja, rajčica, paprika, salata itd. ova gljiva napada i brojne korovne vrste. Gubitci u prinosu kod suncokreta, uljane repice i soje uglavnom nisu veliki, ali potencijalno mogu biti vrlo značajni. Visina gubitaka ovisi o različitim čimbenicima kao što su: okolinski uvjeti, tip bolesti, postotak zaraženih biljaka, otpornost genotipova (Jurković i sur., 2016.).



Slika 1. Sklerocije (izvor: Ižaković)

Conn (2006.) navodi da su prvi simptomi na paprici i patlidžanu koje uzrokuje *S. sclerotiorum* tamno zelene vodenaste lezije koje se razvijaju na lišću, stabljici i plodovima. Stabljika je uglavnom zaražena na prizemnom dijelu što uzrokuje uvenuće biljaka. Plodovi koji su zaraženi direktno ili preko peteljke brzo trunu i postaju vodenasti te se na njima

formiraju sklerocije (Slika 2). Tijekom razvoja bolesti na zaraženim biljnim dijelovima formira se bijeli micelij te se počinju stvarati sklerocije.



Slika 2. Bijela trulež paprike (https://pnwhandbooks.org/)

Kod suncokreta prosječno smanjenje prinosa uslijed truleži glava u Argentini, SAD-u i Europi kreće se između 10 i 20%, a iznimno štete mogu biti i do 100% u godinama kada se bolest javi u epidemijskim razmjerima (Pereyra i Escande, 1994., Van Baceleare i Miller, 2004.).

Simptomi koje ova gljiva izaziva ovise o biljci domaćinu i o organu koji je zaražen. Za razvoj *S. sclerotiorum* optimalne temperature su između 15 i 22 °C te visoka relativna vlažnost zraka. Gljiva preživljava kao sklerocije u zaraženom biljnom tkivu ili u tlu ili kao micelij na živom ili mrtvom biljnom tkivu. Sklerocije mogu ostati vitalne 4 do 6 godina.

S. sclerotiorum prvi puta je opisana 1897. godine, a na suncokretu je otkrivena 1861. godine. Smatra se vrlo ozbiljnim patogenom suncokreta zbog toga što je sposobna zaraziti različite organe biljke (Slika 3). Može zaraziti korijen, sjeme, stabljiku i glave te je prisutna u svim uzgojnim područjima suncokreta (Harveson, 2011.). Na soji ova se bolest može javiti

u svim razvojnim stadijima i na svim dijelovima biljke, a prvi se simptomi mogu uočiti na hipokotilu i kotiledonima odmah poslije nicanja u obliku vodenastih pjega koje se brzo počinju povećavati. Prvi simptomi kod uljane repice se najčešće javljaju u cvatnji, a možemo ih uočiti na listovima i lisnim peteljkama u obliku svijetlo smeđih vodenastih pjega koje se, ukoliko su povoljni uvjeti, mogu povećavati (Jurković i sur., 2016.).



Slika 3. Simptomi *S. sclerotiorum* na suncokretu (http://www.pannar.com/)

Na rajčici, grahu (Slika 4) i krumpiru bolest se uglavnom počinje razvijati u vrijeme cvatnje. Infekcija počinje u pazušcima listova. Na mjestu zaraze mogu se uočiti duguljaste vodene pjege koje se brzo povećavaju. Kod graha zaraženi mogu biti listovi i mahune koji se nalaze na tlu i s tih se dijelova gljiva može proširiti i na više dijelove biljaka (Pohronezny i sur., 1981.).



Slika 4. *S.sclerotiorum* na mahunama graha (https://msu.edu/)

Prema istraživanju koje je proveo Tračjevski (2006.) simptomi napada na kupusu manifestiraju se puno češće na starijim biljkama, a mlađe su rjeđe napadnute. Simptomi koje *S. sclerotiorum* izaziva na starijima biljkama kupusa mogu se uočiti u obliku vodenih pjega koje se protežu od korijena do površine tla. Zaraze također nastaju na starijem lišću koje dodiruje tlo te se s tog lišća zaraza širi na listove koji okružuju glavice kupusa. Zaraženi listovi u početku su svijetlo sive boje, a u vlažnijim uvjetima zaraženo lišće omekša i istrune. Na zaraženim glavama kupusa i na unutrašnjem lišću u vlažnim se uvjetima formira micelij bijele boje (Slika 5). Također, na svim bolesnim dijelovima biljke u povoljnim uvjetima formiraju se crne sklerocije promjera 1 do 2 cm.



Slika 5. *S. sclerotiorum* na kupusu (https://www.farmersweekly.co.za/)

Protiv ove bolesti nema potpuno učinkovitih mjera suzbijanja, ali najbolji se rezultati postižu provođenjem agrotehničkih mjera koje mogu smanjiti mogućnost nastanka infekcije. Također, važne mjere zaštite su sjetva zdravog sjemena, sjemena koje nije kontaminirano sklerocijama te višegodišnji plodored.

Fungicidi se mogu koristiti za zaštitu suncokreta i uljane repice u cvjetanju te se na taj način postiže određena zaštita zrna suncokreta i mahuna uljane repice i glava (Jurković i sur., 2016.). Međutim, kemijske mjere su nepogodne zbog brojnih negativnih učinaka na ljude, životinje i okoliš te se kao alternativa koriste biološke mjere suzbijanja. Biološka je kontrola sigurna za okoliš i u nekim je slučajevima jedina opcija za suzbijanje biljnih patogena.

Cook i Baker (1983.) definirali su biološku kontrolu protiv uzročnika biljnih bolesti kao smanjenje količine inokoluma ili aktivnosti patogena koji prouzrokuje bolest, a uz pomoć jednog ili više drugih organizama. Garret (1965.) je biološku kontrolu uzročnika biljnih bolesti definirao kao bilo koji uvjet pod kojim se opstanak i aktivnost patogena smanjuje uz posredovanje bilo kojeg drugog živog organizma (osim čovjeka).

Potencijalno bi se za proizvodnju biofungicida mogla koristiti eterična ulja koja imaju snažno fungistatično ili čak fungicidno djelovanje. Sposobna su razgraditi membrane i uzrokovati raspadanje stanica patogena. Svako se eterično ulje sastoji od glavnih i sporednih komponenti, a na udio pojedinih komponenti u eteričnom ulju utječu klimatski uvjeti, mjesto uzgoja te genotip biljke (Burt, 2004.).

Marzec i sur. (2010.) navode da su najzastupljenije kemijske komponente eteričnog ulja timijana: timol (83%), karvakrol (85%), p-cimen (60%), a-pinen (3%), linalol (21%), borneol (5%), 1,8-cineol (2.5%) i geraniol (6%).

U istraživanju koje su proveli Moghaddam i sur. (2013.) utvrđeno je 35 spojeva u eteričnom ulju metvice (*Mentha piperita*). Glavne komponentne ulja bile su menton (30,63%), mentol (25,16%), mentofuran (6,47%), P-felandreni (5,59%), izomenton (4,74%), mentol acetat (4,61%), pulegon (4,39%), p-kariofilen (3,05%), neomentol (2,83%), 1,8-cineol (2,15 %), germakren D (1,87%), trans-sabinen hidrat (1,53 %) i β-pinen (1,26 %).

Rus i sur. (2015.) navode da su glavne komponente eteričnog ulja kadulje kamfor 20,4%, eukaliptol 11,7 %, kamfen 11,5 %, α -pinen 9,5 % i borneol 8,8%. Prema navedenim autorima ukoliko udio ovih komponenti iznosi više od 60% ukupnog kemijskog sastava, ulje nema antifungalno djelovanje što znači da antifungalni utjecaj eteričnog ulja kadulje nije rezultat samo djelovanja glavnih komponenti nego i prisustva drugih komponenti u značajno manjim količinama.

U svojem istraživanju Ma i sur. (2015.) istraživali su inhibicijsku sposobnost ulja dobivenog iz sjemena kopra *Anethum graveolens* na S. *sclerotiorum*. Petrijeve zdjelice su inkubirane u komori pri temperaturi 20°C tijekom 8 dana. Rast micelija i stvaranje sklerocija u potpunosti je inhibiran uljem kopra u količini 1,00 µL / mL podloge pri kontaktnom djelovanju i u količini od 0,125 µL / mL podloge isparavanjem ulja. Pokusi provedeni *in vivo* ukazuju na značajno antifungalno djelovanje ulja kopra koje se očitovalo kroz smanjeni rast micelija i slabiju produkciju sklerocija.

Ma i sur. (2016.) proveli su istraživanje antifungalnog djelovanja eteričnog ulja *Ziziphora clinopodioides* na *S. sclerotiorum*. Utvrđeno je da je rast gljive bio potpuno inhibiran pri količini ulja 1,25 µL /ml pri kontaktnom djelovanju i 0,15 µL /ml isparavanjem ulja. Količina ulja od 0,15 µL/ml isparavanjem pokazala je snažan inhibitorni učinak na stvaranje sklerocija. Pri kontaktnom djelovanju i količini 1 µL /ml stvaranje sklerocija je potpuno inhibirano.

U istraživanju koje su proveli Al-Taisan i sur. (2014.) ispitan je učinak 5 eteričnih ulja na gljivu *S. sclerotiorum*. Pokus je postavljen u Petrijevim zdjelicama na PDA podlozi. Količine eteričnih ulja koje su aplicirane na podlogu su 0,01 µL/ml , 0,1 µL/ml, 0,5 µL/ml i 1 µL/ml. Petrijeve zdjelice inkubirane su u komori na temperaturi 25°C tijekom 24 h. Ulje lišća eukaliptusa pokazalo je najbolji inhibitorni učinak na rast micelija (62%), slijedi ulje cimeta (55,7%) te ulje piskavice (30%).

Elgorban i sur. (2015.) su ispitivali antifungalni utjecaj ulja luka, ulja eukaliptusa i ulja crnog kima na gljive *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *S. sclerotiorum* i *Rhizoctonia solani*. Eterično ulje luka u potpunosti je inhibiralo rast gljiva *F. oxysporum* f.sp. *melonis*, *F. solani* i *S. sclerotiorum* u količini 0,5 µL/ml . Ulje eukaliptusa u količini od 0,5 µL/ml je u potpunosti inhibiralo rast *F.solani*, *S. sclerotiorum*, *R. solani*, dok je ulje kima pri istoj količini inhibiralo rast gljiva *F. verticillioides* i *F. oxysporum* f.sp. *melonis* za 28,6-73,9%.

Amini i suradnici (2012.) proveli su istraživanje antifungalnog djelovanja ulja timijana na rast gljiva *Pythium aphanidermatum, R. solani, F. graminearum* i *S. sclerotiorum*. Pokus je postavljen u Petrijevim zdjelicama na PDA podlozi. Količina ulja koja je korištena iznosila je 200 µl/l, a Petrijeve zdjelice su inkubirane na temperaturi 28±1 °C. Timijan je inhibirao rast gljiva *P. aphanidermatum*, *R. solani*, *F. graminearum* za 91,83% te *S. sclerotiorum* za 91%.

Dianez i sur. (2018.) proveli su istraživanje antifungalnog djelovanja 12 eteričnih ulja na *Botrytis cinerea*, *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *P. aphanidermatum*, *Alternaria brassicae*, *Cladobotryum mycophilum* i *Trichoderma aggressivum* f.sp. *europaeum*. Pokus je postavljen u Petrijevim zdjelicama na PDA podlozi. Na četiri mjesta je postavljen filter papir (5 mm) gdje su eterična ulja aplicirana u količini od

8 µL. Petrijeve zdjelice su zatvorene parafinom i inkubirane na 25 ºC u mraku 4 do 7 dana. Eterična ulja timijana, eukaliptusa i ružmarina pokazala su vrlo dobar negativni utjecaj na *S. sclerotiorum* samo kod primjene u kombinaciji sva tri ulja. Eterična ulja klinčićevca, paprene metvice i ružičastog geranija potpuno su inhibirala rast gljive *S. sclerotiorum* i *P. parasitica* pri količini od 8 µL.

3.MATERIJAL I METODE

3.1.Priprema PDA podloge

Petrijeve zdjelice se moraju sterilizirati, a to se radi tako da se po 4 zdjelice umotaju u papir te stavljaju na sterilizaciju u autoklav na temperaturu 121 °C na 20 minuta. Nakon toga se priprema podloga PDA (krumpir dekstrozni agrar) za uzgoj gljiva.

Koristi se gotova podloga koja se mora odvagati u količini koju je preporučio proizvođač. Odvagana se količina stavlja u staklene tikvice i dopunjava do 1000 ml destiliranom vodom. Tikvice se stavljaju na sterilizaciju u autoklav na temperaturu 121 °C na 20 minuta. Nakon toga vremena slijedi hlađenje i sušenje te vađenje tikvica s podlogom iz autoklava. Sterilizirane Petrijeve zdjelice se poslažu u laminarij (komora za radu čistom) i potom je potrebno pripremljenu podlogu pipetom pojedinačno unositi u Petrijeve zdjelice u volumenu od 10 ml. PDA podloga je vruća i u tekućem stanju te je za daljnji rad potrebno čekati da se ohladi i postane čvrsta.

3.2.Provođenje pokusa

Pokus je proveden u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Prilikom rada korišteno je sterilizirano posuđe i metalna pinceta, plamenik, 96% etilni alkohol i metalni kružni rezač.

Cilj je bio utvrditi utjecaj 10 različitih eteričnih ulja isparavanjem na rast micelija i razvoj sklerocija gljive *S. sclerotiorum.* Eterična ulja su bila dozirana u različitim količinama (5 µL, 8 µL i 15 µL), a Petrijeve zdjelice inkubirane na različitim temperaturama (15 °C, 20 °C i 30 °C).

Postavljanje pokusa obavljeno je u laminaru (komori za rad u čistom) (Slika 6). Za provođenje pokusa bile su mi potrebne 44 Petrijeve zdjelice u kojima se nalazila pripremljena PDA podloga, 10 vrsta eteričnih ulja, destilirana voda, filter papir, plamenik, pinceta, etilni alkohol, igla, mikro pipeta, vata i čista kultura gljive *S. sclerotiorum*. U pokusu su korištena sljedeća eterična ulja: kadulja (*Salvia officinalis* L.), kim (*Carum carvi* L.), bijeli bor (*Pinus sylvestris* L.), cimet list (*Cinnamomum zeylanicum* L.), klinčićevac (*Eugenia caryophyllata* Thunb), paprena metvica (*Mentha* X *piperita* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.), lavanda

(*Lavandula officinalis* chaix.), anis (*Pimpinella anisum* L.) i gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) (Slika 7).



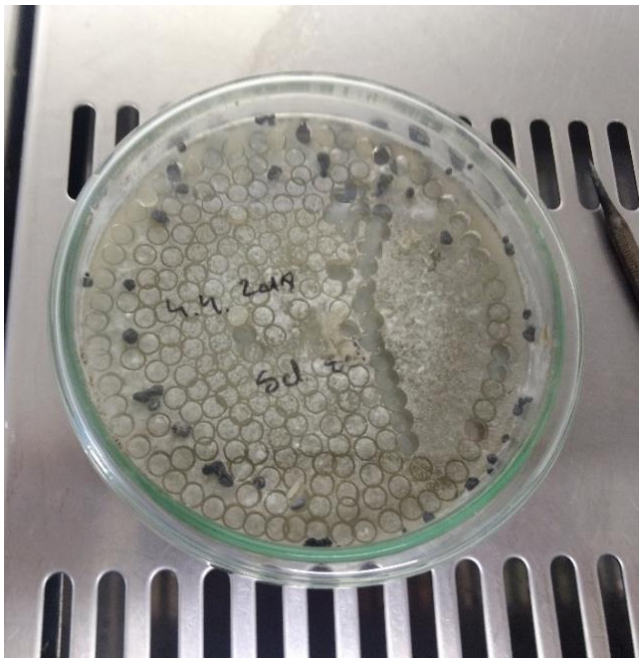
Slika 6. Priprema pokusa u laminaru (izvor: Ižaković)



Slika 7. Eterična ulja korištena za pokus (izvor: Ižaković)

Prije početka rada u laminaru bilo je potrebno dezinficirati radnu površinu etilnim alkoholom. Nakon toga, na sredinu svake Petrijeve zdjelice se pincetom stavi okrugli isječak filter papira (6 mm) na koji se mikro pipetom nakapa određena količina eteričnog ulja (5 µL, 8 µL ili 15 µL). Na 4 mjesta koja su dijagonalno raspoređena 10 mm od ruba, nacijepi se čista kultura gljive (Slika 8). Kružni isječci podloge s micelijem gljive izvađeni su pomoću

sterilnog bušaća promjera 6 mm. Pokus je postavljen u 4 ponavljanja za svaku varijantu pokusa. U kontrolnoj varijanti umjesto eteričnog ulja na filter papir aplicirana je destilirana voda. Nakon toga Petrijeve zdjelicu su stavljene u termostat komoru na planom pokusa predviđene temperature (15 °C, 20 °C i 30 °C).



Slika 8. Čista kultura gljive *S. sclerotiorum* (izvor: Ižaković)

Drugi se dio pokusa sastojao od praćenja razvoja gljive i mjerenja zone inhibicije, prebrojavanja broja sklerocija i mjerenja mase sklerocija (ukoliko se formiraju). Porast gljive mjeren je peti i osmi dan od postavljanja pokusa. Mjerenje zone inhibicije se obavlja pomoću ravnala, tako da se izmjeri prostor od vanjskog ruba micelija do filter papira na koji je aplicirano eterično ulje. Osmi dan mjerenja osim mjerenja zone inhibicije i prebrojavanja sklerocija, bilo je potrebno izmjeriti masu sklerocija.

4.REZULTATI

4.1. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na temperaturi od 15 °C

U tablici 1 prikazan je utjecaj eteričnih ulja na rast gljive i stvaranje sklerocija pri količini ulja 5 µL i temperaturi 15 °C. Peti dan od nacjepljivanja gljive najmanja zona inhibicije utvrđena je u varijanti pokusa s uljem klinčićevca (4,75 mm), zatim u varijantama s uljem cimeta (5,44 mm) i ulja metvice (6,25 mm), a najveća zona inhibicije u varijanti s uljem timijana (12,88 mm). U odnosu na kontrolu ostala ulja nisu imala statistički značajan negativni utjecaj na rast gljive *S. sclerotiorum*. Ulja cimeta, klinčićevca, metvice i timijana statistički su vrlo značajno inhibirala porast micelija. Ulje timijana pokazalo je statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na gljivu u odnosu na kontrolnu varijantu i na sva ostala ulja. Sva su ulja peti dan mjerenja, osim ulja naranče, pokazala vrlo značajan inhibicijski utjecaj na stvaranje sklerocija u odnosu na kontrolnu varijantu. Ulja cimeta i timijana potpuno su inhibirala stvaranje sklerocija kod ove gljive. Nešto veći prosječan broj sklerocija utvrđen je u varijantama pokusa s uljima kima (0,5), klinčićevca (0,5), metvice (0,75) i anisa (2). U kontroli gljiva je peti dan od nacjepljivanja formirala 18 sklerocija.

Osmi dan od nacjepljivanja u svim varijantama pokusa osim u varijantama s uljima cimeta i klinčićevca gljiva je potpuno prerasla Petrijeve zdjelice. Zona inhibicije u varijanti s uljem cimeta iznosila je 2,94 mm, a kod varijante s uljem klinčićevca bila je nešto manja i iznosila je 2,06 mm. Navedena su ulja statistički vrlo značajan inhibirala porast gljive u odnosu na kontrolnu varijantu i na sva ostala ulja. Antifungalni učinak ulja cimeta statistički je značajno bolji u odnosu na učinak ulja klinčićevca. Najmanji prosječan broj formiranih sklerocija utvrđen je u varijantama pokusa s uljem metvice (6,75) i uljem cimeta (11) i ta su ulja statistički značajno inhibirala razvoj sklerocija u odnosu na kontrolu. Najmanja prosječna masa sklerocija je utvrđena u varijantama s uljem metvice (0,29 g) i lavande (0,31 g), što je u odnosu na kontrolnu varijantu statistički značajno manje. Ulje klinčićevca pokazalo je vrlo značajan stimulirajući utjecaj na masu sklerocija.

Tablica 1. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na *S. sclerotiorum* pri temperaturi 15 °C i količini ulja 5 µL

5 µL 15 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	0	0	5,75	17,5	0,40
2.Kim	0	0	0,5	17	0,54
3.Bijeli bor	0	0	7,75	17,75	0,57
4.Cimet list	5,44	2,94	0	11	0,55
5.Klinčićevac	4,75	2,06	0,5	12	0,84
6.Paprena metvica	6,25	0	0,75	6,75	0,29
7.Timijan	12,88	0	0	17,25	0,55
8.Lavanda	0	0	9	16,25	0,31
9.Anis	0	0	2	20,75	0,59
10.Gorka naranča	0	0	14,25	19,5	0,51
11.Kontrola	0	0	18	21,75	0,56
LSD 0,05	**2,4334**	**0,6969**	**4,1438**	**3,5252**	**0,2454**
LSD 0,01	**3,1980**	**0,9158**	**5,4457**	**4,4697**	**0,3225**

U tablici 2 prikazan je utjecaj eteričnih ulja na porast gljive i stvaranje sklerocija pri količini ulja 8 µL. Peti dan od nacjepljivanja najjači inhibicijski utjecaj pokazalo je ulje timijana (19,57 m) i on je bio statistički vrlo značajno jači u odnosu na ostala ulja i na kontrolu. Ulja cimeta, klinčićevca i metvice imala su statistički vrlo značajno jači negativni utjecaj na rast gljive u odnosu na kontrolu. Ostala ulja nisu inhibirala rast gljive. Ulje timijana potpuno je inhibiralo stvaranje sklerocija. Nešto manji utjecaj na stvaranje sklerocija pokazala su ulja kima (0,5), cimeta (0,25), klinčićevca (0,75) i metvice (0,5). Ulja kadulje, bijelog bora, lavande, anisa i naranče su značajno inhibirala stvaranje sklerocija u odnosu na kontrolu u kojoj je prosječan broj sklerocija iznosio 13,5.

Osmi dan od nacjepljivanja statistički vrlo značajna veća zona inhibicije u odnosu na kontrolu i sva ostala ulja utvrđena je u varijantama pokusa s uljem timijana (8,63 mm), metvice (5,38 mm), klinčićevca (4,63 mm) i cimeta (4,25 mm). Ulje timijana statistički je vrlo značajno inhibiralo rast micelija u odnosu na kontrolu i ostala ulja. Najmanji broj sklerocija formirao se u prisustvu ulja timijana (4,25), zatim klinčićevca (5,75), cimeta (6), metvice (6,5), lavande (10,5) i kima (11,1) što je bilo statistički vrlo značajno manje

u odnosu na kontrolu. Ulje anisa pokazalo je stimulirajući utjecaj na stvaranje sklerocija. Najmanja prosječna masa je utvrđena u varijanti s uljem timijana (0,15 g), zatim metvice (0,22 g) i klinčićevca (0,37 g) što je statistički vrlo značajno manje u odnosu na kontrolu.

Tablica 2. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na *S. sclerotiorum* pri temperaturi 15 °C i količini ulja 8 µL

8 µL 15 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	0	0	9,75	14,75	0,46
2.Kim	0	0	0,5	11,1	0,49
3.Bijeli bor	0	0	6,75	12,25	0,51
4.Cimet list	5,63	4,25	0,25	6	0,41
5.Klinčićevac	5,40	4,63	0,75	5,75	0,37
6.Paprena metvica	6,25	5,38	0,5	6,5	0,22
7.Timijan	19,57	8,63	0	4,25	0,15
8.Lavanda	0	0	7,25	10,5	0,34
9.Anis	0	0	8,75	19,75	0,54
10.Gorka naranča	0	0	8	14,5	0,41
11.Kontrola	0	0	13,5	15	0,48
LSD 0,05	**1,2496**	**0,9363**	**2,5703**	**2,9449**	**0,1620**
LSD 0,01	**1,6422**	**1,2305**	**3,3778**	**3,8702**	**0,2129**

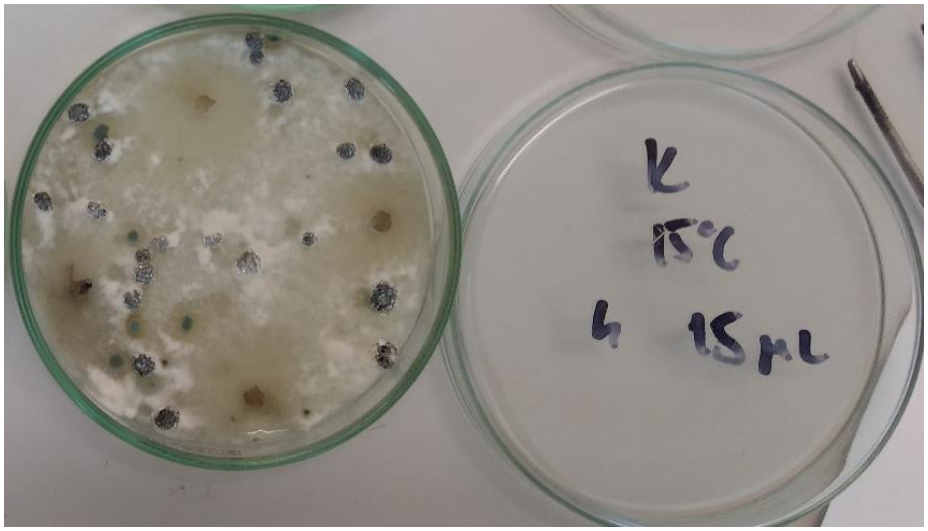
Tablica 3 prikazuje utjecaj eteričnih ulja na rast gljive i stvaranje sklerocija pri količini ulja 15 µL. Peti dan od nacjepljivanja najveća zona inhibicije utvrđena je u varijantama s uljima metvice (21,5 mm) i timijana (20,45 mm) što je bilo statistički vrlo značajno slabiji porast u odnosu na kontrolu i ostala ulja. Ulja cimeta (zona inhibicije 5,91 mm), klinčićevca (5,5 mm), kima (3,51 mm) i lavande (3,25 mm) statistički su vrlo značajno inhibirala rast micelija u odnosu na kontrolu. Ostala ulja nisu značajno inhibirala rast gljive. Sklerocije se peti dan od nacjepljivanja nisu formirale niti u jednoj varijanti s eteričnim uljima.

Osmi dan najveća zona inhibicije utvrđena je u varijanti s uljima timijana (6,56 mm), cimeta (4,5 mm), klinčićevca (4,5 mm) i metvice (3,94 mm)i ta su ulja statistički vrlo značajno inhibirala rast gljive u odnosu na kontrolu (Slika 9) i na ostala ulja. Najmanji prosječan broj formiranih sklerocija utvrđen je kod timijana (4,25) (Slika 10), metvice

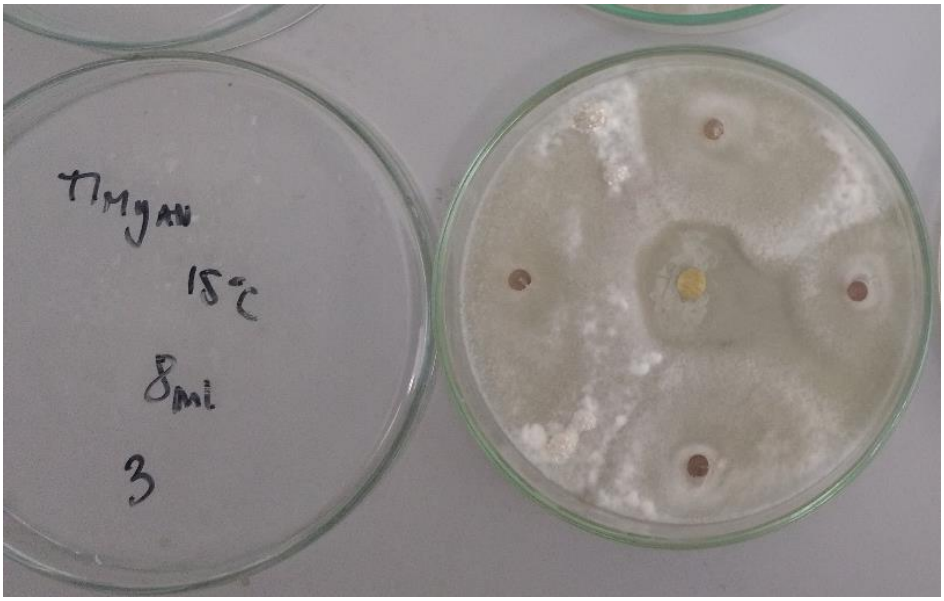
(6) i cimeta (7,75) (slika 11). Najmanja prosječna masa utvrđena je kod primjene ulja timijana (0,15 g) i metvice (0,24 g) što je statistički vrlo značajno manje u odnosu na masu u kontroli (0,56 g). U varijantama s uljima lavande, cimeta, naranče, anisa i klinčićevca masa sklerocija je veća u odnosu na kontrolu, međutim samo kod ulja klinčićevca (Slika 12) ta je razlika statistički vrlo značajna u odnosu na kontrolu.

Tablica 3. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na *S. sclerotiorum* pri temperaturi 15 °C i količini ulja 15 µL

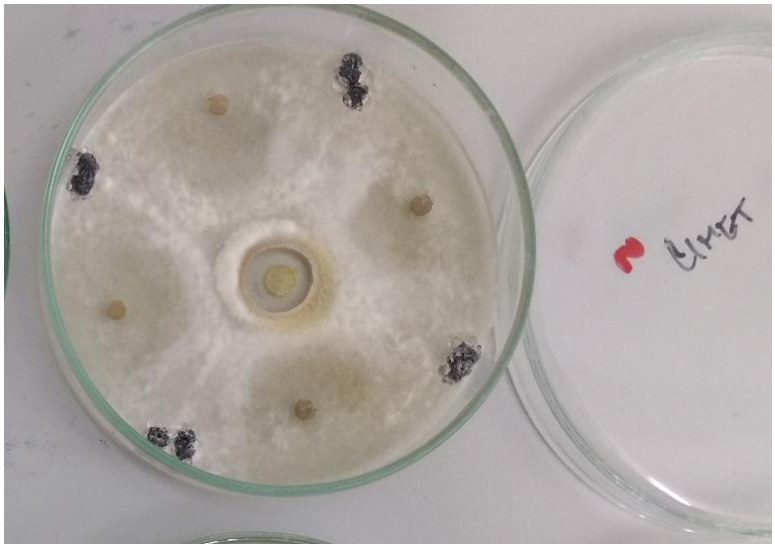
15 µL 15 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	0	0	0	16	0,56
2.Kim	3,51	0	0	11,75	0,42
3.Bijeli bor	0	0	0	17,75	0,50
4.Cimet list	5,91	4,5	0	7,75	0,60
5.Klinčićevac	5,5	4,5	0	14,25	0,73
6.Paprena metvica	21,5	3,94	0	6	0,24
7.Timijan	20,45	6,56	0	4,25	0,15
8.Lavanda	3,25	0	0	14	0,59
9.Anis	1,13	0	0	19,5	0,66
10.Gorka naranča	1,44	0	0	15	0,59
11.Kontrola	0	0	0	14,25	0,56
LSD 0,05	**2,3669**	**0,9716**	**0**	**2,8187**	**0,1192**
LSD 0,01	**3,1106**	**1,2769**	**0**	**3,7043**	**0,1566**



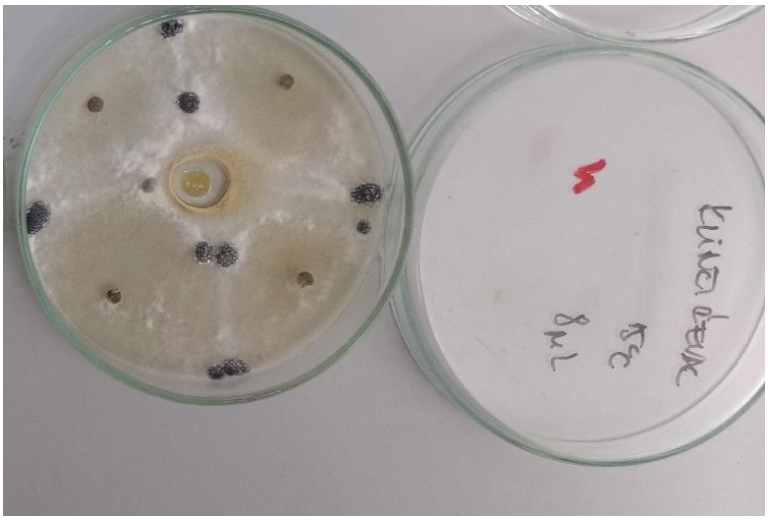
Slika 9. Kontrolna varijanta (foto: Ema Ižaković)



Slika 10. Porast micelija uz primjenu ulja timijana (15°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)



Slika 11. Porast micelija uz primjenu ulja cimeta (15°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)



Slika 12. Porast micelija uz primjenu ulja klinčićevca (15°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)

4.2. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na temperaturi od 20 °C

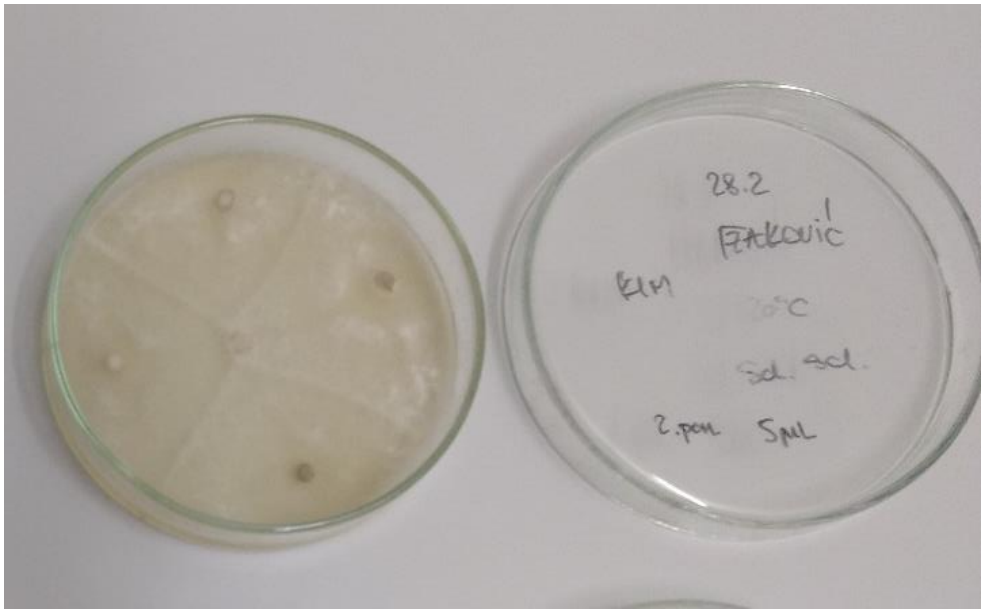
Tablica 5 prikazuje utjecaj eteričnih ulja na rast gljive i stvaranje sklerocija pri primjeni ulja u količini 5 µL i temperaturi 20 °C. Peti dan od inkubacije najmanji porast micelija utvrđen je kod primjene ulja metvice (zona inhibicije 24,50 mm), zatim ulja kima (19,50 mm), timijana (9,81 mm), klinčićevca (3,13 mm) i cimeta (2,50 mm) i ta su ulja statistički vrlo značajno inhibirala rast gljive u odnosu na kontrolu i ostala ulja. Ulja kima, metvice i timijana potpuno su inhibirala stvaranje sklerocija. .

Osmi dan najveća zona inhibicije utvrđena je kod primjene ulja metvice (23,44 mm), i to je ulje statistički vrlo značajno inhibiralo rast gljive u odnosu na kontrolu i ostala ulja. Ulje kima je i osmi dan mjerenja potpuno inhibiralo stvaranje sklerocija. Ostala ulja nisu značajno inhibirala stvaranje sklerocija u odnosu na kontrolu. Ulja bijelog bora i anisa stimulirajuće su djelovala na stvaranje sklerocija. Statistički značajno veća prosječna masa sklerocija u odnosu na kontrolu utvrđena je kod primjene ulja metvice (0,53 g), cimeta (0,53 g), klinčićevca (0,51 g), lavande (0,49 g) i anisa (0,47 g).

Tablica 4. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na *S. sclerotiorum* pri temperaturi 20 °C i količini ulja 5 µL

5 µL 20 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	0	0	24,5	24,75	0,38
2.Kim	19,50	0	0	0	0
3.Bijeli bor	0	0	27,25	27,5	0,38
4.Cimet list	2,50	2,44	21	21,25	0,53
5.Klinčićevac	3,13	2,88	21	21	0,51
6.Paprena metvica	24,50	23,44	0	15,75	0,53
7.Timijan	9,81	3,75	0	14,25	0,42
8.Lavanda	0	0	22,25	24,5	0,49
9.Anis	0	0	0,75	18,25	0,47
10.Gorka naranča	0	0	35,5	35,75	0,43
11.Kontrola	0	0	21,75	22	0,35
LSD 0,05	**1,6950**	**1,0798**	**4,3410**	**3,8337**	**0,0912**
LSD 0,01	**2,2275**	**1,4190**	**5,7049**	**5,0381**	**0,1198**

.



Slika 13. Porast micelija uz primjenu ulja kima (20°C, 5 µL) (izvor: Ižaković)

Tablica 6 prikazuje utjecaj eteričnih ulja na rast gljive i stvaranje sklerocija pri primjeni ulja u količini 8 µL i temperaturi 20 °C. Peti dan od nacjepljivanja najveća zonu inhibicije utvrđena je kod primjene ulja timijana i metvice koja su potpuno inhibirala porast micelija, zatim kima (zona inhibicije 19,56 mm), klinčićevca (5,19 mm) i cimeta (3,19) i kod primjene tih ulja porast micelija bio je statistički vrlo značajno manji u odnosu na kontrolu i ostala ulja. Stvaranje sklerocija inhibirala su ulja kima, timijana, metvice i anisa. Kod primjene ostalih ulja nisu utvrđen statistički značajan negativan učinak na stvaranje sklerocija u odnosu na kontrolu.

Osmi dan najveća zona inhibicije utvrđena je kod primjene ulja metvice (24,30 mm), što je statistički vrlo značajno slabiji porast u odnosu na kontrolu i ostala ulja. Ulje kima i osmi dan mjerenja potpuno je inhibiralo stvaranje sklerocija, dok je ulje timijana djelomično inhibiralo stvaranje sklerocija, ali je taj utjecaj statistički bio vrlo značajan u odnosu na kontrolu. Po jačini negativnog utjecaja na masu formiranih sklerocija slijedi ulje timijana (0,17 g). Najveća prosječna masa utvrđena je kod lavande i metvice što je statistički vrlo značajno veća masa u odnosu na kontrolu.

Tablica 5. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na *S. sclerotiorum* pri temperaturi 20 °C i količini ulja 8 µL

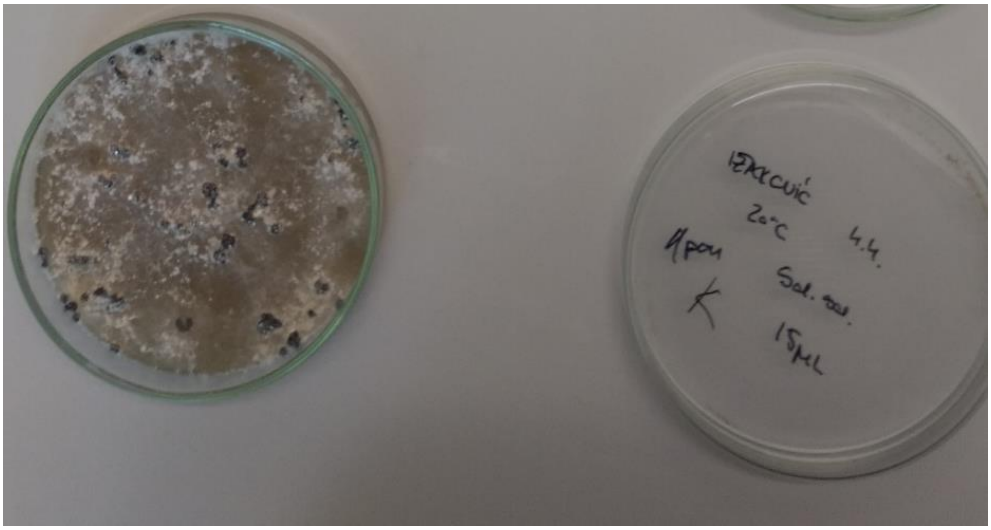
8 µL 20 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	0	0	19,75	22	0,38
2.Kim	19,56	0	0	0	0
3.Bijeli bor	0	0	22	22,25	0,39
4.Cimet list	3,19	2,31	19,5	19,75	0,52
5.Klinčićevac	5,19	4,63	21,75	22	0,52
6.Paprena metvica	25,1	24,3	0	18	0,58
7.Timijan	25,31	8,94	0	8,5	0,17
8.Lavanda	0	0	19,75	20,5	0,58
9.Anis	0,19	0	0	23,25	0,37
10.Gorka naranča	0	0	30	32,25	0,43
11.Kontrola	0	0	24,5	25,5	0,43
LSD 0,05	**1,6055**	**1,4074**	**4,3073**	**4,1700**	**0,0929**
LSD 0,01	**2,1099**	**1,8496**	**5,6606**	**5,4802**	**0,1220**

Tablica 7 prikazuje utjecaj eteričnih ulja na rast gljive i stvaranje sklerocija pri količini ulja 15 µL. Peti dan od inokulacije ulja kima, metvice i timijana potpuno su inhibirala porast micelija gljive. Ulja klinčićevca (5,31 mm), anisa (4,38 mm) i cimeta (3,19 mm) statistički su vrlo značajno inhibirala porast gljive u odnosu na kontrolu. Preostala ulja nisu imala značajan negativni učinak na porast gljive. Ulja kima, metvice i timijana peti dan su potpuno inhibirala stvaranje sklerocija.

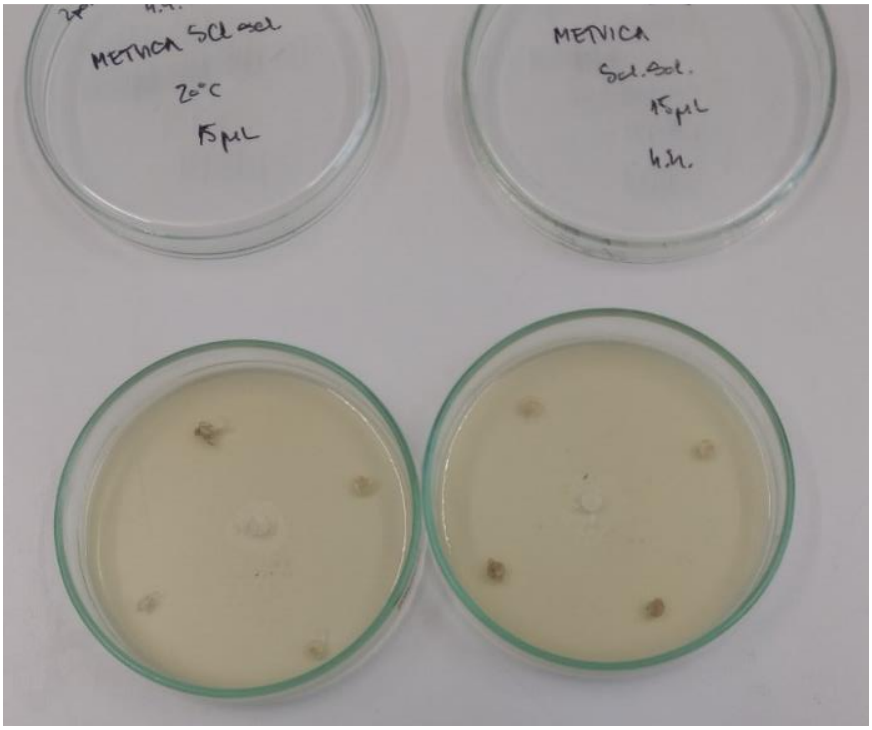
Osmi dan kod primjene ulja timijana, metvice i kima gotovo da nije bilo daljnjeg rasta micelija u odnosu na prethodno mjerenje. Ulja cimeta i klinčićevca pokazala statistički su značajno inhibirala rast micelija u odnosu na kontrolu (Slika 14) i na sva ostala ulja (osim ulja metvice (Slika 15), timijana (Slika 16) i kima). Sklerocije se nisu formirale kod primjene ulja kima, timijana i metvice, a ostala su ulja pokazala statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na stvaranje sklerocija u odnosu na kontrolu. Prosječna masa kod primjene ulja bijelog bora, lavande, anisa i naranče je u odnosu na kontrolu bila statistički vrlo značajno manja.

Tablica 6. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na *S. sclerotiorum* pri temperaturi 20 °C i količini ulja 15 µL

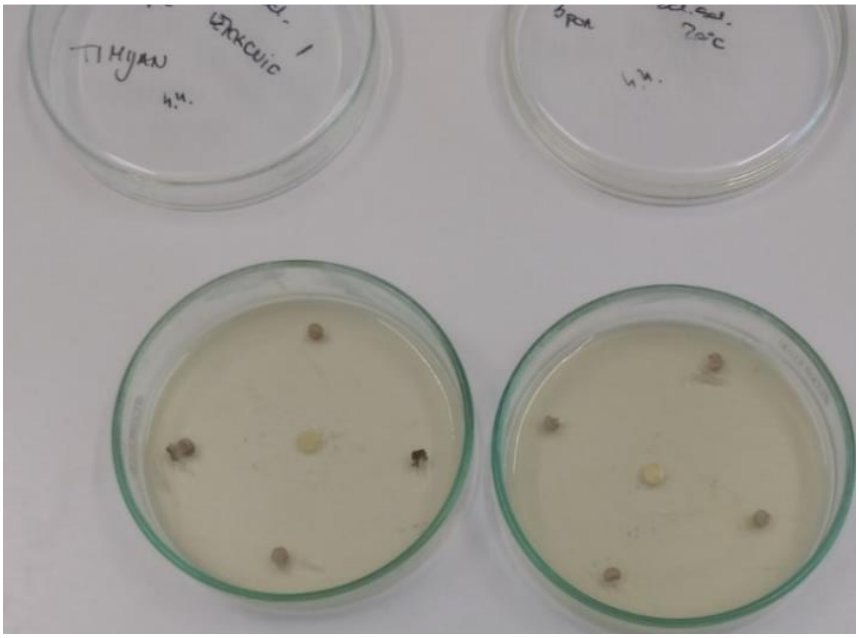
15 µL 20 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	0	0	3,75	21,5	0,43
2.Kim	26,5	25,5	0	0	0
3.Bijeli bor	0	0	19,5	20	0,35
4.Cimet list	3,19	3,06	17	17,25	0,48
5.Klinčićevac	5,31	2,63	18,25	18,5	0,46
6.Paprena metvica	26,5	25,88	0	0	0
7.Timijan	26,13	26,13	0	0	0
8.Lavanda	0	0	2,25	16,25	0,33
9.Anis	4,38	0	0	11,5	0,22
10.Gorka naranča	0	0	21,5	22	0,35
11.Kontrola	0	0	33	35,5	0,54
LSD 0,05	**2,1992**	**1,8042**	**5,1646**	**5,3812**	**0,0687**
LSD 0,01	**2,8902**	**2,3710**	**6,7872**	**7,0719**	**0,0903**



Slika 14. Kontrolna varijanta (izvor: Ižaković)



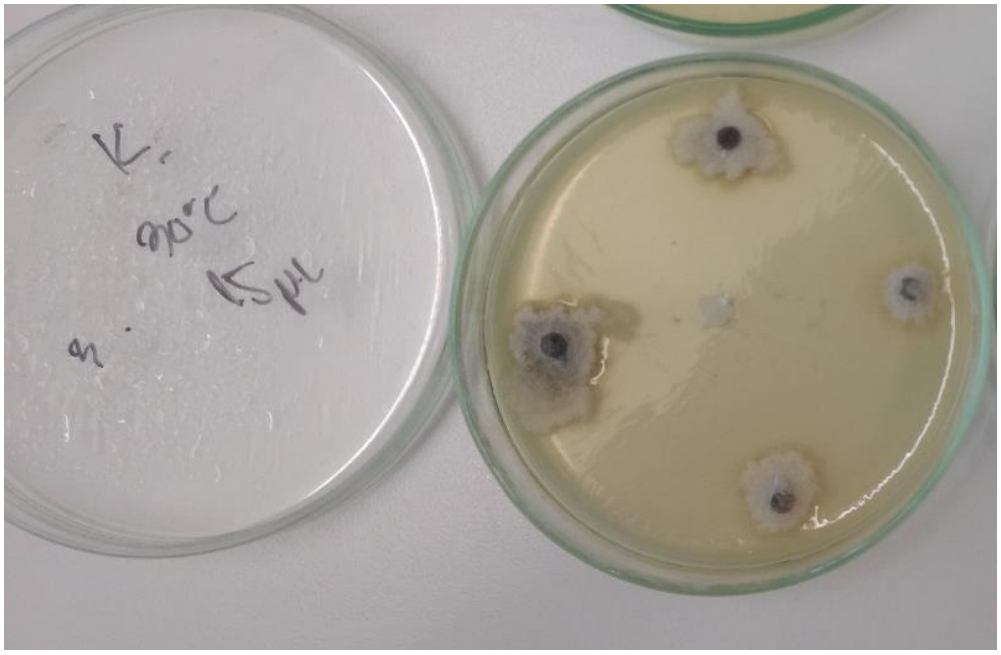
Slika 15. Porast micelija uz primjenu ulja metvice (20°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)



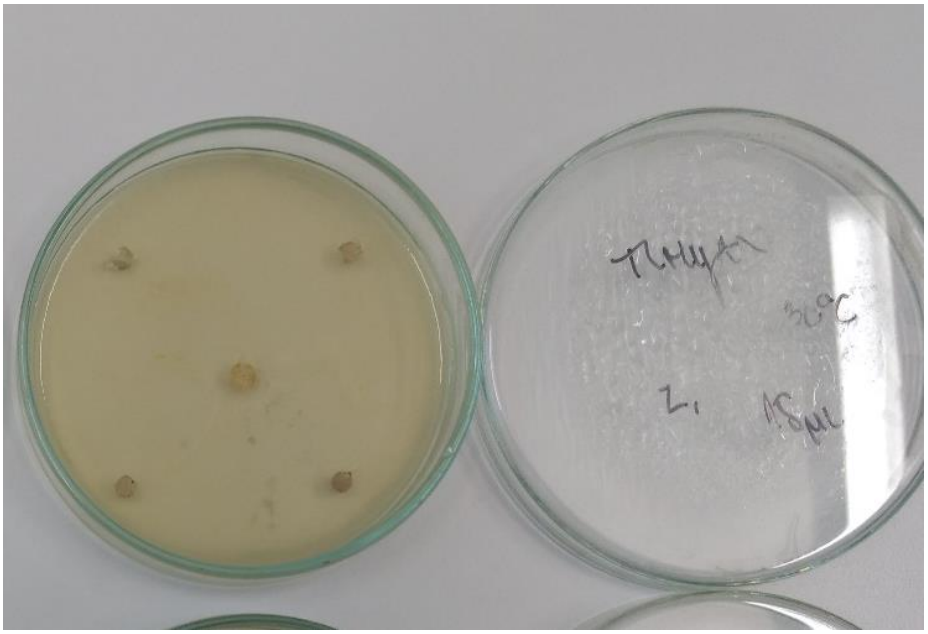
Slika 16. Porast micelija uz primjenu ulja timijana (20°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)

4.3. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na temperaturi od 30 °C

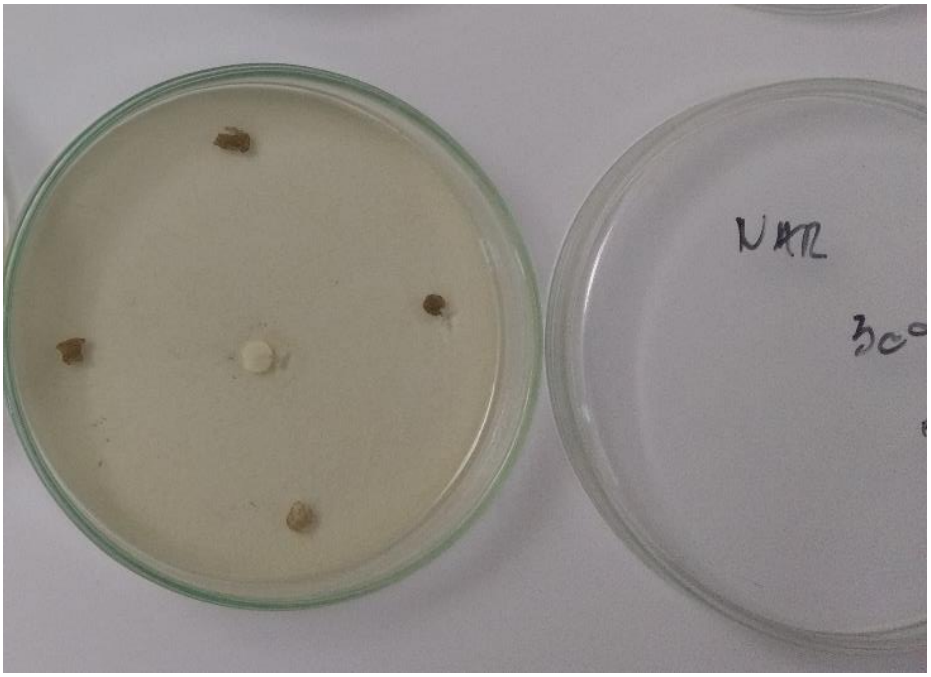
Iz rezultata prikazanih u tablicama 9,10 i 11 vidi se da pri temperaturi 30 °C i količinama ulja od 5 µL, 8 µL i 15 µL gljiva nije rasla ili je rasla jako slabo. Na slici 17 prikazana je kontrolna varijanta osam dana od nacjepljivanja pri inkubaciji na 30°C. Razlog tome je što ova gljiva voli nešto niže temperature (optimalno 15-20°C). Pri primijenjenoj količini ulja od 5 µL ulja kadulje, kima, cimeta, klinčićevca, metvice, timijana, anisa i naranče imala su statistički značajan inhibicijski utjecaj na rast gljive u odnosu na kontrolu. Pri količinama ulja 8 µL i 15 µL sva su ulja u odnosu na kontrolu imala statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast gljive. Na slikama 18 i 19 prikazan je učinak ulja timijana i gorke naranče na rast S. sclerotiorum na temperaturi 30°C.



Slika 17. Kontrolna varijanta (izvor: Ižaković)



Slika 18 Porast micelija uz primjenu ulja timijana (30°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)



Slika 19. Porast micelija uz primjenu ulja gorke naranče (30°C, 15 µL) (izvor: Ižaković)

Tablica 7. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi od 30 °C i količini ulja od 5 µL

5 µL 30 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	27,63	27,63	0	0	0
2.Kim	28,38	28,19	0	0	0
3.Bijeli bor	22,06	21,81	0	0	0
4.Cimet list	28,63	28,25	0	0	0
5.Klinčićevac	25,75	25,63	0	0	0
6.Paprena metvica	28,31	28	0	0	0
7.Timijan	28,63	28,25	0	0	0
8.Lavanda	22	22	0	0	0
9.Anis	27,63	27,38	0	0	0
10.Gorka naranča	27,81	27,75	0	0	0
11.Kontrola	24,44	24	0	0	0
LSD 0,05	**1,3324**	**1,2246**	**0**	**0**	**0**
LSD 0,01	**1,7510**	**1,6094**	**0**	**0**	**0**

Tablica 8. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi od 30 °C i količini ulja od 8 µL

8 µL 30 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	28,19	27,75	0	0	0
2.Kim	28,38	28,19	0	0	0
3.Bijeli bor	28,5	27,94	0	0	0
4.Cimet list	28,63	27,69	0	0	0
5.Klinčićevac	25,63	25,63	0	0	0
6.Paprena metvica	28,31	28	0	0	0
7.Timijan	28,94	28,63	0	0	0
8.Lavanda	28	27,56	0	0	0
9.Anis	28,19	27,75	0	0	0
10.Gorka naranča	28,13	27,25	0	0	0
11.Kontrola	25,06	24,56	0	0	0
LSD 0,05	**1,1629**	**1,3830**	**0**	**0**	**0**
LSD 0,01	**1,5283**	**1,8175**	**0**	**0**	**0**

Tablica 9. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi od 30 °C i količini ulja od 15 µL

15 µL 30 °C	Zona inhibicije (mm)		Broj sklerocija		Masa sklerocija (g)
	5.DAN	8.DAN	5.DAN	8.DAN	8.DAN
1.Kadulja	28,31	28,19	0	0	0
2.Kim	28,44	28	0	0	0
3.Bijeli bor	28,56	28,38	0	0	0
4.Cimet list	28,69	28,31	0	0	0
5.Klinčićevac	27,88	26,31	0	0	0
6.Paprena metvica	28,44	28,19	0	0	0
7.Timijan	29,25	29,06	0	0	0
8.Lavanda	28,06	27,94	0	0	0
9.Anis	28,31	28	0	0	0
10.Gorka naranča	28	27,75	0	0	0
11.Kontrola	24,06	23,25	0	0	0
LSD 0,05	**1,4106**	**1,2713**	**0**	**0**	**0**
LSD 0,01	**1,8538**	**1,6707**	**0**	**0**	**0**

5. RASPRAVA

Eterična ulja su koncentrirane, hidrofobne tekućine koje sadrže nestabilne aromatične spojeve koji su dobiveni iz različitih biljnih dijelova. Poznata su po svojoj antimikrobnoj aktivnost širokog spektra i protiv ljudskih i protiv biljnih patogena. Antimikrobno djelovanje eteričnih ulja ovisi o njihovom hidrofilnom ili lipofilnom karakteru te o vrsti i izolatu gljive i količini ulja koje je primijenjeno (Isman 2000).

U našim istraživanjima utvrdili smo da su najbolji antifungalni utjecaj na gljivu *S. sclerotiorum* pri temperaturi od 15 ºC i 20 ºC imala ulja kima, cimeta, klinčićevca, metvice i timijana. Ulje kima je pri svim koncentracijama, pri temperaturi 20 ºC inhibiralo stvaranje sklerocija, dok su ulja timijana i metvice samo pri količini ulja od 15 µL imala inhibicijski utjecaj na stvaranje sklerocija ove gljive. Navedena ulja pokazuju dobar antifungalni utjecaj i na rast drugih gljiva. U istraživanju koje su proveli Amini i sur. (2012.) utvrđeno je da ulje timijana ima dobar antifungalni utjecaj na rast *S. sclerotiorum,* ali isto tako i na druge gljive među kojima su *P. aphanidermatum, R. solani, F. graminearum*. Ćosić i sur. (2010.) navode da je ulje cimeta pokazalo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljiva *Diaporthe helianthi, Diaporthe caulivora* i *Phomopsis viticola.* Ulje timijana imalo je antifungalni utjecaj na gljive *D. caulivora, D. helianthi, P. viticola* i *P. longicolla,* a ulje metvice na rast gljive *F. graminearum*. Dianez i sur (2018.) proveli su istraživanje u kojem su istraživali utjecaj 12 eteričnih ulja na 8 fitopatogenih gljiva te navode da su eterična ulja timijana, eukaliptusa i ružmarina pokazala vrlo jak antifungalni učinak na *S. sclerotiorum* samo u kombinaciji. Također, navode da su eterična ulja klinčićevca, paprene metvice i ružičastog geranija potpuno inhibirala rast gljiva *S. sclerotiorum* i *P. parasitica* pri količini od 8 µL.

S. sclerotiorum je gljiva koja voli vlažnije uvjete i relativno nižu temperature te je zbog toga utjecaj ulja pri temperaturi 15 ºC bio nešto slabiji. Najjači negativni utjecaj ulja utvrđen je na temperaturi 20 ºC. Pri temperaturi 30 ºC gljiva gotovo da nije rasla niti u jednoj varijanti zbog toga što ova gljiva preferira temperature od 15 do 21 ºC.

Eterična ulja cimeta i klinčićevca pri temperaturama 15 i 20 ºC, pokazala su statistički vrlo značajnu inhibicijsku sposobnost u odnosu na kontrolu i peti i osmi dan mjerenja. U varijanti s eteričnim uljem klinčićevca, pri svim primijenjenim količinama i temperaturama

15 i 20 ºC, formirao se manji broj sklerocija u odnosu na kontrolnu varijantu, međutim, njihova je masa bila veća u odnosu na kontrolnu varijantu i na sva ostala ulja.

Ulje metvice pri temperaturi 15 ºC samo je pri količini 15 µL imalo statistički značajan inhibicijski utjecaj na rast gljive i peti i osmi dan od nacjepljivanja. Pri manjim količinama ulja peti dan od nacjepljivanja utvrđena je statistički značajno antifungalno djelovanje, ali je ona osmi dan od nacjepljivanja izostala. Ovo ulje je imalo i određeni negativni učinak na stvaranje sklerocija. U količini ulja 8 i 15 µL je imalo statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na stvaranje sklerocija i na masu sklerocija u odnosu na kontrolnu varijantu i na sva ostala ulja, osim ulja timijana. Pri temperaturi 20 ºC djelovanje ulja bilo je puno jače te je pri svim količinama rast gljive gotovo potpuno inhibiran i peti i osmi dan od nacjepljivanja. Pri količini 15 µL eterično ulje metvice potpuno je inhibiralo stvaranje sklerocija.

Timijan je pri temperaturi 15 ºC peti dan od nacjepljivanja imao statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljive u odnosu na kontrolnu varijantu i sva ostala ulja. Osmi dan od nacjepljivanja ta je inhibicijska sposobnost bila manja, ali je i dalje bila vrlo značajna u odnosu na kontrolnu varijantu. Ulje timijana je također inhibiralo stvaranje sklerocija te je razlika između broja formiranih sklerocija i mase sklerocija bila statistički vrlo manja u odnosu na kontrolnu varijantu i na sva ostala ulja uključena u pokus. Pri temperaturi 20 ºC pri svim količinama ulja rast gljive bio je gotovo potpuno inhibiran i peti i osmi dan od nacjepljivanja, a pri količini 15 µL eterično ulje timijana potpuno je inhibiralo stvaranje sklerocija.

Eterično ulje lavande nema značajan negativni utjecaj na rast micelija gljive, ali je utvrđen statistički značajan negativni utjecaj na stvaranje sklerocija. Prosječna masa formiranih sklerocija u varijanti s uljem lavande pri temperaturi 15 ºC i pri količinama ulja lavande 5 i 8 µL bila je statistički vrlo značajno manja u odnosu na kontrolnu varijantu. Pri temperaturi 20 ºC prosječna je masa statistički vrlo značajno manja u odnosu na kontrolnu varijantu samo pri najvećoj količini ulja.

Eterična ulja kadulje, anisa, bijelog bora i naranče nisu imala negativni utjecaj na rast gljive, ali su imala vrlo značajan negativni utjecaj na stvaranje sklerocija u odnosu na kontrolnu varijantu pri temperaturi 20 ºC i količini 15 µL.

Eterično ulje gorke naranče imalo je stimulirajući utjecaj na stvaranje sklerocija pri temperaturi 20 ºC i količinama ulja 5 i 8 µL. Međutim, pri temperaturi 15 ºC nije utvrđen stimulirajući utjecaj na stvaranje sklerocija.

6.ZAKLJUČAK

Nakon provedenog laboratorijskog istraživanja o antifungalnom djelovanju 10 različitih eteričnih ulja na rast *S. sclerotiorum,* stvaranje sklerocija i masu formiranih sklerocija, pri različitim temperaturama i različitim količinama ulja može se zaključiti da:

- Ulja imaju različit utjecaj na rast micelija, formiranje sklerocija i masu sklerocija
- Količina ulja ima značajan utjecaj na rast micelija, formiranje sklerocija i masu sklerocija
- Temperatura ima značajan utjecaj na porast micelija gljive i stvaranje sklerocija
- Eterično ulje timijana ima vrlo značajan negativni utjecaj na rast gljive i formiranje sklerocija sa svim količinama ulja i na svim temperaturama
- Eterična ulja cimeta i klinčićevca imaju značajan negativni utjecaj na porast micelija sa svim količinama ulja i na svim temperaturama
- Eterično ulje klinčićevca stimuliralo je porast većih sklerocija što je rezultiralo većom masom istih
- Eterična ulja metvice i kima pokazala su vrlo značajan negativni utjecaj na rast micelija i stvaranje sklerocija pri temperaturi 20 ºC
- Eterično ulje kima potpuno je inhibiralo stvaranje sklerocija pri svim količinama ulja na temperaturi 20 ºC
- Ulje gorke naranče stimulirajuće djeluje na stvaranje sklerocija gljive *S. sclerotiorum.*

7. LITERATURA

1. Al-Taisan, W. A. A., Bahkali, A. H., Elgorban, A. M., El-Metwally, M. A. (2014). Effective influence of essential oils and microelements against Sclerotinia sclerotiorum. International journal of pharmacology, 10(5), 275-281.
2. Amini, M., Safaie, N., Salmani, M. J., Shams-Bakhsh, M. (2012). Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Trakia J Sci, 10(1), 1-8.
3. Bouzidi, N., & Mederbal, K. (2016). Biological Control of Damping-Off and Root-Rot Diseases. Electronic J Biol, 12(1).
4. Burt, S. (2004.): Essential oils: Their antibacterial properties and potential aplications in foods. International yournal of Food Microbyology, 223-253.
5. Conn, K. (2006): Pepper & eggplant disease guide. A Practical Guide for Seedsmen, Growers and Agricultural Advisors, 37437.
6. Cook R., Baker K., (1983.): The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 539.
7. De Bach, P. (1964.): Biological Control of Insect Pests and Weeds. Reinhold, New York, New York. 844 pp.
8. Diánez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M. J., Blanco, R., Gea, F. J. (2018): Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. Letters in applied microbiology, 67(4): 400-410.
9. Elgorban, A. M., Bahkali, A. H., El-Metwally, M. A., Elsheshtawi, M., Abdel-Wahab, M. A. (2015): In vitro antifungal activity of some plant essential oils. Int J Pharmcol, 11(1): 56-61.
10. Erental, A., Dickman, M. B., & Yarden, O. (2008). Sclerotial development in Sclerotinia sclerotiorum: awakening molecular analysis of a “Dormant” structure. Fungal Biology Reviews, 22(1): 6-16.
11. Garrett SD, (1965.): Toward biological control of soil-borne plant pathogens. pp.14-16. U: Baker KF i Snyder WC (Ur.), Ecology of Soil-borne Plant Pathogens. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 571.

12. Gerlagh, M. (1986.): The role of flower infection by Sclerotinia sclerotiorum (White mold). Internacional Organisation for Biological and Integrated Control WPRS Bulletin 4, 21-24.
13. Harveson M. R. (2011.): Sclerotinia diseases of sunflower in Nebraska. University of Nebraska_Lincoln extension. Institute of agriculture and natural resources. G2107
14. Isman, M., B. (2000.): Plant essential oils for pestand disease management. Crop Protection, 19:603-608.
15. Jurković, D., Ćosić, J., & Vrandečić, K. (2016). Pseudogljive i gljive ratarskih kultura. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
16. Knobloch K, Pauli A, Iberl N, Weigand N, Weis HM (1989.): Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research, 1: 119–128.
17. Ma, B., Ban, X., Huang, B., He, J., Tian, J., Zeng, H., Wang, Y. (2015). Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing Sclerotinia rot of rapeseed. *PloS one*, *10*(7), e0131733.
18. Ma, B. X., Ban, X. Q., He, J. S., Huang, B., Zeng, H., Tian, J., Wang, Y. W. (2016.): Antifungal activity of Ziziphora clinopodioides Lam. essential oil against Sclerotinia sclerotiorum on rapeseed plants (Brassica campestris L.). Crop Protection, 89, 289-295.
19. Marzec, M., Polakowski, C., Chilczuk, R., Kołodziej, B. (2010. Evaluation of essential oil content, its chemical composition and price of thyme (Thymus vulgaris L.) raw material available in Poland. Herba Polonica, 56(3): 37-52.
20. Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H. K., Farhadi, N., & Hosseini, S. M. A. (2013.): Composition and antifungal activity of peppermint (Mentha piperita) essential oil from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 16(4):506-512.
21. Pereyra, V., Escade, A. (1994.): Enfermedades del girasol en la Argentina. INTA, Annual de reconocimiento. Buenos Aires.
22. Pohronezny, K., Purdy, L. H. (1981): Sclerotinia Diseases of Vegetables and Field Crops in Florida. University of Florida.

23. Rus, C. F., Pop, G., Alexa, E., Sumălan, R. M., Copolovici, D. M. (2015): Antifungal activity and chemical composition of Salvia officinalis L. essential oil. Research Journal of Agricultural Science, 47(2).
24. Trajčevski, T. (2006): Rezultati ispitivanja djelotvornosti mjera zaštite kupusa od napada Sclerotina sclerotiorum (Libert) de bary-uzročnika mumifikacije glave kupusa. Glasnik Zaštite Bilja, 29(4): 54-58.
25. Turkington, T.K:, Morrall, R.A.A., Gugel, R. K. (1991): Use of petal infestation to forecast sclerotinia stem rot of canola: evaluation of early bloom sampling. 1985-90. Canadian Journal of Plant Pathology 13:487-493.
26. Van Becelaere, G., Miller, JF. (2004.): Combining ability for resistance to Sclerotinia head rot in sunflower. Crop Science, 44:1542-1545.

8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj 10 eteričnih ulja na rast gljive *Sclerotinia sclerotiorum* stvaranje sklerocija i masu formiranih sklerocija.

Eterična ulja kima, timijana, metvice, klinčićevca i cimeta pokazala su statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljive. Eterično ulje kima je pri temperaturi 20 ˚C potpuno inhibiralo stvaranje sklerocija pri svim količinama ulja. Ulja timijana i metvice pokazala su statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na stvaranje sklerocija pri većim količinama ulja. Ulje gorke naranče stimuliralo je stvaranje sklerocija, dok je eterično ulje klinčićevca stimuliralo porast većih sklerocija što je rezultiralo većom masom istih.

Ključne riječi: *Sclerotinia sclerotiorum*, eterična ulja, porast micelija, sklerocije

9.SUMMARY

The aim of this study was to investigate influence of ten essential oils on radial growth, development of sclerotia and mass of formulated sclerotia of fungi *S. sclerotiorum*.

Cumin, thyme, mint, cloves and cinnamon essential oils shown statistically very significant inhibitory influence on radial growth of fungi. Cumin essential oil at the temperature of 20 ˚C with all amounts of oil, completely inhibited formation of sclerotia. Thyme and mint essential oils shown statistically very significant inhibitory influence on formation of sclerotia with higher amount of oil. Bitter orange essential oil stimulated formation of sclerotia and cloves essential oil stimulated boosting of sclerotia which resulted in higher mass of it.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, essential oils, radial growth, sclerotia

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi 15 °C i količini ulja 5 µL str.15

Tablica 2. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi 15 °C i količini ulja 8 µL str. 16

Tablica 3. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi 15 °C i količini ulja 15 µL str.17

Tablica 4. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi 20 °C i količini ulja 5 µL str.20

Tablica 5. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi 20 °C i količini ulja 8 µL str. 22

Tablica 6. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi 20 °C i količini ulja 15 µL str. 23

Tablica 7. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi od 30 °C i količini ulja od 5 µL str.27

Tablica 8. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi od 30 °C i količini ulja od 8 µL str.27

Tablica 9. Antifungalni utjecaj eteričnih ulja na S. sclerotiorum pri temperaturi od 30 °C i količini ulja od 15 µL str.28

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Sklerocije (izvor: Ižaković) str.3.

Slika 2. Bijela trulež paprike (https://pnwhandbooks.org/) str.4

Slika 3. Simptomi S. sclerotiorum na suncokretu (http://www.pannar.com/) str.5

Slika 4. S.sclerotiorum na mahunama graha (https://msu.edu/) str.6

Slika 5. S. sclerotiorum na kupusu (https://www.farmersweekly.co.za/) str. 7

Slika 6. Priprema pokusa u laminaru (izvor: Ižaković) str.12

Slika 7. Eterična ulja korištena za pokus (izvor: Ižaković) str.12

Slika 8. Čista kultura gljive S. sclerotiorum (izvor: Ižaković) str.13

Slika 9. Kontrolna varijanta (izvor: Ižaković) str.18

Slika 10. Porast micelija uz primjenu ulja timijana (15°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.18

Slika 11. Porast micelija uz primjenu ulja cimeta (15°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.19

Slika 12. Porast micelija uz primjenu ulja klinčićevca (15°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.19

Slika 13. Porast micelija uz primjenu ulja kima (20°C, 5 µL) (izvor: Ižaković) str.21

Slika 14. Kontrolna varijanta (izvor: Ižaković) str.23

Slika 15. Porast micelija uz primjenu ulja metvice (20°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.24

Slika 16. Porast micelija uz primjenu ulja timijana (20°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.24

Slika 17. Kontrolna varijanta (izvor: Ižaković) str.25

Slika 18. Porast micelija uz primjenu ulja timijana (30°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.26

Slika 19. Porast micelija uz primjenu ulja gorke naranče (30°C, 15 µL) (izvor: Ižaković) str.26

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**

Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, smjer Zaštita bilja

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja na *Sclerotinia sclerotiorum*

Ema Ižaković

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj 10 eteričnih ulja na rast gljive, stvaranje sklerocija i mase formiranih sklerocija gljive S. sclerotiorum. Eterična ulja kima, timijana, metvice, klinčićevca i cimeta pokazala su statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na rast micelija gljive. Eterično ulje kima je pri temperaturi od 20 ˚C potpuno je inhibiralo stvaranje sklerocija pri svim količinama ulja. Ulja timijana i metvice pokazala su statistički vrlo značajan inhibicijski utjecaj na stvaranje sklerocija pri većim količinama ulja. Ulje gorke naranče stimuliralo je stvaranje sklerocija, dok je eterično ulje klinčićevca stimuliralo porast samih sklerocija, što je rezultiralo većom masom istih

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Mentor: Jasenka Ćosić

Broj stranica: 39

Broj grafikona i slika: 19

Broj tablica: 9

Broj literaturnih navoda: 26

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: Sclerotinia sclerotiorum, eterična ulja, porast micelija, sklerocije

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilište, Josip Juraj Strossmayer Osijek, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Faculty of Agrobiotechnical Sciences **Graduate Thesis**

Graduate Studies, Course Plant protection

Antifungal activity of essential oils on *Sclerotinia sclerotiorum*

Ema Ižaković

Summary

The aim of this study was to investigate influence of ten essential oils on radial growth, development of sclerotia and mass of formulated sclerotia of fungi S. sclerotiorum. Cumin, thyme, mint, cloves and cinnamon essential oils had shown statistically very significant inhibitory influence on radial growth of fungi. Cumin essential oil at the temperature of 20 ˚C with all amounts of oil, completely inhibited formation of sclerotia. Thyme and mint essential oils had shown statistically very significant inhibitory influence on formation of sclerotia with higher amount of oil. Bitter orange essential oil stimulated formation of sclerotia and cloves essential oil stimulated boosting of sclerotia which resulted in higher mass of it.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek.

Mentor: Jasenka Ćosić

Number of pages: 39

Number of figures: 19

Number of tables: 9

Number of references: 26

Number of attachements: 0

Original in: Croatian

Key words: Sclerotinia sclerotiorum, essential oils, radial growth, sclerotia

Thesis defended on date:

Reviewers:

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

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