Rast gljive Botrytis cinerea u prisustvu eteričnih ulja

Klobučar, Dino

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:151:062777

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Dino Klobučar, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

RAST GLJIVE *Botrytis cinerea* U PRISUSTVU ETERIČNIH ULJA

Diplomski rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Dino Klobučar, apsolvent

Diplomski studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

RAST GLJIVE *Botrytis cinerea* U PRISUSTVU ETERIČNIH ULJA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

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

Osijek, 2015.

Sadržaj

1. Uvod 1
1.1 Cilj istraživanja 3
2. Pregled literature 4
3. Materijali i metode rada 9
3.1 Eterična ulja 9
3.2 Fitopatogena gljiva 10
3.3 Postavljanje pokusa 10
3.4 Statistička obrada podataka 13
4. Rezultati 14
4.1 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i temperaturi 15°C 14
4.2 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i temperaturi 22°C 15
4.3 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i temperaturi 30°C 16
4.4 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 7,5 i temperaturi 15°C 17
4.5 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 7,5 i temperaturi 22°C 19
4.6 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 7,5 i temperaturi 30°C 20
5. Rasprava 21
6. Zaključak 24
6. Popis literature 25
7. Sažetak 31
8. Summary 32
9. Popis slika 33
10. Popis tablica 34
TEMELJNA DOKUMENTACIJASKA KARTICA 35
BASIC DOCUMENTATION CARD 36

1. Uvod

U fitopatologiji gljive se opisuju pod imenom teleomorfnog ili spolnog stadija. Teleomorfni stadij vrste *Botrytis cinerea,* pod nazivom *Peziza fuckeliana* De Bary i kasnije *Sclerotinia fuckeliana* Fuckel, poznat je od 1866. godine (Hansen i Smitth, 1932), a taksonomska veza između *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz i *B. cinerea* dokazana je tek dobivanjem prvih apotecija i askospora križanjem izolata *in vitro* (Groves i Drayton, 1939). Gljiva *Botryotinia fuckeliana* mnogo je poznatija po svom konidijskom stadiju, odnosno anamorfnom ili nespolnom stadiju, a to je *Botrytis cinerea*. Upravo taj konidijski stadij pričinjava štetu u biljnoj proizvodnji.

Rod *Botrytis*, kome pripada i vrsta *Botrytis cinerea* (teleomorf *Botryotinia fuckeliana*; carstvo *Fungi*, pododjel *Ascomycota*, razred *Discomycetes*, red *Helotiales*, porodica *Sclerotiniaceae*,), jedan je od najznačajnijih rodova gljiva, prvi puta opisan 1729. godine (Jarvis, 1977). Naziv potječe od starogrčke riječi *botris* što znači grozd. Bolest koju uzrokuje *B.cinerea* ima različita imena: siva palež, siva plijesan, siva trulež, palež pupova i cvjetova te „rak“ izboja i stabljike.

Krug domaćina *B. cinerea* obuhvaća više od 230 biljnih vrsta (Van der Vlugt-Bergmans, 1996). Vrste roda *Botrytis* susreću se svugdje gdje se uzgajaju biljke domaćini: od hladnih podneblja Aljaske (Anderson, 1924) do toplih i suhih područja u Izraelu (Yunis i Elad, 1989).

Najznačajnije štete nastaju na vinovoj lozi, povrću (kupus, zelena salata, brokula, rajčica, krastavci, paprika), cvijeću (ruže, krizanteme) i jagodičastom voću (jagoda, malina, kupina) (Drobyi Lichter, 2004). U većini slučajeva, patogen je najdestruktivniji na zrelim biljnim dijelovima ili na tkivu koje stari, premda se infekcija obično ostvaruje u ranijim fenofazama razvoja. Poslije ostvarivanja infekcije zaraženi biljni dijelovi bez vidljivih simptoma ostaju latentno zaraženi duži vremenski period. Pri povoljnim vremenskim uvjetima i nakon fizioloških promjena tkiva domaćina (sazrijevanje, promjena kemijskog sastava i dr.) dolazi do ubrzane destrukcije i truljenja zaraženih biljnih dijelova, tako da kod uskadištenja plodova bez simptoma gubitci postaju evidentni tek nakon njihovog transporta do mjesta prodaje (Williamson i sur., 2007). *B. cinerea* može uzrokovati velike gubitke i na biljkama tijekom vegetacije, kako u polju tako i u staklenicima, kao i u ranijim

fazama razvoja kod nekih domaćina (Coley-Smith, 1980; Giraud i sur., 1999; Chardonnet i sur., 2000; Staats i sur., 2005; Williamson i sur., 2007; Tanović i sur., 2010).

Tijekom vegetacije gljiva razvija isključivo konidijski stadij. Konidije s konidioforima nastaju u velikom broju, a konidije su jednostanične. Raznosi ih vjetar, a kliju u kapi vode ili pri RZV većoj od 90% te pri temperaturama od 2°C do 41°C, (opt. 20-25°C). Konidije su u prirodnim uvjetima kratkoživuće tvorevine, a dužina života im ovisi od temperature, prisustva vlage, mikrobiološke aktivnosti u okruženju i izloženosti sunčevoj svjetlosti. U tlu vrste roda *Botrytis* nisu dobri kompetitori i njihove konidije su uglavnom podložne fungistatičnom efektu sredine (Coley-Smith, 1980). Ako se čuvaju na sobnoj temperaturi, u suhom stanju, konidije *B. cinerea* mogu preživjeti do 14 mjeseci (Salinas i sur., 1989).

Osim konidiofora s konidijama, vrste roda *Botrytis* formiraju sklerocije, te apotecije i askospore koje omogućavaju širenje patogena. Poslije ostvarivanja infekcije i smrti stanica domaćina, vrste roda *Botrytis* mogu preživjeti i sporulirati kao saprofiti na odumrlom biljnom tkivu, ili mogu stvarati tvorevine za preživljavanje – sklerocije, koje nastaju na živim biljkama ili na biljnim ostatcima na površini i u dubljim slojevima tla (Holz i sur., 2004). Smatra se da su sklerocije najvažnije tvorevine za održavanje vrste jer mogu preživjeti nepovoljne vremenske uvjete te mogu stvarati apotecije nakon spolnog procesa, a kod mnogih vrsta na njima nastaje nekoliko uzastopnih generacija konidija (Coley-Smith, 1980). Apoteciji se u prirodnim uvjetima uglavnom ne pronalaze ili su vrlo rijetki u zaraženim usjevima i nasadima, tako da su zaključci o ulozi apotecija i askospora u epidemiologiji bolesti zasnovani isključivo na molekularnim analizama genoma (Beever i Weeds, 2004).

B. cinerea izaziva širok spektar različitih simptoma na brojnim dijelovima biljaka pa ih je vrlo teško generalizirati. Na cvjetovima simptomi variraju, zavisno od vremenskih uvjeta te se mogu pojaviti u rasponu od sitnih nekroza do tipične vlažne truleži i propadanja. Vlažna trulež i propadanje epidermalnog i parenhimskog tkiva koje ubrzo postaje prekrivenom sivom masom konidiofora i konidija patogena predstavlja osnovni simptom bolesti na listovima, cvjetovima i sočnim plodovima. Na rajčici u plastenicima i staklenicima najčešće se zapaža trulež stabljike oko rana nastalih zakidanjem zapereka, dok se trulež plodova, popraćena obilnom sporulacijom patogena, javlja uglavnom poslije

berbe. Infekcija sjemena zabilježena je kod više od 50 vrsta biljaka kao što su lan, suncokret i zelena salata (Munde, 1980).

Biofungicidi mogu biti na bazi korisnih gljiva, bakterija, kvasaca te na bazi eteričnih ulja ili biljnih ekstrakata. Sposobnost biofungicida da zaštiti domaćina od patogena, održi se na različitim biljkama u različitim uvjetima, osnova je njegovog komercijalnog uspjeha (Klokočar-Šmit i sur., 2006).

Mehanizam djelovanja eteričnih ulja temelji se pretežito na njihovom djelovanju na staničnu membranu gljiva, odnosno uništavanju njezine strukture što dovodi do smrti stanice, blokiranju izgradnje stanične membrane te inhibiciji klijanja spora, rasta micelija i staničnog disanja (Harris, 2002.).

1.1 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj pH podloge, temperature i pet eteričnih ulja (anis, timijan, menta, bijeli bor i kadulja) na porast micelija gljive *Botrytis cinerea in vitro*, odnosno promjer micelija nakon četiri, sedam i deset dana od primjene eteričnih ulja.

2. Pregled literature

Botrytis cinerea, uzročnik sive plijesni, je gljivica poznata po brzom razvoju rezistentnosti na fungicide za njezino suzbijanje. Problem rezistentnosti posebno je izražen u zaštiti vinograda jer je siva plijesan jedna od ekonomski najznačajnijih bolesti vinove loze. U cilju prevladavanja problema rezistentnosti u svijetu se neprekidno radi na razvoju novih djelatnih tvari. U zaštiti bilja dominiraju kemijske mjere borbe, odnosno korištenje kemijskih sredstava. Istraživanja i saznanja o riziku pri primjeni nekih fungicida, po potrošača, životnu sredinu, neuspjeh pri rješavanju nekih bolesti podzemnih i nadzemnih organa biljaka, brza pojava rezistentnih jedinki u populaciji nekih štetnih vrsta, zabrana primjene sintetskih pesticida u vrijeme zriobe i berbe (naročito u zaštićenom prostoru), dovela su do povećanja interesa javnosti i struke za uvođenjem alternativnih mjera u zaštiti bilja, gdje zasluženo mjesto nalaze biološki preparati.

Definicija eteričnog ulja prema Ismanu, (2000.) je ta da su esencijalna ulja koncentrirane, hidrofobne tekućine koje u sebi sadrže nestabilne aromatične spojeve dobivene iz biljnih dijelova. Svako eterično ulje sastoji se od glavnih i sporednih komponenti (Iacobelis i sur., 2005.), a udio pojedinih komponenti u eteričnom ulju ovisi o klimatskim uvjetima, mjestu uzgoja te o genotipu biljaka iz kojih se ulja ekstrahiraju. U eteričnom ulju anisa (*Pampinella anisum*) nalaze se dvije glavne komponente, a to su anetol (76,9 - 93,7%) i γ-himahalena (0,4 - 8,2%) (Orav i sur., 2008., Rodrigues i sur., 2003.). Soković i sur. (2009.) u svojim istraživanjima navode da su glavne komponente ulja metvice (*Mentha peperita)*mentol (37,4%), mentil acetat (17,4%) i menton (12,7%). Glavne komponente eteričnog ulja običnog bora (*Pinus sylvestris* L.) su α-pinen (49,2%), sabinen (30,1%), β-pinen (14,9%) i limonen (7,9%), dok iglice sadrže β-pinen (69,5%), kamfen (14,9%), β-pinen (9,1%), sabinen (3,6%) i limonen (2,8%) (Zafra i García-Peregrín 1976.). Lis-Balchin (2006.) navodi da su glavne komponente eteričnog ulja timijana timol kojega ima od 45 do 48% te ρ-cimen (18,5 - 21,5). Ulje kadulje *(Salvia officinalis*) sastoji se od α-tujona (39 - 43%), β-tujona (5 - 9%), 1,8- cineola (7,5 - 25%), te kamfora (13 - 22,5%) (Pierozan et al., 2009., Suhr i Nielsen, 2003.).

Aromatične kemikalije prisutne u različitim biljnim dijelovima od pamtivijeka se koriste u aromaterapiji. To sugerira da imaju pozitivne zdravstvene efekte te imaju ugodan i, često, opuštajući miris. Uz to, neko bilje poput ružmarina i kadulje koristi se pri proizvodnji lijekova zauzimajući na taj način značajan dio farmaceutskog tržišta. (Singh i

Upadhayay, 1993.; Lis-Balchin i sur., 1995.; Buchbauer, 1996.; Singh, 1999.; Singh i sur., 1998., 1998., 2003.).

Daferera i sur. (2002.) navode kako esencijalna ulja i njihove komponente imaju jako fungistatično, a mnoga i fungicidno djelovanje. Eterična ulja se proučavaju zbog dobrog biološkog djelovanja na različite uzročnike bolesti ljudi, biljaka i životinja. Osim antifungalnog djelovanja mnoga eterična ulja imaju jako antibakterijsko (Dorman i sur., 2000.), insekticidno i nematocidno djelovanje (Pandey i sur., 2000.). Ulja klinčićevca i timijana sadrže veliki broj fenolnih spojeva kao što su eugenol i timol te ona time imaju bolji učinak pri direktno primjeni. Ulja koja sadrže nefenolne hlapljive spojeve kao što su citral i limonen imaju najbolji učinak kada je gljiva izložena isparavanjima eteričnog ulja. Prilikom istraživanja spoj timola iz ulja timijana je bolje djelovao na inhibiciju rasta gljivice prilikom upotrebe metode isparavanja, za razliku od eugenola iz cimeta i klinčićevca, iako su oba spoja fenoli, razlika je u tome što je molekula timola manja i lakše isparava od molekule eugenola (Suhar i Nielsen, 2003.).

Yang i Clausen (2007.) su u svome istraživanju ispitivali sinergiju među eteričnim uljima. Kombinacija nekoliko eteričnih ulja je često učinkovitija od pojedinih komponenata kada je potrebna kontrola više različitih gljiva. Kombinacija ulja čajevca i timijana je imala slabiji inhibitorni učinak nego sama primjena ulja timijana. Na temelju toga je zaključeno da nema sinergije u ovoj kombinaciji ulja, te da ulje čajevca umanjuje antifugalna svojstva ulja timijana.

Minimalna inhibitorna količina (MIC) eteričnih ulja ovisi o vrsti i sastavu ulja te o vrsti organizma na koji se primjenjuje. Tako je minimalna inhibitorna količina ulja timijana u pokusu s *Candida albicans, Aspergillus flavus, Trichoderma viride, Aerobasidium pillulans* i *Microsporum gypseum* bila 5 µl (Amvam Zollo i sur., 1998.).

U zemljama u razvoju uzročnici biljnih bolesti umanjuju prinos za oko 12% (Lee i sur., 2010.). Pesticidi koji se danas koriste u velikoj mjeri zagađuju atmosferu, ostavljaju rezidue u tlu, vodi i biljnim proizvodima te time negativno utječu na zdravlje ljudi. Da bi se izbjegao loš utjecaj kemijskih sredstava, upotrebljavaju se prirodni proizvodi velikog broja biljaka koji se koriste za kontrolu biljnih bolesti (Bowers i Locke, 2000., Momin i sur., 2001.).

Van der Vlugt- Bergmans (1996.) navodi da krug domaćina *B. cinerea* obuhvaća više od 230 biljnih vrsta. Te se vrste roda *Botrytis* mogu susresti diljem svijeta gdje se uzgajaju biljke domaćini. Rod *Botrytis*, kome pripada vrsta *Botrytis cinerea* (teleomorf *Botryotinia fuckeliana*) jedan je od najznačajnijih rodova gljiva, prvi puta opisan 1729. godine (Jarvis, 1977).

Tanović i sur. (2005.) prilikom istraživanja utvrđuju utjecaj eteričnih ulja bijelog bora, anisa, lavande, mente, ružmarina, cimeta, naranče, timijana, limuna i eukaliptusa na porast *B. cinerea in vitro*. Utvrđeno je da su ulja timijana, cimeta i anisa najbolje tj. upotpunosti inhibirala rast micelija ove gljive. Najslabije inhibitorno djelovanje su pokazala ulja naranče i bijelog bora.

Ulje slatke naranče (*Citrus sinesis*) nije imalo inhibitorni učinak na rast micelija gljiva *Fusarium oxysporum, C. gloeosporioides, R. solani, B. cinerea* te *Pythium ultimum* (Lee i sur., 2007.). Ulje slatke naranče sličnog je kemijskog sastava kao i ulje gorke naranče te sadrži najvećim dijelom limonen (91,9 – 95,6%) te mircen (1,3 – 2,24%) (Kirbaşlar i sur., 2009., Suhr i Nielsen, 2003.).

Lee i sur. (2007.) ispitivali su utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljiva *Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea* te *Pythyum ultimum*. Najjača inhibitorna svojstva su imala eterična ulja kima (*Cuminum cyminum*), limunske trave (*C. citratus*), limunskog eukaliptusa (*Eucaliptus citriodora*), origana (*Origanum vulgare*) te timijana (*T. vulgaris*). Ulje origana inhibitorno je djelovalo na rast micelija gljive *Botrytis cinerea* te *Pythium ultimum*, međutim mnoga druga eterična ulja kao što su lavnada *(Lavandula spica*), metvica (*Mentha piperita*), bor (*Pinus sylvestris*), ružmarin (*R. officinalis*), kadulja (*Salvia lavenduifolia, Salvia sclarea*) nisu imali nikakav inhibitorni učinak na rast micelija ispitivanih gljiva.

Utvrđen je utjecaj plinovite faze eteričnih ulja 18 vrsta biljaka (anisa, bergamota, bijelog bora, bosiljka, cimeta, eukaliptusa, geranija, klinčićevca, borovice, lavande, limuna, metvice, komorača, naranča, ružmarina, timijana, čajnog drveta i bora na porast *B. cinerea in vitro*. Utvrđeno je da sva eterična ulja djelomično ili potpuno inhibiraju rast micelija navedenog patogena. Najslabije inhibitorno djelovanje pokazala su ulja naranče i bijelog bora, dok su ulja timijana, cimeta, anisa, geranija, metvice i komorača potpuno inhibirala porast micelija spomenutog patogena. Ulja bosiljka, komorača, cimeta i timijana djeluju fungicidno, dok su ulja geranija i metvice samo fungitoksična (Tanović i sur., 2005).

Glavna komponenta ulja klinčićevca i cimeta, eugenol, ima jako antifugalno djelovanje na rast *B. cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum* (Wang i sur., 2010.).

Ulje timijana imalo je inhibitorni učinak na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani* i *Colletotrichum gloeosporioides*, dok ulja lavande, metvice, bora, ružmarina, kadulje nisu imala nikakav inhibitorni učinak na rast micelija ispitivanih gljiva (Lee i sur., 2007.).

Promatranjem djelovanja 26 eteričnih ulja na *B. cinerea*, ulja deset biljaka – *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citriodora*, *Eupatorium cannabinum*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum canum*, *Ocimumgratissimum*, *Ocimumsanctum*, *Prunus persica*, *Zingiber cassumunar* i *Z. officinale*, pokazala su apsolutnu (100%) inhibiciju porasta fitopatogenih gljiva (Tripathi i sur., 2008).

Primjenjivost eteričnih ulja u praksi utvrđena je za kontrolu sive truleži grožđa, prouzrokovane gljivom *B. cinerea* prilikom skladištenja. Grožđe tretirano uljem vrsta *P. persica* i *O. sanctum* pokazalo je produženo vrijeme skladištenja do četiri i pet dana. Skladištenje grožđa koje je tretirano uljem *Z. officinale* produženo je za šest dana. Ulja nisu pokazala fitotoksične efekte na kori voća (Tripathi i sur., 2008).

Nafiseh Katooli i sur. (2011.) ispitivali su inhibitorni utjecaj esencijalnih ulja timijana i eukaliptusa na šest patogenih gljivica: *Pencillium digitatum, Asperigilus flavus, C. gloeosporioides, P. ultimum, Rhizoctonia solani* i *Bipolaris sorokiniania. C. gloesporoideus* je izoliran iz citrusa, *Rhizoctonia solani* i *Bipolaris sorokiniana* iz riže, *P. digitatum* i *A. flavus* su izolirani iz plijesni kruha. Čiste kulture svih izoliranih gljivica uzgojene su na hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar (PDA). Iz listova timijana (*Thymus vulgaris* L.) i eukaliptusa (*Eucalyptus camaldulensis* L.) izvršena je ekstrakcija ulja. Esencijalna ulja u dozi 10 µl dodana su u Petrijeve zdjelice s gljivicama i to u razrijeđenim otopinama s acetonom od 25, 50 i 75% i nerazrijeđena. Ulja su aplicirana na kružne isječke filter papira. Nakon toga Petrijeve zdjelice su zatvorene parafilmom i inkubirane 30 dana u termostat komori na 25°C. Promjer rasta micelija mjeren je svaki dan. Eterično ulje timijana potpuno je inhibiralo porast micelija *Pencillium digitatum* u koncentraciji ulja od 75 i 100%, a kod *Colletotrichum gloeosporioides, Pyhitium ultimum* i *Rhizoctonia solani* u svim koncentracijama esencijalnih ulja nakon 30 dana. Razlike do dvanaestog dana pokusa nisu bile statistički značajne. Eterično ulje eukaliptusa potpuno je inhibiralo porast micelija *Pyhitium ultimum* i *Rhizoctonia solani* u svim koncetracijama

esencijalnih ulja nakon 30 dana. Eterično ulje eukaliptusa nije pokazalo antifungalni učinak na gljive *Pencillium digitatum* i *Asperigillus flavus*.

U literaturi se mogu pronaći rezultati velikog broja istraživanja u kojima je testirano fungicidno djelovanje različitih eteričnih ulja. Ekstrakt iz cvjetnih pupoljaka klinčića pokazao je fungicidno djelovanje na *Alternaria sp., Fusarium sp., Botrytis sp. i Septoria sp.* (Soatthiamroong i sur., 2003). Učinkovito se pokazalo i ulje kadulje u suzbijanju *B. cinerea* (Carta i sur., 1996).

Antifungalni učinak eteričnog ulja metvice *Mentha piperita* istraživan je za gljive *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* i *Aspergillus niger*, te je utvrđeno da različite koncentracije ulja imaju različit antifungalni učinak na ispitivane gljive (Behnam i sur., 2006.).

Wilson i sur. (1997.) utvrdili su da između 49 testiranih eteričnih ulja eterično ulje *C. zeylanicum*ima najjači antifungalni učinak na gljivu *B. cinerea*.

Hlapljivi spojevi esencijalnih ulja iz srodnih tipova *T. vulgaris* pokazali su protugljivičnu aktivnost protiv *B. cinereae* i *Rhizopus stolonifer*, dviju najrasprostranjenijih patogena jagoda koji se javljaju nakon berbe. (Bhaskara i sur., 1998.).

Istaživanja Reddy (1998.) te Feng i Zheng (2007.) pokazala su kako ulje timijana ima značajan negativni učinak na razvoj bolesti čiji su uzročnici gljive *B. cinerea, R. stolonifer*i *A. alternata* na jagodama i rajčici nakon berbe.

Reddy i sur. (1998.) su utvrdili da eterično ulje timijana smanjuje rast gljiva *B. cinerea* i *R. stolonifer* kao i njihovu sporulaciju.

3. Materijali i metode rada

Istraživanje je provedeno u laboratoriju Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku. U postavljenom pokusu (*in vitro*) ispitivan je utjecaj pH hranjive podloge, temperature i pet eteričnih ulja na porast micelija fitopatogene gljive *Botrytis cinerea.* U pokusu je korištena PDA hranjiva podloga pH vrijednosti 6,5 i pH 7,5. Temperature u pokusu tijekom istraživanja bile su 15°C, 22°C i 30°C.

3.1 Eterična ulja

U pokusu su korištena eterična ulja tvrtke Pranarôm International iz Belgije (slika 1). Korištena su eterična ulja anisa (*Pimpinella anisum* L.), timijana (*Thymus vulgaris* L.*),* metvice (*Mentha peperminta* L.), bijelog bora (*Pinus sylvestris* L.) te kadulje (*Slavia officinalis*L.).

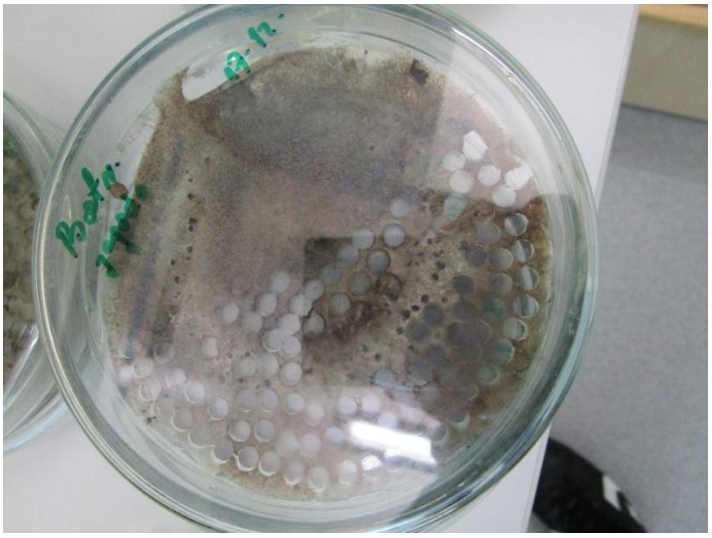
Glavna komponenta ulja anisa je anetol (83,5%), timijana timol (38,61%), te ρ-cimen (25,02%). Kod metvice glavna komponenta je manitol (41,06%), bijelog bora pinen (49,2%), te kod kadulje 1,8-cineol (33,27%).



Slika 1. Eterična ulja (foto Dino Klobučar)

3.2 Fitopatogena gljiva

U pokusu je korišten izolat gljive *Botrytis cinerea* s duhana Katedre za fitopatologiju. Gljiva je precijepljena za daljnje istraživanje na PDA podlogu (krumpir dekstrozni agar), pH 6,5 i pH 7,5 (slika 2).



Slika 2. Diskovi micelija *Botrytis cinerea* na PDA podlozi (foto Dino Klobučar)

3.3 Postavljanje pokusa

Ispitivanje utjecaja eteričnih ulja na porast gljive *Botrytis cinerea* obavljeno je u laboratoriju Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

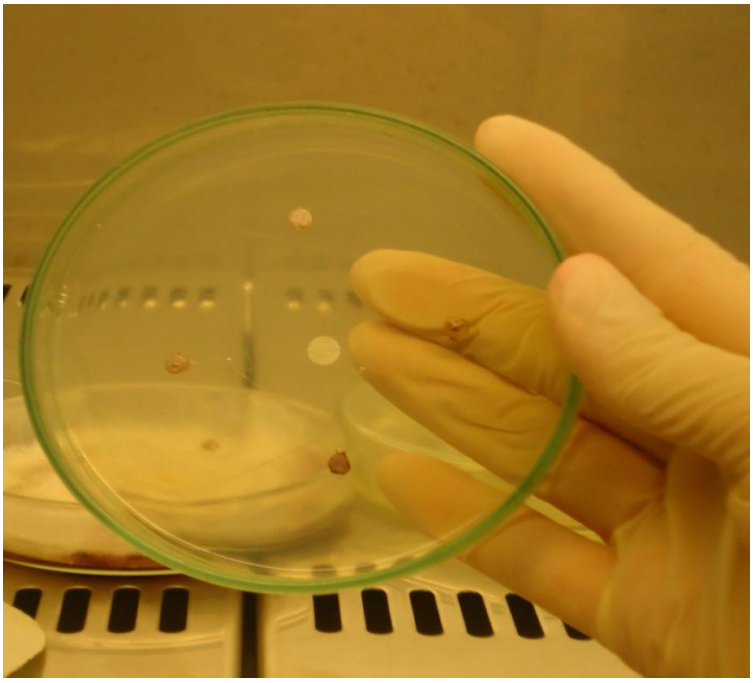
U pokusu su korištene Petrijeve zdjelice promjera 9 cm s pripremljenom PDA podlogom (krumpir dekstrozni agar). Prije pripreme hranjivog supstrata potrebno je sterilizirati Petrijeve zdjelice u koje će se pripremljena podloga razliti. Petrijeve zdjelice se zamotaju u papir i zatim tako pripremljene stavljaju u autoklav (uređaj za sterilizaciju vrućom vodenom parom). Sterilizacija staklenog posuđa obavlja se na temperaturi 121°C uz tlak 1,5 bar u trajanju 20 min. Nakon toga slijedi priprema hranjive podloge.

Krumpir dekstrozni agar gotova je smjesa za podlogu. Kako bismo dobili krutu pologu dodajemo tehnički agar. Smjesi dodajemo pola litre destilirane vode te sve to

stavljamo u tikvicu i kuhamo u vodenoj kupelji dok se ne rastopi. Zatim se uzima pH indikator i stavlja u podlogu. Da bismo podesili pH, u podlogu dodajemo 0,1 mol/l NaOH. Nakon podešavanja pH tikvica se zatvori, zamota u papir te se stavlja u autoklav 20 min na temperaturu od 121°C i tlak od 1,5 bara. Autoklav se isključi i čeka da tlak padne, autoklav se otvara, tikvica s podlogom vadi i ostavlja da se prohladi do 60°C. Nakon toga se dodaje antibiotik streptomicin kako bismo spriječili razvoj bakterija, ponovno se zatvori i protrese te se sadržaj razlijeva u ranije sterilizirane Petrijeve zdjelice.

Kada se PDA podloga ohladi, u sredinu svake Petrijeve zdjelice stavljen je kružni isječak filter papira promjera 5 mm koji je prethodno steriliziran u autoklavu.

Pomoću mikropipete na svaki je disk dodano 5 µl eteričnog ulja, odnosno destilirana voda u kontrolnoj varijanti. U svaku Petrijevu zdjelicu na četiri mjesta, koja su jednako udaljena od filter papira, sterilnom su iglom postavljeni diskovi micelija ispitivanih gljiva promjera 5 mm (slika 3).

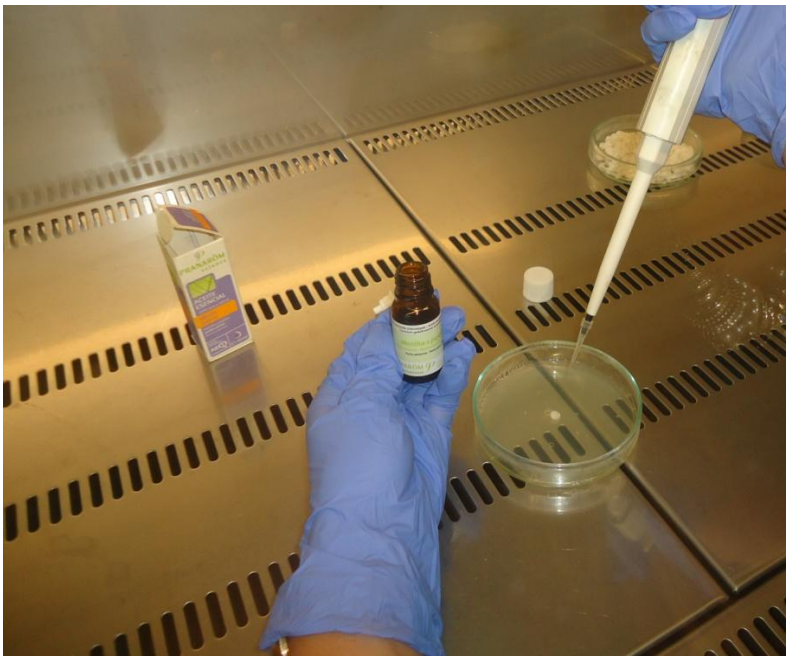


Slika 3. Postavljanje filter papira i diskova micelija (foto Dino Klobučar)

Pokus je postavljen u četiri ponavljanja. Precjepljivanje gljive na PDA podlogu i aplikacija eteričnih ulja je obavljena u komori za rad u sterilnim uvjetima (laminar) (slike 4 i 5).



Slika 4. Komora za rad u sterilnim uvjetima (foto Dino Klobučar)



Slika 5. Aplikacija eteričnog ulja na filter papir (foto Dino Klobučar)

Nakon precjepljivanja Petrijeve zdjelice stavljene su na inkubaciju u termostat komoru na tempeature predviđene planom pokusa(15°C, 22°C i 30°C).

Mjerenja su provedena četvrtog, sedmog i desetog dana od početka inkubacije. Mjeren je promjer micelija izražen u mm.

3.4 Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka provedena je analizom varijance (ANOVA) i najmanje signifikantne razlike (LSD) upotrebom programa SAS for Windowste koristeći Microsoft Excel.

4. Rezultati

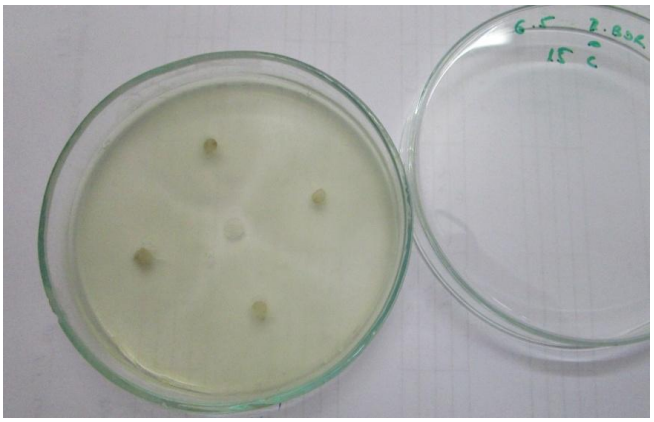
4.1 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i temperaturi 15°C

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA hranjivoj podlozi čiji je pH 6,5 i pri temperaturi od 15°C prikazan je Tablici 1.

Tablica 1. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 6,5; 15°C)

Eterična ulja	**4. dan**	**7. dan**	**10. dan**
Anis	**22,13**	**40,42**	**40,42**
Timijan	**0,75**	**2,17**	**9,75**
Menta	**36,85**	**40,42**	**40,42**
Bijeli bor	**38,17**	**41,25**	**41,25**
Kadulja	**36,17**	**41,65**	**41,65**
Kontrola	**37,30**	**40,70**	**40,70**
LSD 0,05 **LSD 0,01**	**9,58** **13,12**	**3,13** **4,30**	**7,40** **10,11**

Nakon četvrtog dana od inokulacije, dva (timijan i anis) od pet eteričnih ulja pokazala su značajno antifugalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea* u odnosu na kontrolnu varijantu te su statistički vrlo značajno negativno djelovala na razvoj micelija. Ulje timijana je i nakon 10 dana inkubacije djelovalo fungistatično odnosno gotovo je u potpunosti inhibiralo porast micelija ispitivane gljive. Za razliku od timijana ulje anisa sedmog i desetog dana od inokulacije nije statistički značajno inhibiralo porast micelija gljive. Antifungalni učinak eteričnog ulja timijana je bio statistički vrlo značajno bolji u odnosu na učinak svih ostalih ispitivanih ulja. Ulja mente, bijelog bora (slika 6) i kadulje nakon deset dana od inokulacije nisu statistički značajno utjecala na porast micelija ispitivane gljive.



Slika 6. Utjecaj eteričnog ulja bijelog bora na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* (foto Dino Klobučar)

4.2 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i temperaturi 22°C

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA hranjivoj podlozi čiji je pH 6,5 i pri temperaturi od 22°C prikazan je Tablici 2.

Tablica 2. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 6,5; 22°C)

Eterična ulja	**4. dan**	**7. dan**	**10. dan**
Anis	**0**	**16,60**	**17,25**
Timijan	**0**	**0**	**0**
Menta	**8,05**	**10,25**	**10,25**
Bijeli bor	**40,30**	**40,30**	**40,30**
Kadulja	**41,75**	**41,75**	**41,75**
Kontrola	**41,80**	**41,80**	**41,80**
LSD 0,05 **LSD 0,01**	**9,80** **13,43**	**15,75** **21,56**	**15,80** **21,61**

Prvi prvom mjerenju, odnosno četiri dana od inokulacije, ulja anisa, timijana i mente statistički vrlo značajno su utjecala na smanjenje rasta micelija gljive. Deset dana nakon inokulacije i dalje su navedena tri ulja imala statistički vrlo značajan negativni utjecaj na rast micelija s tim da je ulje timijana u potpunosti (100%) inhibiralo rast gljive te možemo reći da je pri ovim uvjetima uzgoja gljive ulje timijana imalo fungicidno djelovanje. Ulja bijelog bora i kadulje nisu imala antifugalno djelovanje na rast micelja gljive *Botrytis cinerea.*

4.3 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i temperaturi 30°C

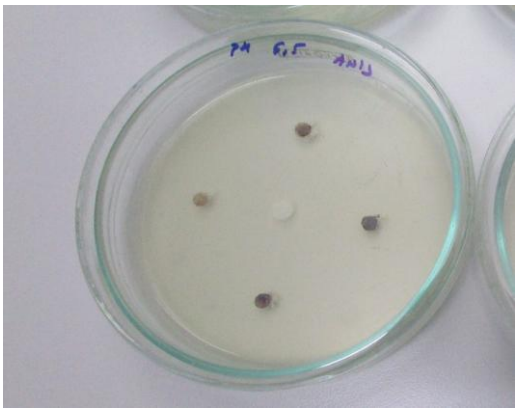
Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA hranjovoj podlozi čiji je pH 6,5 i pri temperaturi od 30°C prikazan je Tablici 3.

Tablica 3. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 6,5; 30°C)

Eterična ulja	**4. dan**	**7. dan**	**10. dan**
Anis	**0**	**0**	**0**
Timijan	**0**	**0**	**0**
Menta	**8,40**	**11,25**	**18,90**
Bijeli bor	**11,70**	**13,80**	**18,15**
Kadulja	**0**	**11,0**	**14,25**
Kontrola	**0**	**0**	**0**
LSD 0,05 **LSD 0,01**	**2,50** **3,40**	**1,60** **2,20**	**1,53** **2,10**

Pri temperaturi 30°C i pH podloge 6,5 micelij gljive *B. cinerea* se tijekom deset dana provođenja pokusa nije razvijao. Isti rezultat je utvrđen i za varijante pokusa s uljima anisa i timijana. U varijantama pokusa s eteričnim uljima mente, bijelog bora i kadulje

utvrđeno je da je porast micelija gljive statistički vrlo značajno bolji u odnosu na kontrolnu varijantu te možemo reći da su ulja djelovala stimulirajuće na porast gljive.



Slika 7. Utjecaj eteričnog ulja anisa na porast micelija gljive *Botrytis cinerea*(foto Dino Klobučar)

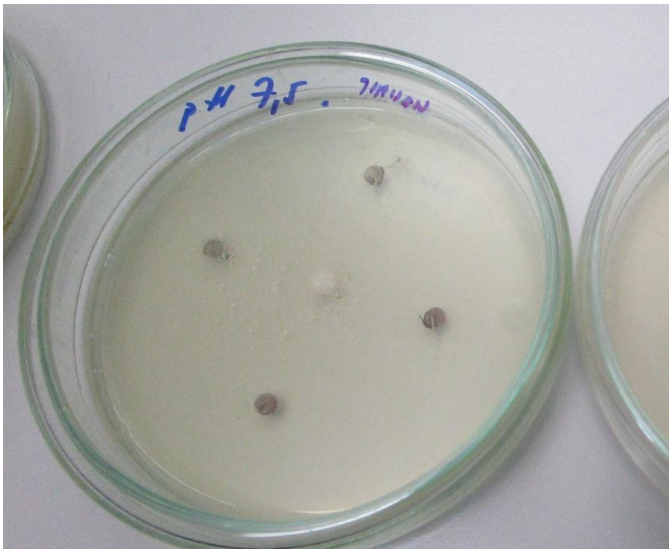
4.4 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 7,5 i temperaturi 15°C

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA hranjivoj podlozi čiji je pH 7,5 i pri temperaturi od 15°C prikazan je Tablici 4.

Tablica 4. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 7,5; 15°C)

Eterična ulja	**4. dan**	**7. dan**	**10. dan**
Anis	**34,00**	**39,20**	**39,50**
Timijan	**0**	**0**	**0**
Menta	**14,70**	**36,75**	**41,00**
Bijeli bor	**40,80**	**41,25**	**41,25**
Kadulja	**32,00**	**40,00**	**40,75**
Kontrola	**40,00**	**42,50**	**44,50**
LSD 0,05 **LSD 0,01**	**7,02** **9,61**	**6,55** **8,95**	**2,33** **3,20**

Pri temperaturi 15°C na PDA podlozi čiji je pH 7,5 četiri dana od inokulacije eterična ulja mente i timijana su statistički vrlo značajno negativno utjecala na rast micelija *B. cinerea* dok je ulje kadulje imalo statistički značajan negativan učinak na porast micelija iste gljive. Iako je ulje mente statistički vrlo značajno usporilo porast micelija do četvrtog dana od inokulacije, nakon sedmog i desetog dana od inokulacije utvrđeno je da ne postoje statistički značajne razlike u porastu micelija u odnosu na kontrolu. Ulje timijana (slika 8) je i u ovoj varijanti pokusa potpuno inhibiralo porast micelija, odnosno imalo je fungicidni učinak.



Slika 8. Utjecaj eteričnog ulja timijana na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* (foto Dino Klobučar)

4.5 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 7,5 i temperaturi 22°C

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA hranjivoj podlozi čiji je pH 7.5 i pri temperaturi od 22°C prikazan je Tablici 5.

Tablica 5. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 7,5; 22°C)

Eterična ulja	**4. dan**	**7. dan**	**10. dan**
Anis	**33,50**	**36,40**	**38,50**
Timijan	**6,80**	**14,40**	**20,00**
Menta	**18,00**	**41,00**	**41,00**
Bijeli bor	**36,00**	**40,25**	**40,25**
Kadulja	**38,40**	**41,05**	**41,05**
Kontrola	**42,00**	**42,00**	**42,00**
LSD 0,05 **LSD 0,01**	**6,35** **8,70**	**6,50** **8,90**	**8,20** **11,25**

Nakon četvrtog dana od inokulacije ulja timijana i mente su imala statistički vrlo značajno negativno djelovanje na porast micelija u odnosu na kontrolnu varijantu. Eterično ulje anisa je nakon četiri dana statistički značajno inhibiralo porast micelija u odnosu na kontrolu. Ulje timijana je i nakon drugog i trećeg mjerenja imalo statistički vrlo značajan negativni učinak na porast micelija *B. cinerea*.

4.6 Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 7,5 i temperaturi 30°C

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA hranjivoj podlozi čiji je pH 7,5 i pri temperaturi od 30°C prikazan je Tablici 6.

Tablica 6. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 7,5; 30°C)

Eterična ulja	**4. dan**	**7. dan**	**10. dan**
Anis	**8,40**	**9,80**	**9,80**
Timijan	**11,00**	**11,00**	**11,00**
Menta	**11,30**	**12,50**	**12,50**
Bijeli bor	**8,40**	**11,80**	**11,85**
Kadulja	**0**	**10,00**	**11,00**
Kontrola	**9,50**	**11,00**	**11,00**
LSD 0,05 **LSD 0,01**	**2,80** **3,85**	**2,50** **3,40**	**2,40** **3,30**

Pri temperaturi 30°C i pH 7,5 nijedno od 5 ispitivanih eteričnih ulja nije statistički značajno djelovalo (niti negativno niti pozitivno) na porast micelija gljive *B. cinerea*.

5. Rasprava

Prvo mjerenje porasta micelija gljive *Botrytis cinerea* praćeno je na PDA podlozi čiji je pH 6,5 i pri temperaturi od 15°C. Dva (timijan i anis) od pet eteričnih ulja pokazala su značajno antifugalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea* u odnosu na kontrolnu varijantu te su statistički vrlo značajno negativno djelovala na razvoj micelija. Tanović i sur. (2005.) su utvrdili utjecaj eteričnih ulja anisa, bijelog bora, bosiljka, naranče, cimeta, eukaliptusa, lavande, limuna, mente, ružmarina te timijana na porast *B. cinerea in vitro*. Utvrđeno je da sva eterična ulja djelomično ili potpuno inhibiraju rast micelija ove gljive. Najslabije inhibitorno djelovanje pokazalo ulje naranče i bijelog bora, dok su ulja timijana, cimeta, anisa potpuno inhibirala rast micelija.

Pri temperaturi od 22°C i pH 6,5 prvo mjerenje micelija je bilo nakon četiri dana od inokulacije, te je utvrđeno da ulja anisa, timijana i mente statistički vrlo značajno utječu na smanjenje rasta micelija gljive. Deset dana nakon inokulacije i dalje su navedena tri ulja imala statistički vrlo značajan negativni utjecaj na rast micelija s tim da je ulje timijana u potpunosti (100%) inhibiralo rast gljive te možemo reći da je pri ovim uvjetima uzgoja gljive ulje timijana imalo fungicidno djelovanje. Istaživanja Reddyja (1998.) te Fenga i Zhenga (2007.) pokazala su kako ulje timijana ima protugljivična svojstva u smanjenju rasta gljivičnih bolesti prouzročenih gljivama *B. cinerea, R. stolonifer*i *A. alternata*na jagodama i rajčici nakon berbe.

Bakr i Ahmed (1992.) su dokazali da temperatura od 20°C je najoptimalnija za razvoj micelija gljive *Botrytis cinerea*, a rast micelija potpuno izostaje na temperaturama od 5°C i 30°C. Također, svi izolati dobro su se razvijali na pH 4,5, ali rast micelija se postupno smanjivao porastom pH na 6,5.

Slično, Ahmed (2007.) dokazao je kako je *Botrytis cinerea* gljiva koja voli kiselu sredinu te je pH 5,5 pogodan za njen rast i sporulaciju.

Ulja bijelog bora i kadulje nisu imala antifugalno djelovanje na rast micelja gljive *Botrytis cinerea*pri temperaturi od 22°C i pH 6,5.

Eterična ulja kima (*Cuminum cyminum*), limunske trave (*C. citratus*), limunskog eukaliptusa (*Eucaliptus citriodora*), origana (*Origanum vulgare*) te timijana (*T. vulgaris*) inhibirala su rast gljive *Fusarium oxysporum* i to 62%, 66%, 57%, 70% odnosno 76%.

Ulje origana inhibitorno je djelovalo na rast micelija gljive *Botrytis cinerea* te *Pythium ultimum*, međutim mnoga druga eterična ulja kao što su lavnada *(Lavandula spica*), metvica (*Mentha piperita*), bor (*Pinus sylvestris*), ružmarin (*R. officinalis*), kadulja (*Salvia lavenduuifolia, Salvia sclarea*) nisu imali nikakav inhibitorni učinak na rast micelija ispitivanih gljiva (Lee i sur., 2007.).

Pri temperaturi 30°C i pH podloge 6,5 micelij gljive *B. cinerea* se tijekom deset dana provođenja pokusa nije razvijao.

Hosen i sur. (2010.) navode da je patogen *Botrytis cinerea* pokazao rast u rasponu temperatura od 5 do 30°C. Nikakav rast nije zabilježen pri temperaturi od 35°C, a usporedno najmanji rast je zabilježen na 5°C i 30°C.

Isti rezultat, odnosno ne razvijanje micelija je utvrđeno i za varijante pokusa s uljima anisa i timijana. U varijantama pokusa s eteričnim uljima mente, bijelog bora i kadulje utvrđeno je da je porast micelija gljive statistički vrlo značajno bolji u odnosu na kontrolnu varijantu te možemo reći da su ulja djelovala stimulirajuće na porast gljive.

Ulje timijana u varijanti pokusa gdje je temperatura bila 15°C i pH 7.5 je potpuno inhibiralo porast micelija, odnosno imalo je fungicidni učinak.

U literaturi se navodi niz istraživanja u kojima je testirano fungicidno djelovanje različitih eteričnih ulja. Ekstrakt iz cvjetnih pupoljaka klinčića pokazao je fungicidno djelovanje na *Alternaria sp., Fusarium sp., Botrytis sp. i Septoria sp.* (Soatthiamroong i sur., 2003). Učinkovito se pokazalo i ulje kadulje u suzbijanju *B. cinerea* (Carta i sur., 1996).

Na temperaturi 22°C i pH 7,5 eterično ulje anisa je nakon četiri dana statistički značajno inhibiralo porast micelija u odnosu na kontrolu. Ulje timijana je i nakon drugog i trećeg mjerenja imalo statistički vrlo značajan negativni učinak na porast micelija *B. cinerea*.

Utvrđen je utjecaj plinovite faze eteričnih ulja 18 vrsta biljaka (anisa, bergamota, bijelog bora, bosiljka, cimeta, eukaliptusa, geranija, klinčića, borovice, lavande, limuna, pitome metvice, komorača, naranča, ružmarina, timijana, čajnog drveta i bora na porast *B. cinerea in vitro.* Utvrđeno je da sva eterična ulja djelomično ili potpuno inhibiraju rast micelija navedenog patogena. Najslabije inhibitorno djelovanje pokazalo je ulje naranče i

bijelog bora, dok su ulja timijana, cimeta, anisa, geranija, metvice i komorača potpuno inhibirala porast micelija spomenutog patogena. Ulja bosiljka, komorača, cimeta i timijana djeluju fungicidno, dok su ulja geranija i metvice samo fungitoksična (Tanović i sur., 2005).

Pri temperaturi 30°C i pH 7,5 nijedno od 5 ispitivanih eteričnih ulja nije statistički značajno djelovalo na porast micelija gljive *B. cinerea*.

Ahmed (2007.) je dokazao kako je temperatura od 20°C najoptimalnija za razvoj micelija gljive *Botrytis cinerea*, a rast micelija potpuno izostaje na temperaturama od 5°C i 30°C. Također, svu izolati se se dobro razvijali na pH 4,5, ali rast micelija se postupno smanjivao porastom pH na 6,5.

6. Zaključak

Na temelju ispitivanja djelovanja eteričnih ulja anisa, timijana, mente, bijelog bora i kadulje na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pri kiselosti podloge 6,5 i 7,5 te pri temperaturama 15, 22 i 30°C može se zaključiti:

1. Na porast micelija značajan utjecaj imaju pH podloge i temperatura na kojoj gljiva raste.

2. Eterično ulje timijana ima najbolje fungistatično djelovanje na ispitivanu gljivu te u pet od šest varijanti pokusa ima statistički vrlo značajan negativni učinak na rast gljive u odnosu na kontrolu.

3. U varijanti pokusa gdje je temperatura na kojoj je gljiva rasla bila 30°C, a pH PDA podloge 6,5 gljiva u kontrolnoj varijanti te uz prisustvo ulja timijana i anisa nije rasla dok je porast gljive uz prisustvo ulja kadulje, mente i bijelog bora bio statistički značajno bolji u odnosu na kontrolu (ulja su imala stimulirajući učinak na rast gljive).

4. U varijanti pokusa gdje je pH podloge 7,5 i pri temperaturi inkubacije 30°C niti jedno eterično ulje nije imalo niti negativan niti pozitivan utjecaj na rast micelija u odnosu na kontrolu.

6. Popis literature

1. Ahmeda.u., Pande S., Basandrai A.K., Kishore G.K., Rao J.N. (2007.): Variation in isolates of *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold in chickpea. Bangla- desh J Agric Res 32(1): 135-143.

2. Amvam Zollo, P.H., Biyiti, L., Tchoumbougnang, T., Menut, C., Lamaty, G., Bouchet, Ph. (1998.): Aromatic Plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical Composition and Antifungal Activity of Thirteen Essential Oils from Aromatic Plants of Cameroon, Flavour and Fragrance Journal, 13: 107:114.

3. Anderson, J.P. (1924.): *Botrytis cinerea* in Alaska. Phytopathology, 14: 152-155.

4. Bakr M.A., Ahmed A.U.(1992.): Botrytis gray mold of chickpea in Bangladesh. In: Botrytis gray mold of chickpea (Haware M.P., Faris D.G., Gowda C.L.L., eds). Proc BARI/ICRISAT Working Group Meeting ICRISAT, Patancheru, AP, India, 10-12.

5. Bakr M.A., Rahman M.L. Ahmed A.U. (1997.): Research on botrytis gray mold of chickpea in Bangladesh. In: Recent advances in research on botrytis gray mold of chickpea (Haware M.P., Lenne J.M., Gowda C.L.L., eds). ICRISAT, Patancheru, AP, India. 15-18.

6. Beever, R.E., Weeds, P.L. (2004.): Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad Y., Williamson B. Tudzynski P., Delen N., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 29-52.

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. Commun Agric. Applied Biol. Sci., 71:1321-1326.

8. Bhaskara, R.M.V., Angers, A., Gosselin J.A.(1998.): Characteriaztion and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry, 47: 1515-1520.

9. 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.

10. Chardonnet, C.O., Sams, C.E., Trigiano, R.N., Conway, W.S.(2000.): Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology, 90: 769-774

11. Coley-Smith, J.R (1980.): *Sclerotia* and other structure in surviv- al. In: The Biology of *Botrytis* (Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R., eds.), Academic Press, London, UK, 85-114

12. Daferara, D., Zirgas, J., Polission, M., G. (2000.): GC-MS Analiysis of essential oil from some Greek aromatic plants and their fungitoxiciti on *Pencillium digitatum*. Laboratory of General Chemistry and Laboratory of Phytopathology, Agricultural University of Athens.

13. Dorman, H., J., D., Deans S., G. (2000.): Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88:308-316.

14. Droby, A., Lichter, A. (2004.): Post-harvest *Botrytis* infection: ethiology, development and Management. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control (Elad Y., Williamson B. Tudzynski P., Delen N., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 349-367.

15. Feng W., Zheng X. (2007.): Essential oils to control *Alternaria alternata in vitro* and *in vivo*. Food Control 18: 1126-1130.

16. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K., Brygoo, Y. (1999.): Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, transposa and vacuma, are found in sympatry on numerous host plants. Phytopathology, 89: 967-973

17. Groves, J.W., Drayton, F.L. (1939.): The perfect stage of *Botrytis cinerea*. Mycologia, 31: 485-489.

18. Hansen, H.N., Smith, R.E. (2004.): The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 22: 953-964, 1932. Holz, G., Coertze, S. and Williamson, B.: The ecology of Botrytis on plant surfaces. In: Botrytis: Biology, Pathology and Control. (Elad Y., Williamson B. Tudzynski P., Delen N., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 29-5.

19. Harris, R. (2002.): Progress with superficial mycoses using essential oils, International Journal of Aromatherapy, 12: 83-91.

20. Hosen, M. I., Ahmed, A. U., Islam, M. R. (2010.): Physiological variability and *in vitro* antifugal activity against *Botrytis cinerea* causing botrytis gray mold of chickpea (*Cicer aretinum* L.), Spanish Journal of Agricultural Research 2010 8(3), 750-756.

21. Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W. (2010.): Antifungal Activity of the Essential Oil of Illicium verum Fruit and Its Main Component trans-Anethole, Molecules, 15: 7558-7569.

22. Isman, M., B. (2000.): Plant essential oils for pestand disease management. Crop Protection, 19:603-608.

23. Jarvis, W.R. (1977.): *Botryotinia* and *Botrytis* species – taxonomy, physiology and pathogenicitiy. Monograph no. 15, Canada Department of Agriculture, Research Branch, Ottawa, Canada.

24. Katooli, N., Maghsodlo, R., Razavi, S.E. (2011.): Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi, Journal of Plant Breeding and Crop Science, 3(2): 41-43.

25. Kirbaşlar, F.G., Tavman, A., Dülger, B., Türker, G. (2009.): Antimicrobial Activity of Turkish Citrus Peel Oils, Pak. J. Bot., 41(6): 3207-3212.

26. Klokočar-Šmit, Z., Šovljanski, R., Inđić, D. (2006.): Biopreparati – alternativa u zaštiti plodovitog povrća. Biljni lekar, 34(1): 19-30.

27. Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C. (2007.): Antifungal Activity of Five Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi, Plant Pathol. J., 23(2): 97-102.

28. Lis-Balchin, M. (2006.): Aromatherapy Science: A guide for healthcare proffesionals, Pharmaceutical Press, London, UK, 297-327.

29. Maude, R.B. (1980.): Disease control. In: The Biology of Botrytis (Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R., eds.), Academic Press, London, 275-308.

30. Momin, R.A., Nair, M.G. (2001.): Mosquitocidal, nematicidal and antifungal compounds from Apium graveolens L, seeds. J. Agric. Food Chem., 49:142-145.

31. Orav, A., Raal, A., Arak, E. (2008.): Essential oil composition of Pimpinella anisum L. fruits from various European countries, Natural product research, 22(3): 227-232.

32. Pandey, R., Kalra A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N., Kumar, S. (2000.): Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. *J. Phtopathol*., 148: 501-502.

33. Pierozan, M.K., Pauletti, G.F., Rota, L., dos Santos, A.C.A., Lerin, L.A., Di Luccio, M., Mossi, A.J., Atti-Serafini, L., Cansian, R.L., Vladimir Oliveira, J. (2009.): Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of Salvia L. species, Ciênc. Tecnol. Aliment., 29(4): 764-770.

33. Reddy M.V.B., Angers P., Gosselin A., Aru l.J. (1998.): Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry 47: 1515-1520.

34. Rodrigues, V.M., Rosa, P.T.V., Marques, M.O.M., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A. (2003.): Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum L.)* Using CO2: Solubility, Kinetics, and Composition Data, J. Agric. Food Chem., 51(6): 1518-1523.

35. Salinas, J., Glandorf, D.C.M., Picavet, F.D., Verhoeff, K. (1989.): Effect of temperature, relative humidity and age of conid- ia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. Netherlands Journal of Plant Pathology, 95: 51-64.

36. Singh, G., Upadyay, R., K. (1993.): Essential oils: A potent source of natural pesticide. J Sci IndRes, 52:676-683.

37. Soatthiamroong, T., Jatisatienr, C.,.Supyen, D. (2003.): Antifungal activity of extract of Eugenia aromatica (L.) Baill (Myrtaccae) against some pathogenic molds. Acta Horticulturae, 597: 209-214.

38. Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V., van Griensven, L.J.L.D. (2009.): Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha Species* and Their Antifungal Activities, Molecules, 14: 238-249.

39. Soliman, K.M., Badeaa, R.I. (2002.): Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem. Toxicol., 40:1669-1675.

40. Staats, M., Van Barlen, P. and Van Kan, J.A.L. (2005.): Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus Botrytis and evolution of host specificity. Molecular Biology and Evolution, 22: 333-336.

41. Suhr, K.I., Nielsen, P.V. (2003.): Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi, Journal of Applied Microbiology, 94(4): 665-674.

42. 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.

43. Tanović, B., Ivanović, M. (2010.): Characterisation of *Botrytis cinerea* in Raspberry in Serbia. Book of Abstracts of XV International Botrytis Symposium, Cadiz, Spain, 47.

44. Tripathi, P., Dubey, N.K., Shukla, A.K. (2008.): Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 24(1): 39-46.

45. Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B. (1996.): Genetic variation and pathogenicity of *Botrytis cinerea.* Proefschrift Wageningen. Met lit. opg. Met samenvatting in het, Nederlands.

46. Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, I. (2007.): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8: 561-580.

47. Wilson, C.L., J.M. Solar, A. El-Ghaouth, M.E. Wisniewski, (1997.): Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis., 81: 204-210.

48. Yang, V.W., Clausen, C.A. (2007.): Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine, International Biodeterioration & Biodegradation, 59: 302-306.

49. Yunis, H. and Elad, Y. (1989.): Survival of *Botrytis cinerea* in plants during summer in Israel. Phytoparasitica, 17: 13-21.

50. Zafra, M., García-Peregrín, E. (1976): Seasonal variations in the composition of *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* twigs and needles essential oil, J. Agric. Food Chem., 86(1): 1-6.

7. Sažetak

U radu je ispitivan utjecaj pet eteričnih ulja (anis, timijan, menta, bijeli bor, kadulja) na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i pH 7,5 i temperaturama 15°C, 22ºC, 30ºC). Eterično ulje timijana imalo je najbolje antifungalno djelovanje. Navedeno ulje inhibiralo je rast micelija gljive *Botrytis cinerea*u pet varijanti pokusa. Ulja anisa i mente također imaju dobra inhibitorna svojstva. Ulja bijelog bora i kadulje nisu inhibirala porast micelija ispitivane gljive.

Ključne riječi: porast micelija, fitopatogena gljiva, eterična ulja, inhibicija

8. Summary

In this thesis effect of five essential oils (anise, thyme, mint, white pine, garden sage) on *Botrytis cinerea* mycelial growth, on PDA base of pH 6.5 and pH 7.5 upon incubation temperatures of 15°C, 22°C, 30°C, was evaluated. Essential oil of thyme has shown the best antifungal effect. Thyme oil inhibited growth of examined fungus *Botrytis cinerea*in five variants of conducted experiment. In addition, both anise and mint oils have shown high inhibitory effects. On the other hand, garden sage and white pine oils hadn't inhibit mycelial growth of examined fungus.

Key words: mycelial growth, plath pathogenic fungi, essential oils, inhibition

9. Popis slika

Slika 1: Eterična ulja (foto Dino Klobučar)..... 9

Slika 2: Diskovi micelija *Botrytis cinerea* na PDA podlozi (foto Dino Klobučar)..... 10

Slika 3: Postavljanje filter papira i diskova micelija (foto Dino Klobučar)..... 11

Slika 4: Komora za rad u sterilnim uvjetima (foto Dino Klobučar)..... 12

Slika 5: Aplikacija eteričnog ulja na filter papir (foto Dino Klobučar)..... 12

Slika 6: Utjecaj eteričnog ulja bijelog bora na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* (foto Dino Klobučar)..... 15

Slika 7: Utjecaj eteričnog ulja anisa na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* (foto Dino Klobučar)..... 17

Slika 8: Utjecaj eteričnog ulja timijana na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* (foto Dino Klobučar)..... 18

10. Popis tablica

Tablica 1. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 6,5; 15°C)..... 14

Tablica 2. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 6,5; 22°C)..... 15

Tablica 3. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 6,5; 30°C)..... 16

Tablica 4. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 7,5; 15°C)..... 17

Tablica 5. Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 7,5; 22°C)..... 19

Tablica 6: Porast micelija (mm) četvrti, sedmi i deseti dan na PDA podlozi (pH 7,5; 30°C)..... 20

TEMELJNA DOKUMENTACIJASKA KARTICA

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

Poljoprivredni faultet u Osijeku

Sveučilišni diplomki studij Povrćarstvo i cvjećarstvo

Rast gljive *Botrytis cinerea* u prisustvu eteričnih ulja

Dino Klobučar

Sažetak

U radu je ispitivan utjecaj pet eteričnih ulja (anis, timijan, menta, bijeli bor, kadulja) na porast micelija gljive *Botrytis cinerea* na PDA podlozi pH 6,5 i pH 7,5 i temperaturama 15°C, 22ºC, 30ºC). Eterično ulje timijana imalo je najbolje antifungalno djelovanje. Navedeno ulje inhibiralo je rast micelija gljive*Botrytis cinerea*u pet varijanti pokusa. Ulja anisa i mente također imaju dobra inhibitorna svojstva. Ulja bijelog bora i kadulje nisu inhibirala porast micelija ispitivane gljive.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

Mentor: Prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

Broj stranica: 34

Broj grafikona i slika: 8

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 50

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi:porast micelija, fitopatogena gljiva, eterična ulja, 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 Nada Parađiković, 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, Course Vegetable and Floriculture

Mycelial growth of *Botrytis cinerea* in the presence of essential oils

Dino Klobučar

Abstract:

In this thesis effect of five essential oils (anise, thyme, mint, white pine, garden sage) on *Botrytis cinerea* mycelial growth, on PDA base of pH 6.5 and pH 7.5 upon incubation temperatures of 15°C, 22°C, 30°C, was evaluated. Essential oil of thyme has shown the best antifungal effect. Thyme oil inhibited growth of examined fungus *Botrytis cinerea*in five variants of conducted experiment. In addition, both anise and mint oils have shown high inhibitory effects. On the other hand, garden sage and white pine oils hadn't inhibit mycelial growth of examined fungus.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: PhD Jasenka Ćosić, Full Professor

Number of pages: 34

Number of figures: 8

Number of tables: 6

Number of references: 50

Number of attachements:0

Orginal in: Croatian

Key words:mycelial growth, plath pathogenic fungi, essential oils, inhibition

Thesis defended on date:

Reviewers:

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

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