

# Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast fitopatogene gljive *Pyrenophora graminea*

---

Dujković, Angelina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:841505>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Angelina Dujković

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ TEMPERATURE I ETERIČNIH ULJA NA RAST FITOPATOGENE  
GLJIVE *Pyrenophora graminea***

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Angelina Dujković

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ TEMPERATURE I ETERIČNIH ULJA NA RAST FITOPATOGENE  
GLJIVE *Pyrenophora graminea***

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr.sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentor
3. prof. dr. sc. Renata Baličević, član

**Osijek, 2022.**

*Zahvaljujem mojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška  
i bili uz mene tijekom cijelog studiranja.*

*Ovaj rad posvećujem svome ocu.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	2
2.1. <i>Pyrenophora graminea</i> .....	2
2.2. Eterična ulja .....	5
3. MATERIJAL I METODE .....	8
3.1. Priprema PDA podloge .....	8
3.2. Eterična ulja .....	8
3.3. Postavljanje pokusa.....	8
4. REZULTATI .....	12
4.1. Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast micelija <i>P. graminea</i> četvrtog dana od inokulacije.....	12
4.2. Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast micelija <i>P. graminea</i> osmog dana od inokulacije.....	16
4.3. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama četvrtog dana od inokulacije.....	20
4.4. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama osmog dana od inokulacije .....	22
5. RASPRAVA.....	24
6. ZAKLJUČAK.....	27
7. POPIS LITERATURE.....	28
8. SAŽETAK .....	33
9. SUMMARY .....	34
10. POPIS TABLICA.....	35
11. POPIS SLIKA .....	36

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

Na globalnoj razini sve je veća potreba za hranom. Poljoprivredni se proizvođači susreću s različitim bolestima i štetnicima koji uzrokuju štete na poljoprivrednim usjevima koji se koriste kao sirovina za ljudsku prehranu. Biljne bolesti uzrokuju značajne gubitke prinosa. Pojavom različitih bolesti u usjevima, poljoprivredni proizvođači prvenstveno koriste različite fungicide kako bi ih suzbili i postigli što veći prinos. Učestala primjena fungicida može dovesti do rezistentnosti fitopatogenih gljiva, štetnog utjecaja na okoliš i zdravlje ljudi. Stoga se istražuju prikladne zamjene za kemijska sredstva. Bathis i sur. (2008.) navode da se u svijetu provode različita istraživanja s ciljem otkrivanja pesticida koji su ekološki prihvatljivi, nisu štetni za zdravlje ljudi i okoliš.

Eterična ulja bi se mogla koristiti za proizvodnju biofungicida. Potencijalno predstavljaju odgovarajuću zamjenu kemijskim fungicidima budući da posjeduju antifungalna, antivirusna i insekticidna svojstva (Bassolé i Juliani, 2012.). Eterična ulja sadrže dvije do tri glavne komponente u visokim koncentracijama, a ostali spojevi su u tragovima. Sadrže biološke spojeve koji nisu štetni za zdravlje ljudi i okoliš te su odgovarajuća zamjena kemijskim fungicidima (Nguefack i sur., 2013.). Palfi i sur. (2018.) navode da biološka aktivnost eteričnih ulja ovisi o različitim čimbenicima kao što su biljna vrsta, zemljopisni položaj, njihovom kemijskom sastavu, okolišnim uvjetima uzgoja te agrotehnici, primijenjenoj količini eteričnog ulja i vremenu inkubacije.

Različitim istraživanjima utvrđen je antifungalni učinak na različite fitopatogene gljive.

Cilj je ovoga rada ispitati utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast fitopatogene gljive *Pyrenophora graminea*.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. *Pyrenophora graminea*

*Pyrenophora graminea* je fitopatogena gljiva koja uzrokuje prugavost lista ječma (slika 1). Osim na ječmu javlja se i na pšenici, zobi i raži. Uzrokuje značajne gubitke prinosa (Alasić, 2009.), a postoje i podatci da ukoliko se sije vlastito sjeme gubici mogu biti i do 100% (Johnston i sur., 1982.). Štoviše, upotrebom zaraženog sjemena i smanjene učinkovitosti fungicida, patogen se učestalije javlja na ozimom ječmu (Alasić, 2009.).



Slika 1. Prugavost lista ječma (*P. graminea*)

Izvor: <https://agronomija.rs/2013/prugavost-lista-jecma-pyrenophora-graminea/>

Prvi simptomi se uočavaju na mladim listovima. Na početku se pojavljuju klorotične pruge između lisnih žila (Ćosić i sur., 2008.). Nadalje dolazi do nekroze tkiva te pruge potamne, a zatim do kidanja listova duž lisnih žila. Tijekom vlažnog vremena, na zaraženim listovima formira se obilje konidija koje dospijevaju na klas i inficiraju sjeme. Kod jačeg intenziteta bolesti može doći do sušenja biljke i razvoja sterilnih klasova (Tekauz i Chiko, 1980.). Alasić (2009.) navodi da zaraženi klasovi ostaju sitni, zrno je šturo, a dio klasova ostaje u rukavcu lista.

Prenosi se isključivo zaraženim sjemenom. Zaražena zrna se izgledom ne razlikuju od zdravog sjemena. Iz zaraženog sjemena razvijaju se sistemično zaražene biljke. Do zaraze ječma osobito dolazi ukoliko je temperatura tla tijekom klijanja sjemena niža od 12 °C (Faccini i sur., 2021.).

Micelij i konidije koje se nalaze na sjemenu mogu zadržati vitalnost i do 5 godina. U zrnu gljiva živi kao micelij koji se aktivira tijekom klijanja te zajedno s konidijama gljive inficiraja mlade biljčice i vrši sistemične zaraze (Jurković i sur., 2017.). Konidije kliju u začetak micelija, a taj začetak micelija može zaraziti mlado korijenje biljke. Zaraženo mlado korijenje biljke potamni, gubi sposobnost upijanja vode i hranjivih tvari te dolazi do propadanja biljke kao kod paleži klijanaca.

Prugavost lista ječma može se javiti u Europi, Sjevernoj Americi, sjevernoj Africi, Rusiji, Kini i Indiji budući da patogen pogoduje hladno i vlažno vrijeme za infekciju tijekom klijanja (Si i sur., 2020.). Patogen može izazvati ozbiljne gubitke prinosa ječma u područjima gdje se uzgaja (Zad i sur., 2002.). Porta-Puglia i sur. (1986.) navode da ova bolest uzrokuje značajno smanjenje prinosa ukoliko imamo visok udio zaraženog sjemena.

Visok postotak upotrebe tretiranog sjemena smanjio je pojavu patogena *P. graminea* prisutna je na ječmu u slabom intenzitetu dugi niz godina, ali bolest se i dalje može javiti ukoliko se koristi netretirano sjeme i ako se stvore povoljni okolišni uvjeti za razvoj bolesti (Nielsen, 2002.).

Faccini i sur. (2021.) proveli su istraživanje u kojem su ispitivali otpornost 206 europskih sorti jarog ječma na patogen *P. graminea*. Izolat *P. graminea* korišten je za umjetnu inokulaciju sorti jarog ječma kako bi se utvrdili novi izvori otpornosti na ovaj patogen. Istraživanje je pokazalo da u prosjeku starije sorte posjeduju veću otpornost na patogen od novijih sorti.

Ficsor i sur. (2014.) ispitali su pojavu *Pyrenophora* vrsta na ječmu, odnosno pojavu *Pyrenophora teres* i *Pyrenophora graminea* u četiri različite regije Mađarske u razdoblju od 2006. do 2010. godine. Ukupno su prikupljena 204 izolata iz ozimog i jarog ječma te listova pšenice, a određivanje vrste provedeno je PCR testiranjem specifičnim za određene vrste. Pri tome je utvrđeno da većina izolata pripada *P. teres*, dok samo 6% izolata pripada *P. graminea*. Znanstvenici ističu da svi izolati *P. graminea*, osim jednoga, potječu iz zapadnog dijela Mađarske, dok se izolati *P. teres* mogu pronaći u svakoj regiji.

Singh i sur. (2019.) navode da su uzročnici biljnih bolesti jedni od najvećih ograničenja globalne proizvodnje ječma. Također navode da su znanstvenici stavili fokus na molekularni pristup koji omogućava povećanje otpornosti na bolesti u kratkom vremenskom razdoblju.



Arabi i sur. (2020.) su pratili ekspresiju dva gena PAL i PR2 povezanih s obrambenim reakcijama kod otpornih i osjetljivih sorti ječma pomoću qPCR. Rezultati su pokazali da geni PAL i PR2 pozitivno reguliraju otpornost ječma na *P. teres* i *P. graminea* tijekom razvoja bolesti.

Kako bi se smanjila upotreba fungicida brojni znanstvenici i stručnjaci istražuju različite alternative za kemijske fungicide u borbi protiv biljnih bolesti.

Linkies i sur. (2020.) istraživali su fungicidni učinak sojeva koji pripadaju gljivičnom rodu *Chaetomium*. Pripadnici roda *Chaetomium* žive u tlu bogatom celulozom, ali su prisutni i na mnogim drugim mjestima u okolišu. Utvrđeno je da *Chaetomium globosum* ima poseban učinak protiv *Botrytis cinerea*, *Pyrenophora graminea* i *Bipolaris sorokiniana*, dok *C. cochliodes* i *C. aureum* imaju inhibitorni učinak na *Phytophthora infestans* i *Fusarium culmorum*. Određene vrste iz roda bi mogle biti korištene za biokontrolu biljnih patogena.

Arabi i sur. (2009.) navode da izlaganje konidija *P. graminea* sunčevoj svjetlosti može smanjiti njihovo klijanje. Konidije su bile izložene direktnoj sunčevoj svjetlosti i zasjenjenim uvjetima. Kod konidija koje su bile izložene svjetlu zabilježeno je značajno smanjenje klijavosti (60,6%) i rasta micelija (41,46%) u usporedbi s kontrolnom varijantom. Prema navedenom, izlaganje konidija svjetlosti smanjuje patogenost gljivica na različitim kulturama.

U ispitivanju Kumar i sur. (2019.) je korištenje biološkog načina suzbijanja *P. graminea* na ječmu pokazalo manju učinkovitost od kemijskog suzbijanja, ali *Trichoderma viride* i *T. harzianum* pokazale su vrlo dobar rezultat za razliku od ostalih testiranih bioloških agenasa.

## 2.2. Eterična ulja

Eterična ulja su hlapljive, aromatske tvari koje se dobivaju iz različitih biljnih dijelova (cvjetovi, pupoljci, sjeme, listovi, korijenje, grančice, kora, drvo, plodovi) (Tabassum i Vidyasagar, 2013.). Dobivaju se destilacijom vodenom parom, tještenjem ili ekstrakcijom.

Bakkali i sur. (2008.) navode da eterična ulja imaju široki spektar djelovanja odnosno da imaju baktericidno, fungicidno, virucidno, insketicidno i antiparazitsko djelovanje. Naročito se danas primjenjuju u farmaceutskoj, kozmetičkoj, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji. Pretežito se dobivaju destilacijom iz aromatičnih biljaka te sadrže hlapljive molekule terpene i terpenoide. Različiti fizikalno-kemijski testovi u *in vitro* uvjetima dokazuju da eterična ulja imaju antioksidativna svojstva. Smatra se da je poznato oko 3000 različitih eteričnih ulja od kojih samo njih 300 ima komercijalnu važnost.

Uz sve navedeno, eterična ulja sadrže različite sekundarne metabolite koji inhibiraju ili usporavaju rast bakterija, kvasaca i plijesni. Posebice djeluju na membranu i citoplazmu, a mogu i potpuno promijeniti morfologiju stanice (Nazzaro i sur., 2013.).

Potrošačima su kakvoća hrane i zdravlje postali jako bitne stavke posljednjih godina. Stoga potrošači pokazuju sve veći interes za eterična ulja i njihovu primjenu za konzerviranje hrane kao zamjenu za sintetičke konzervanse (Chouhan i sur., 2017.).

Prabuseenivasan i sur. (2006.) ispitivali su antibakterijski utjecaj 21 eteričnog ulja na 6 vrsta bakterija. Ispitivan je utjecaj eteričnih ulja na 4 gram-negativne bakterije (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) i 2 gram-pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*). Ulja su primjenjena u četiri različite koncentracije. Dobiveni rezultati pokazali su da 19 eteričnih ulja ima antibakterijsko djelovanje protiv jednog ili više sojeva. Prema tome, eterična ulja cimeta, klinčića, limuna, limete, naranče i ružmarina značajno su inhibirala rast bakterija, dok su eterična ulja anisa, eukaliptusa i kamfora imala najslabije inhibitorno djelovanje na ispitivane bakterije.

Eterična ulja cimeta, klinčića i ružmarina imaju antifungalni i antibakterijski učinak (Ouattara i sur., 1997.) kao i eterično ulje lavande (Cavanagh i Wilkinson, 2002.). De Billerbeck i sur. (2001.) navode da eterično ulje citronele inhibitorno djeluje na biorazgradnju i gljivice koje kontaminiraju skladišta.

Ulja koja sadrže visoke razine fenolnih spojeva kao što su karvakrol, eugenol i timol imaju najčešće antibakterijsko djelovanje (Lambert i sur., 2001.).

Barkaoui i sur. (2022.) su ispitivali antifungalno djelovanje četiri eterična ulja na porast micelija gljive *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. U pokusu su korištena eterična ulja kadulje (*Salvia officinalis*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), limunske trave (*Cymbopogon citratus*) i francuske lavande (*Lavandula dentate*) pri različitim koncentracijama (0,25%, 1% i 2,5%). Najbolje antifungalno djelovanje pokazalo je eterično ulje lavande pri koncentraciji od 2,5g/l i eterično ulje limunske trave pri koncentraciji od 1g/l. S druge strane ulja ružmarina i kadulje pokazala su najslabije antifungalno djelovanje na ispitivanu fitopatogenu gljivu.

Özcan i Chalchat (2006.) utvrdili su da različite koncentracije eteričnog ulja anisa imaju različito inhibitorno djelovanje na rast micelija gljiva *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus parasiticus*. Eterično ulje anisa je najbolje inhibitorno djelovalo na *A. parasiticus*, zatim na *A. niger* i *A. alternata*.

Posavac i sur. (2014.) ispitivali su antifungalni učinak jedanaest eteričnih ulja na porast patogena *Macrophomina phaseolina*. Najbolji antifungalni učinak imalo je eterično ulje timijana, dok su eterična ulja lavande, bora i gorke naranče imala slabiji antifungalni učinak na porast micelija gljive.

Provedeno je istraživanje u kojem se ispitivao antifungalni učinak eteričnih ulja pri različitim koncentracijama i njihovih komponenti na patogene *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* i *Colletotrichum coccodes*. Eterično ulje timijana imalo je najbolji učinak na sve fitopatogene gljivice, dok je ulje eukaliptusa i limuna imalo najslabiji antifungalni učinak. Dobiveni rezultati pokazali su da eterična ulja imaju bolji antifungalni učinak od njihovih komponenti na patogene (Palfi, 2017.)

Cilj je istraživanja Nakahara i sur. (2013.) bio utvrditi antifungalni učinak eteričnog ulja citronele i njegov kemijski sastav. Utvrđeno je da eterično ulje citronele značajno inhibira rast vrsta iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Eurotium*. Najaktivniji spojevi eteričnog ulja citronele su citronelal i linalol koji su u potpunosti inhibirali porast svih ispitivanih patogena.

Ispitano je antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih spojeva na porast micelija fitopatogene gljive *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladiole*. Eterična ulja primijenjena su u

količinama 100, 150, 200, 250 i 300 ppm. Eterična ulja *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris* i *Syzygium aromaticum* su potpuno inhibirala porast micelija gljive pri svim primijenjenim koncentracijama. S druge strane, eterična ulja *Allium sativum*, *Capsicum sp.*, *Ruta chalepensis* i *Eucalyptus globulus* nisu imala antifungalno djelovanje pri različitim koncentracijama (Barrera-Necha i sur., 2009.).

Sharma i sur. (2017.) ispitivali su antifungalno djelovanje eteričnih ulja na fitopatogenu gljivu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. U istraživanju su korištena eterična ulja klinčića (*Syzygium aromaticum*), limunske trave (*Cymbopogon citratus*), metvice (*Mentha piperita*) i eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*). Ulje klinčića je potpuno inhibiralo porast micelija i klijanje spora pri 125 ppm, dok su eterična ulja limunske trave, metvice i eukaliptusa imala inhibitorni učinak u relativno višim koncentracijama. Istraživanje je pokazalo da se ulje klinčića može koristiti za kontrolu patogena *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

U istraživanju Palfi i sur. (2018.) je ispitano antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*. Eterična ulja anisa, paprene metvice, bosiljka, ružmarina i lavande prave primjenjena su u različitim koncentracijama (3 $\mu$ L, 5 $\mu$ L, 7 $\mu$ L, 9 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 30 $\mu$ L, 50 $\mu$ L i 70 $\mu$ L). Eterična ulja anisa, paprene metvice, lavande prave, bosiljka i komponenta anetol su potpuno inhibirala porast micelija osmi dan od nacjepljivanja. Eterično ulje lavande nije potpuno inhibiralo porast micelija niti pri primjeni najvećih koncentracija petnaesti dan od nacjepljivanja.

Grgić i sur. (2016.) su utvrdili učinak 22 eterična ulja na porast micelija *Botrytis cinerea*. Eterična ulja su aplicirana u količinama 3, 5 i 7  $\mu$ L. Ulja gorke naranče, sandala i kamfora imala su stimulativan učinak na rast patogena, dok su ostala ulja pokazala antifungalno djelovanje. Najbolji inhibitorni učinak imala su ulja timijana i anisa u odnosu na kontrolu.

Različita istraživanja pokazuju da fungistatičan učinak ulja zavisi o sinergističkom djelovanju svih komponenata eteričnih ulja (Stefan i sur., 2013.).

Antifungalni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti eteričnog ulja, vrsti patogena te o koncentraciji primijenjenog eteričnog ulja (Park i sur., 2017.). Različita znanstvena istraživanja pokazuju da eterična ulja i njihove komponente imaju antibakterijska i antifungalna svojstva. Stoga postoje mogućnosti primjene eteričnih ulja kao biofungicida u zaštiti bilja od uzročnika bolesti.

### **3. MATERIJAL I METODE**

Pokus je postavljen u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek gdje je ispitan utjecaj temperature na rast micelija *Pyrenophora graminea* uz primjenu eteričnih ulja u količini 25 µL.

#### **3.1. Priprema PDA podloge**

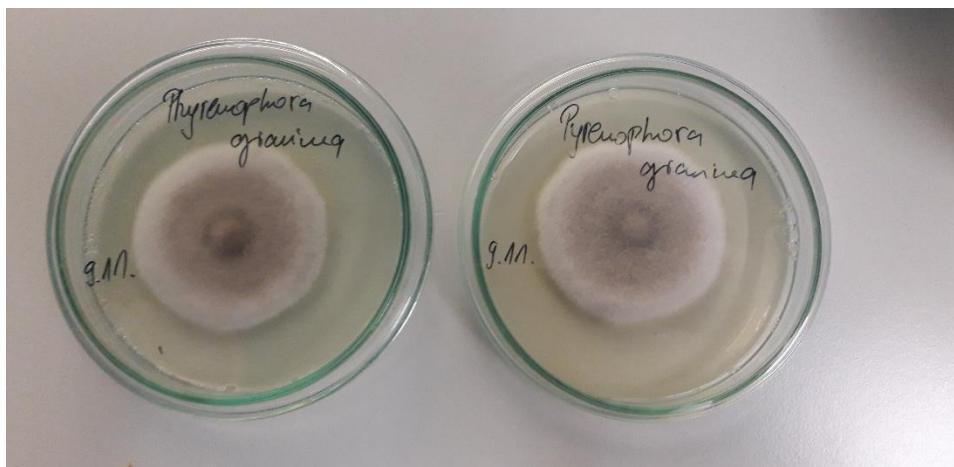
Na digitalnoj vagi odvažuju se potrebni sastojci za dobivanje hranjive podloge odnosno 21 g krumpir dekstroznog agara i 1,4 g tehničkog agara. Potom se u Erlenmeyerovu tikvicu dodaje 500 ml destilirane vode i odvagani sastojci. Hranjiva podloga se kuha jedan sat u vodenoj kupelji. Nadalje, potrebno je tikvicu zatvoriti aluminijskim čepom i umotati u papir te se stavlja u autoklav na sterilizaciju koja traje 20 minuta na temperaturi od 120 °C. Nakon sterilizacije, u tikvicu se dodaje pripremljena otopina 0,5 g antibiotika i 2 mL sterilne destilirane vode. Dobivena hranjiva podloga se izlijeva u sterilne Petrijeve zdjelice. Nakon što se dobivena hranjiva podloga ohladi, potrebno ju je staviti u hladnjak na čuvanje.

#### **3.2. Eterična ulja**

Za postavljanje pokusa bilo je potrebno 12 eteričnih ulja koja su se primijenila u količini 25 µL. Korištena su eterična ulja anisa (*Pimpinella anisum*), bora (*Pinus sylvestris*), cimeta kore (*Cinnamomum verum*), citronele (*Cymbopogon nardus*), čajevca (*Melaleuca alternifolia*), čempresa (*Cupressus sempervirens*), eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*), klinčića (*Syzygium aromaticum*), lavande (*Lavandula angustifolia*), naranče slatke (*Citrus sinensis*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*) i timijana (*Thymus vulgaris*).

#### **3.3. Postavljanje pokusa**

Pokus se postavlja u komori za rad u čistom ili laminaru. Prije postavljanja pokusa potrebno je sterilizirati radnu površinu u laminaru te pribor koji se koristi za postavljanje pokusa etilnim alkoholom. Na svakoj Petrijevoj zdjelici potrebno je naznačiti naziv gljive, datum postavljanja pokusa, naziv i koncentraciju eteričnih ulja, temperaturu i broj ponavljanja. U pokusu se koristi čista kultura gljive *Pyrenophora graminea* (Slika 2.)



Slika 2. Čista kultura fitopatigene gljive *Pyrenophora graminea*

Izvor: Dujković, A., 2021.

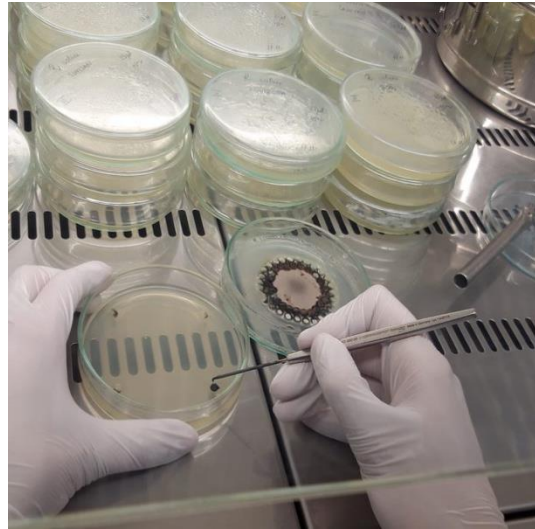
Čista kultura gljive buši se pomoću metalnog kružnog rezača uz sami rub Petrijeve zdjelice (Slika 3.). Zatim se pomoću laboratorijske igle uzimaju kružni isječki podloge s micelijem gljive koja se postavljaju na četiri jednako udaljena mjesta u Petrijevoj zdjelici (Slika 4.). Četiri diska podloge s micelijem gljive promjera 5mm se postavljaju nasuprotno uz rub zdjelice.

U sredinu Petrijeve zdjelice postavlja se kružni isječak sterilnog filter papira promjera 5mm. Eterična ulja se apliciraju pomoću pipete na sterilni filter papir u količini 25  $\mu$ L pomoću pipete. U kontrolnoj varijanti, u Petrijeve zdjelice se postavljaju četiri kružna isječka podloge s micelijem gljive te se na filter papir pomoću pipete aplicira sterilna destilirana voda umjesto eteričnog ulja.

Pokus se postavlja u tri ponavljanja. Nakon postavljanja pokusa, sve Petrijeve zdjelice stavljaju se u termostat komoru na temperature 15, 20 i 30 °C (Slika 5. i 6.).



Slika 3. Uzimanje diska podloge s razvijenom gljivom pomoću metalnog kružnog rezača  
Izvor: Dujković, A. (2021.)



Slika 4. Postavljanje 4 diska podloge s razvijenom gljivom pomoću laboratorijske igle  
Izvor: Dujković, A. (2021.)



Slika 5. Termostat komora

Izvor: Dujković, A. (2021.)



Slika 6. Postavljanje Petrijevih zdjelica u termostat komoru

Izvor: Dujković, A. (2021.)

Mjerenje zone inhibicije obavljeno je četvrtog i osmog dana nakon postavljanja pokusa. Zona inhibicije predstavlja prostor od micelija gljive do filter papira (Slika 7.). Mjeri se pomoću ravnala i dobiveni rezultati izraženi su u mm.

Nakon dobivenih rezultata računa se srednja vrijednost te se statistička obrada podataka obavlja se pomoću programa Statistica for Windows 10.



Slika 7. Mjerenje zone inhibicije

Izvor: Dujković, A. (2021.)



## 4. REZULTATI

### 4.1. Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast micelija *P. graminea* četvrtog dana od inokulacije

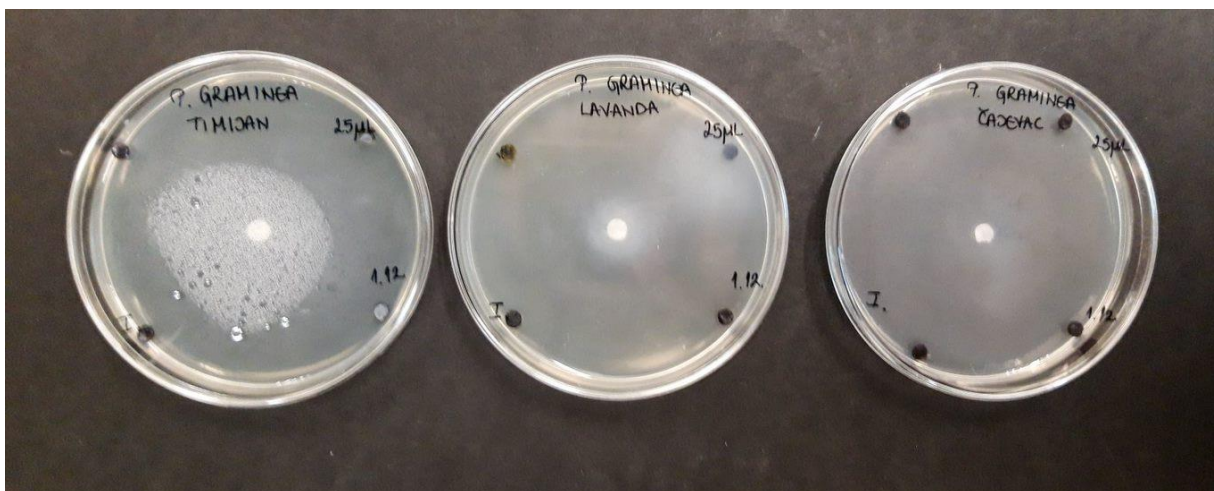
Nakon provedenog istraživanja, dobiveni rezultati su statistički obrađeni i prikazani u Tablici 1. U Tablici 1. prikazan je antifungalni učinak dvanaest eteričnih ulja koja su primijenjena u količini 25  $\mu$ L i utjecaj temperature na porast micelija gljive *P. graminea* četvrtog dana nakon nacjepljivanja.

Tablica 1. Fungistatični utjecaj eteričnih ulja (zona inhibicije u mm) pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea* četvrtog dana od inokulacije

ETERIČNA ULJA	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	30
BOR	21,91	21,75	20,17
CIMET KORA	29,08	28,75	29,42
CITRONELA	30	29	30
ČAJEVAC	30	30	22,25
ČEMPRES	24	20,83	28,25
EUKALIPTUS	24,58	20,58	20,33
KLINČIĆ	26,08	27,58	26,17
LAVANDA	30	28,58	30
NARANČA SLATKA	19,66	20,5	20,5
RUŽMARIN	27,5	26,33	25,08
TIMIJAN	30	30	30
LSD 0,05	1,70	1,52	2,09
0,01	2,30	2,06	2,83

Četvrtog dana od inokulacije pri temperaturi 15°C, potpuna inhibicija rasta gljive *P. graminea* utvrđena je za eterična ulja anisa, citronele, čajevca, lavande i timijana (Slika 8.). Navedena ulja

statistički vrlo značajno jače inhibiraju porast gljive u odnosu na ulja bora, čempresa, eukaliptusa, klinčića, naranče slatke i ružmarina. Najslabije djelovanje pri temperaturi od 15 °C imalo je eterično ulje naranče slatke koje je vrlo značajno slabije inhibiralo rast gljive u odnosu na sva ostala ulja izuzev ulja bora.

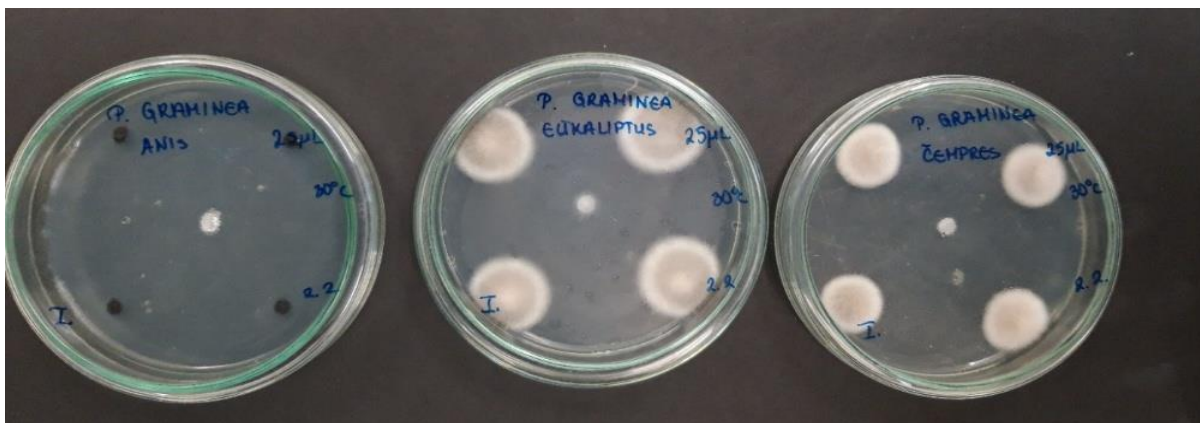


Slika 8. Antifungalni učinak eteričnih ulja timijana, lavande i čajevca pri 15 °C četvrtog dana inokulacije

Izvor: Dujković, A. (2021.)

Eterična ulja anisa, čajevca i timijana na temperaturi 20 °C potpuno su inhibirala porast micelija gljive. Navedena ulja statistički su značajno jače inhibirala rast micelija *P. graminea* u odnosu na sva ostala ulja izuzev ulja citronele i lavande. Između eteričnih ulja bora, čempresa, eukaliptusa i naranče slatke nema statistički značajnih razlika u djelovanju na porast micelija gljive pri temperaturi od 20 °C. Ujedno ova ulja su imala najslabije inhibitorno djelovanje na *P. graminea*.

Četvrtog dana od naciepljivanja na temperaturi 30 °C najjače inhibitorno djelovanje imala su eterična ulja anisa, citronele, lavande i timijana koja su potpuno inhibirala rast gljive. Eterična ulja bora, eukaliptusa i naranče slatke djelovala su najslabije i između njih nema statistički značajnih razlika u djelovanju. Na slici 9. prikazan je fungistatičan utjecaj eteričnih ulja anisa, eukaliptusa i čempresa na temperaturi 30 °C četvrtog dana od naciepljivanja.



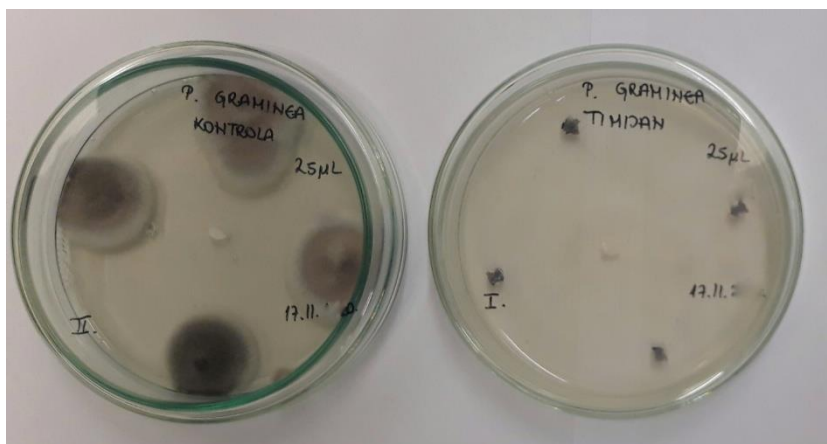
Slika 9. Antifungalni učinak eteričnih ulja anisa, eukaliptusa i čempresa na 30 °C četvrtog dana od inokulacije  
Izvor: Dujković, A. (2022.)

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *P. graminea* u odnosu na kontrolu prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Usporedba fungistatičnog utjecaja eteričnih ulja i kontrole pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea*

ETERIČNA ULJA	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	30
BOR	21,91	21,75	20,17
CIMET KORA	29,08	28,75	29,42
CITRONELA	30	29	30
ČAJEVAC	30	30	22,25
ČEMPRES	24	20,83	28,25
EUKALIPTUS	24,58	20,58	20,33
KLINČIĆ	26,08	27,58	26,17
LAVANDA	30	28,58	30
NARANČA SLATKA	19,66	20,5	20,5
RUŽMARIN	27,5	26,33	25,08
TIMIЈAN	30	30	30
KONTROLA	16	16	16
LSD 0,05	1,69	1,53	2,05
0,01	2,29	2,06	2,77

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su sva primijenjena eterična ulja pri temperaturama 15, 20 i 30 °C statistički vrlo značajno jače inhibirala rast gljive u usporedbi s kontrolom. Eterično ulje timijana je statistički vrlo značajno jače inhibiralo porast micelija gljive *P. graminea* u odnosu na kontrolu (Slika 10.).



Slika 10. Antifungalni učinak eteričnog ulja timijana na 20 °C četvrtog dana od inokulacije u odnosu na kontrolu

Izvor: Dujković, A. (2021.)

#### 4.2. Utjecaj temperature i eteričnih ulja na rast micelija *P. graminea* osmog dana od inokulacije

U tablici 3. prikazan je antifungalni učinak dvanaest eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea* osmog dana od nacjepljivanja.

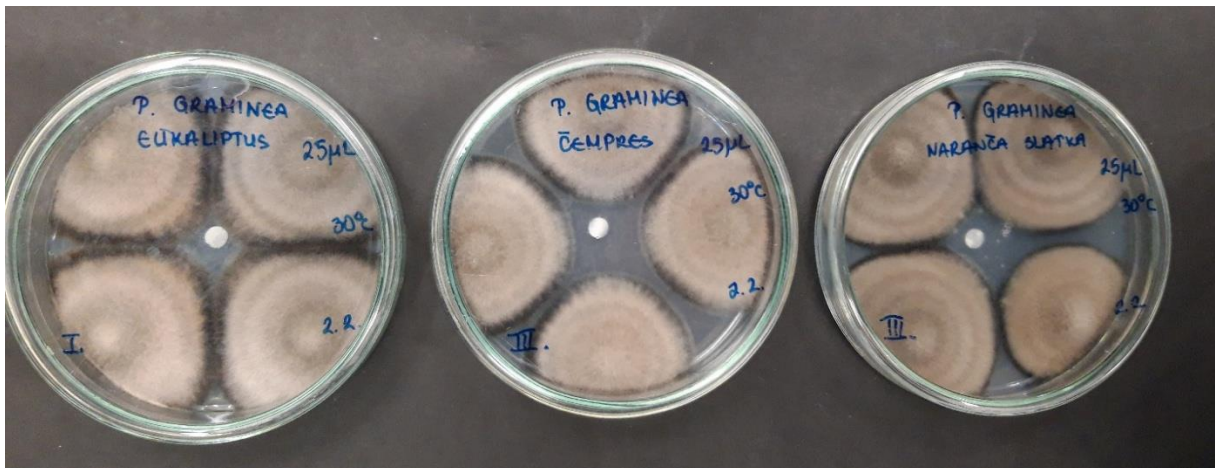
Tablica 3. Fungistatičan utjecaj eteričnih ulja (zona inhibicije u mm) pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea* osmog dana od inokulacije

ETERIČNA ULJA	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	28,83
BOR	5	6,67	5,92
CIMET KORA	26,08	25,75	27,75
CITRONELA	30	20,08	30
ČAJEVAC	29,5	27,42	21,25
ČEMPRES	10,42	7,25	4,75
EUKALIPTUS	8,58	5,67	3,17
KLINČIĆ	24,58	25,17	24,92
LAVANDA	29,67	15,08	14
NARANČA SLATKA	10,17	8,92	5,25
RUŽMARIN	13,5	12,33	8,67
TIMIJAN	30	30	30
LSD 0,05	2,44	6,89	6,87
0,01	3,30	9,34	9,31

Osam dana od inokulacije na temperaturi 15 °C potpuna inhibicija porasta gljive utvrđena je za ulja anisa, citronele i timijana. Iako ulja čajevca i lavande nisu potpuno inhibirala rast gljive razlike u zoni inhibicije između ovih ulja i ulja anisa, citronele i timijana nisu utvrđena. Preostala ulja statistički su vrlo značajno slabije djelovala u odnosu na prethodno navedenih pet ulja. Najslabiji inhibitorni učinak je imalo ulje bora i one je bio statistički vrlo značajno slabiji u odnosu na sva ostala ulja.

Osmog dana od inokulacije na 20 °C rast micelija potpuno su inhibirala ulja anisa i timijana. Između navedenih ulja i ulja cimeta kore, čajevca i klinčića nije bilo statistički značajnih razlika. Ulje eukaliptusa je najslabije inhibiralo rast *P. graminea*, a u djelovanju ovoga ulja i ulja bora, čempresa, naranče slatke i ružmarina nisu utvrđene značajne razlike.

Rezultati istraživanja pokazuju da su eterična ulja timijana i citronele potpuno inhibirala porast micelija gljive na 30 °C. Pored ulja timijana i citronele, jak antifungalni učinak su imala i ulja anisa, cimet kore i klinčića. Između svih navedenih ulja nema statistički značajnih razlika u fungistatičnom djelovanju. Nakon osam dana od inokulacije, najslabiji fungistatičan učinak je imalo ulje eukaliptusa, zatim čempres i naranče slatke (Slika 11.).



Slika 11. Antifungalni učinak ulja eukaliptusa, čempresa i naranče slatke na 30 °C osmog dana od inokulacije

Izvor: Dujković, A. (2022.)

Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *P. graminea* u odnosu na kontrolu prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Usporedba fungistatičnog utjecaja eteričnih ulja i kontrole pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea* osmog dana od inokulacije

ETERIČNA ULJA	15 °C	20 °C	30 °C
ANIS	30	30	28,83
BOR	5	6,67	5,92
CIMET KORA	26,08	25,75	27,75
CITRONELA	30	20,08	30
ČAJEVAC	29,5	27,42	21,25
ČEMPRES	10,42	7,25	4,75
EUKALIPTUS	8,58	5,67	3,17
KLINČIĆ	24,58	25,17	24,92
LAVANDA	29,67	15,08	14
NARANČA SLATKA	10,17	8,92	5,25
RUŽMARIN	13,5	12,33	8,67
TIMIJAN	30	30	30
KONTROLA	2,42	2,42	2,42
LSD 0,05	<b>2,34</b>	<b>6,60</b>	<b>6,51</b>
0,01	<b>3,17</b>	<b>8,92</b>	<b>8,80</b>

Sva eterična ulja, osim eteričnog ulja bora, pri temperaturi od 15 °C statistički su imala vrlo značajno jače antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu.

Osam dana od inokulacije na temperaturi 20 °C utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika u djelovanju na porast gljive između ulja bora, čempresa, eukaliptusa, naranče slatke i kontrole (Slika 12.). Sva druga ispitivana eterična ulja su statistički vrlo značajno jače djelovala na porast micelija *P. graminea* u odnosu na kontrolu.



Slika 12. Antifungalni učinak ulja naranče slatke i bora na 20 °C osmog dana od inokulacije u odnosu na kontrolu

Izvor: Dujković, A. (2021.)

Prema dobivenim rezultatima eterična ulja anisa, cimet kore, citronele, čajevca, klinčića, lavande i timijana statistički su vrlo značajno jače inhibirali rast micelija u odnosu na kontrolu pri temperaturi 30 °C. S druge strane, između ostalih primijenjenih eteričnih ulja i kontrole nema statistički značajnih razlika u djelovanju pri 30 °C.



### 4.3. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama četvrtog dana od inokulacije

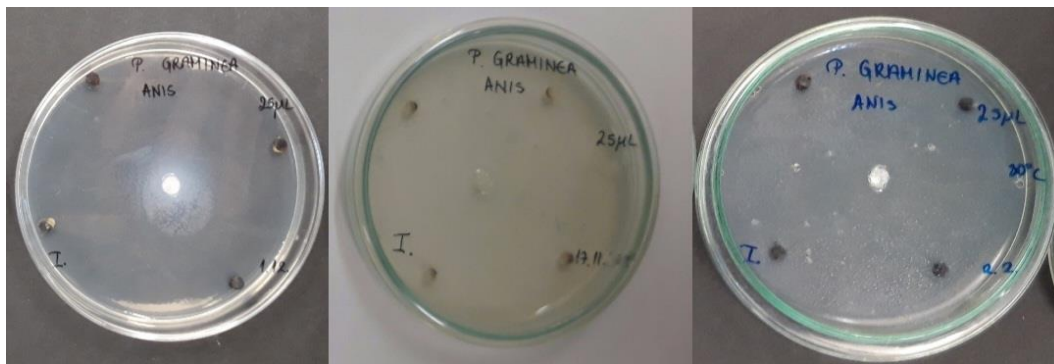
U tablici 5. prikazan je antifungalni učinak pojedinih eteričnih ulja ovisno o temperaturi na porast micelija gljive *Pyrenophora graminea*.

Tablica 5. Utjecaj temperatura na antifungalni učinak eteričnih ulja četvrtog dana od inokulacije

ETERIČNA ULJA	15 °C	20 °C	30 °C	LSD 0,05 0,01
ANIS	30	30	30	0,00 0,00
BOR	21,91	21,75	20,17	1,25 1,89
CIMET KORA	29,08	28,75	29,42	1,03 1,55
CITRONELA	30	29	30	1,99 3,03
ČAJEVAC	30	30	22,25	2,56 3,88
ČEMPRES	24	20,83	28,25	4,30 6,51
EUKALIPTUS	24,58	20,58	20,33	2,98 4,52
KLINČIĆ	26,08	27,58	26,17	1,58 2,39
LAVANDA	30	28,58	30	2,13 3,22
NARANČA SLATKA	19,66	20,5	20,5	0,93 1,40
RUŽMARIN	27,5	26,33	25,08	2,30 3,49
TIMIЈAN	30	30	30	0,00 0,00

U mjerenju provedenom četvrtog dana nakon inokulacije potpuna inhibicija rasta gljive utvrđena je za eterična ulja anisa (Slika 13.) i timijana pri svim temperaturama. Za ulja anisa,

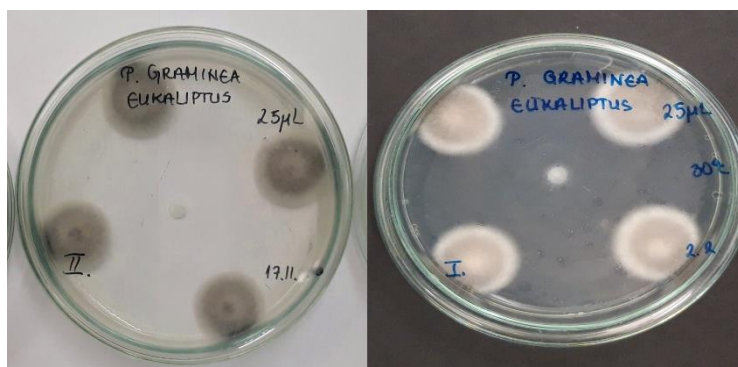
cimeta kore, citronele, klinčića, lavande i naranče slatke kao i za prethodna dva ulja nisu utvrđene značajne razlike u djelovanju na različitim temperaturama.



Slika 13. Fungistatični učinak eteričnog ulja anisa na 15, 20 i 30 °C četvrtog dana od inokulacije  
Izvor: Dujković, A. (2021.)

Eterično ulje čajevca pri 30 °C statistički je vrlo značajno slabije inhibitorno djelovalo u odnosu na djelovanje na temperaturama 15 i 20 °C. Nadalje, ulje čempresa je pri 30 °C statistički vrlo značajno jače fungistatično djelovalo u odnosu na 20 °C te je pokazalo najslabije antifungalno djelovanje pri 20 °C.

Eterično ulje eukaliptusa je pri 15 °C statistički značajno jače inhibiralo porast micelija u odnosu na temperature 20 i 30 °C, dok između temperatura 20 i 30 °C nema statistički značajnih razlika u fungistatičnom učinku (Slika 14.).



Slika 14. Inhibitorni učinak eteričnog ulja eukaliptusa na 20 i 30 °C četvrtog dana od inokulacije  
Izvor: Dujković, A. (2021.)

#### 4.4. Usporedba eteričnih ulja po temperaturama osmog dana od inokulacije

U tablici 6. prikazani su rezultati mjerenja zone inhibicije provedenog osmog dana nakon naciepljivanja te utjecaj temperature na fungistatični učinak eteričnih ulja

Tablica 6. Utjecaj temperatura na antifungalni učinak eteričnih ulja osmog dana od inokulacije

<b>ETERIČNA ULJA</b>	<b>15 °C</b>	<b>20 °C</b>	<b>30 °C</b>	<b>LSD 0,05 0,01</b>
<b>ANIS</b>	30	30	28,83	2,33 3,53
<b>BOR</b>	5	6,67	5,92	1,28 1,94
<b>CIMET KORA</b>	26,08	25,75	27,75	3,06 4,63
<b>CITRONELA</b>	30	20,08	30	12,17 18,43
<b>ČAJEVAC</b>	29,5	27,42	21,25	14,30 21,67
<b>ČEMPRES</b>	10,42	7,25	4,75	1,79 2,70
<b>EUKALIPTUS</b>	8,58	5,67	3,17	4,05 6,13
<b>KLINČIĆ</b>	24,58	25,17	24,92	3,11 4,71
<b>LAVANDA</b>	29,67	15,08	14	12,23 18,53
<b>NARANČA SLATKA</b>	10,17	8,92	5,25	1,28 1,94
<b>RUŽMARIN</b>	13,5	12,33	8,67	4,02 6,09
<b>TIMIЈAN</b>	30	30	30	0,00 0,00

Eterično ulje timijana potpuno je inhibiralo rast gljive na svim temperaturama nakon osam od naciepljivanja (Slika 15.). Statistički značajne razlike u djelovanju ulja na različitim

temperaturama nisu utvrđene, osim za timijan, niti za ulja anisa, bora, cimeta kore, citronele, čajevca, klinčića i lavande.



Slika 15. Inhibitorni učinak ulja timijana na 15, 20 i 30 °C osmog dana od inokulacije

Izvor: Dujković, A. (2021.)

Ulje naranče slatke statistički je značajno jače inhibiralo porast micelija na temperaturi 15 °C u odnosu na djelovanje pri temperaturi 30 °C (Slika 16.).



Slika 16. Antifungalni utjecaj ulja naranče slatke na 15, 20 i 30 °C osmog dana od inokulacije

Izvor: Dujković, A. (2021.)

## 5. RASPRAVA

Antifungalni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti i sastavu eteričnog ulja, vrsti gljive, količini ulja koja se primjenjuje, načinu primjene (kontaktno ili volatilno), temperaturi i dužini trajanja inkubacije (Ćosić i sur., 2014.).

Najjači fungistatični učinak na porast micelija *P. graminea* pokazalo je eterično ulje timijana pri svim temperaturama. Ovo je ulje potpuno inhibiralo porast ispitivane gljive na svim temperaturama četvrtog i osmog dana nakon naciepljivanja. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja.

Zambonelli i sur. (1996.) provodili su istraživanje antifungalnog učinka eteričnog ulja timijana, lavande i paprene metvice na fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* var. *ultimum*, *Fusarium solani* i *Colletotrichum lindemuthianum*. Rezultati istraživanja pokazali su da eterično ulje timijana ima najbolji antifungalni učinak. Dobri rezultati inhibitornog djelovanja timijana pripisani su timolu kojeg je ulje sadržavalo u koncentraciji od 50,06%.

Amini i sur. (2012.) ispitivali su antifungalno djelovanje eteričnih ulja *Thymus vulgaris*, *Thymus kotschyanus* i *Zataria multiflora* na fitopatogene gljive *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Prema provedenom istraživanju sve tri vrste eteričnih ulja primijenjene u količini od 200  $\mu\text{L/L}$  su potpuno inhibirale rast micelija gljivica. Autori također navode da su minimalna inhibitorna koncentracija i minimalna fungicidna koncentracija ovisile o vrsti gljive te su tako *S. sclerotiorum* i *P. aphanidermatum* osjetljive na istraživana ulja od *R. solani* i *F. graminearum*.

Pored eteričnog ulja timijana, u našem istraživanju, jak antifungalni učinak su pokazala eterična ulja anisa i citronele četvrtog i osmog dana nakon inokulacije pri svim temperaturama.

Najbolji antifungalni učinak eteričnog ulja timijana, cimeta i anisa utvrđen je u ispitivanju 18 eteričnih ulja na rast *B. cinerea* (Tanović i sur., 2005.). Petrić i sur. (2021.) ispitivali su utjecaj devet eteričnih ulja na zemljišne patogene *Globisporangium ultimum* i *Globisporangium irregulare*. Utvrđeno je da su najjači antifungalni učinak na *G. ultimum* imala ulja anisa, citronele, cimet kore i klinčića, a na *G. irregulare* ulje klinčića. Ulje anisa imalo je statistički značajno jače supresivno djelovanje na *G. ultimum* pri primjeni 30  $\mu\text{L}$  (najveća primijenjena količina) u odnosu na ostale primijenjene količine.

Grgić i sur. (2016.) ispitivali su utjecaj 22 eterična ulja na porast micelija *B. cinerea*. Sva ispitivana eterična ulja su primijenjena u tri koncentracije 3, 5 i 7  $\mu\text{L}$ , a rast micelija je mjereno trećeg i devetog dana nakon inokulacije. Utvrđeno je da najjače antifungalno djelovanje imaju ulja anisa i timijana u odnosu na kontrolu. Behdani i sur. (2012.) proučavali su djelovanje 13 eteričnih ulja na *B. cinerea* te utvrdili da eterično ulje anisa u svim primijenjenim količinama ima najbolji inhibitorski učinak.

Najslabiji inhibitorski učinak četvrtog dana nakon inokulacije utvrđen je kod ulja naranče slatke pri svim temperaturama, a zatim kod eteričnog ulja bora i eukaliptusa. Osmog dana najslabiji učinak je imalo eterično ulje bora, zatim ulje eukaliptusa i naranče slatke pri svim temperaturama.

U istraživanju koje su proveli Palfi i sur. (2019.) je utvrđeno da eterična ulja eukaliptusa i limuna imaju najslabije supresivno djelovanje na *F. oxysporum* i *B. cinerea*.

Lee i sur. (2007.) proveli su ispitivanje s pet vrsta fitopatogenih gljiva (*B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani*). Ispitan je utjecaj 39 različitih eteričnih ulja na fitopatogene gljive. Eterično ulje naranče slatke nije imalo antifungalno djelovanje na ispitivane gljive. Također, Tanović i sur. (2005.) utvrdili su najslabiji fungistatski učinak eteričnog ulja bijelog bora i naranče na porast micelija *B. cinerea*

S druge strane, u istraživanju koje su proveli Khetabi i sur. (2021.) gdje su ispitivali utjecaj devet eteričnih ulja na rast micelija *Monilinia laxa* i *Monilinia fructigena* utvrđeno je značajno antifungalno djelovanje svih eteričnih ulja, između ostalog i naranče slatke. Najveću antifungalnu aktivnost su imala pri koncentraciji od 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Ulja timijana, naranče slatke, gorke naranče i klinčića pokazala su veći antifungalni potencijal za obe fitopatogene gljive u odnosu na preostala eterična ulja.

U ovome je istraživanju ulje eukaliptusa najslabije djelovalo, ali s druge strane ulje eukaliptusa imalo je jako inhibitorsko djelovanje na porast micelija *B. cinerea* (Lee i sur., 2007.).

U istraživanju koje su proveli Petrić i sur. (2021.) također se navodi da su najslabiji fungistatski utjecaj na zemljišne patogene *G. ultimum* i *G. irregulare* imala eterična ulja bora i čempresa u svim primijenjenim koncentracijama. U našem provedenom ispitivanju, eterično ulje čempresa

je pokazalo slabije antifungalno djelovanje pri svim temperaturama osmog dana nakon inokulacije.

Terzi i sur. (2007.) proučavali su utjecaj eteričnog ulja čajevca i njegovih glavnih komponenti na porast micelija četiri fitopatogene gljive (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Pyrenophora graminea* i *Blumeria graminis*). Prema njihovim navodima, pojedine komponente čajevca jače inhibiraju porast micelija odnosno terpinen-4-ol potpuno inhibira rast micelija *F. graminearum*, *F. culmorum* i *P. graminea*. S druge strane, u ovome istraživanju eterično ulje čajevca je potpuno inhibiralo porast micelija četvrtog dana nakon inokulacije samo pri temperaturama 15 i 20 °C. Međutim osmog dana nakon inokulacije je ulje čajevca slabije inhibiralo porast micelija s povećanjem temperature.

S obzirom na rezultate provedenog istraživanja ustanovljen je značajan utjecaj vrste primijenjenog eteričnog ulja i temperature na rast gljive *P. graminea*. S povećanjem temperature pojedina eterična ulja kao što su ulje čajevca, čempresa, eukaliptusa, lavande, naranče slatke i ružmarina pokazala su slabiji antifungalni učinak osmog dana nakon inokulacije. Drugim riječima, ulja su pokazala jači antifungalni učinak pri 15 °C u odnosu na temperature 20 i 30 °C.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog znanstvenog istraživanja utjecaja temperature i dvanaest eteričnih ulja na porast micelija *P. graminea* može se zaključiti da su različita eterična ulja imala različito antifungalno djelovanje, odnosno da inhibitorno djelovanje ovisi o vrsti eteričnog ulja. Također, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da na inhibitorno djelovanje eteričnih ulja ima utjecaj i temperatura. Povećanjem temperature kod ulja slatke naranče smanjio se antifungalni učinak, kod nekih ulja ostaje isti (timijan), a kod nekih ulja nismo utvrdili razlike u djelovanju na različitim temperaturama. Antifungalni učinak eteričnih ulja ovisi i o dužini inkubacije. U pravilu se učinak ulja smanjuje s produljenjem trajanja inkubacije (na primjer bor i eukaliptus), a kod nekih ostaje isti (timijan).

Eterično ulje timijana pokazalo je najveći stupanj antifungalnog djelovanja, zatim slijede ulje anisa i citronele i to pri svim temperaturama. S druge strane, eterična ulja bora, eukaliptusa i naranče slatke imala su najslabiji antifungalni učinak pri svim temperaturama na porast micelija gljive *P. graminea*.

Provedeno istraživanje je u skladu s drugim istraživanjima te dobiveni rezultati potvrđuju potrebu za daljnjim ispitivanjima antifungalnog učinka eteričnih ulja. Budući da sve veća primjena pesticida u zaštiti bilja ima negativan utjecaj na zdravlje ljudi i okoliš potrebno je pronaći pogodne zamjene za sintetske pripravke. Razvoj biofungicida predstavlja dobru alternativu za kemijska sredstva.



## 7. POPIS LITERATURE

1. Alasić, V. (2009.): Najznačajniji bolesti i štetnici strnih žitarica (pšenice i ječma) u 2008./2009. godini na području Brodsko-posavske županije. Glasnik zaštite bilja, 5: 44-51.
2. Amini, M, Safaie, N, Salmani, 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. Arabi, M. I. E., Al-Shehadah, E., Jawhar, M. (2009.): Viability of *Pyrenophora graminea* cultures after sunlight exposure under field conditions. Journal of Plant Pathology, 91(2): 299-302.
4. Arabi, M. I. E., Alek, H., Jawhar, M., Al-Shehadah, E. (2020.): Expression of *PAL* and *PR2* pathogenesis related genes in barley plants challenged with closely related *Pyrenophora* species. Cereal Research Communications, 48: 211-216.
5. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008.): Biological effects of essential oils – A review, Food and Chemical Toxicology, 46(2): 446-475.
6. Barkaoui, H., Chafik, Z., Benabbas, R., Chetouani, M, El Mimouni, M., Hariri, M. (2022.): Antifungal activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Cymbopogon citratus* against the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp.*Albedinis*. Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 8(1): 108-133.
7. Barrera-Necha, L. L., Garduno-Pizana, C., Garcia-Barrera, L. J. (2009.): In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (massey) snyder and hansen. Plant Pathology Journal, 8(1): 17-21.
8. Bassolé, I. H. N., Juliani, H. R. (2012.): Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, 17(4): 3989-4006.
9. Bathis, D. R., Harminder, P. S., Ravinder, K. K., Shalinder, K. (2008.): Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecology and Management, 256: 2166-2174.
10. Behdani, M., Pooyan, M., Abbasi, S. (2012.): Evaluation of antifungal activity of some medicinal plants essential oils against *Botrytis cinerea*, causal agent of postharvest apple rot, in vitro. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4(14): 1012-1016.

11. Cavanagh, H. M., Wilkinson, J. M. (2002.): Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res.*, 16: 301-308.
12. Chouhan, S., Sharma, K., Guleria, S. (2017.): Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4: 58.
13. Ćosić, J., Ivezić, M., Štefanić, E., Šamota, D., Kalinović, I., Rozman, V., Ranogajec, Lj. (2008.): Najznačajniji štetnici, bolesti i korovi u ratarskoj proizvodnji, Poljoprivredni fakultet Osijek, 64.
14. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D. (2014.): The Effect of Essential Oils on the Development of Phytopathogenic Fungi. U knjizi Sharma N. i sur. „Biological Controls for Preventing Food Deterioration – Strategies for Pre- and Postharvest Management“, 273-292. Wiley Blackwell, UK.
15. De Billerbeck, V.G., Roques, C. G., Bessiere, J. M., Fonvieille, J. L., Dargent, R. (2001.): Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol.*, 47: 9-17.
16. El Khetabi, A., Ezrari, S., El Ghadraoui, L., Tahiri, A., Ait Haddou, L., Belabess, Z., Merah, O., Lahlali, R. (2021.): In Vitro and In Vivo Antifungal Activities of Nine Commercial Essential Oils against Brown Rot in Apples. *Horticulturae*, 7: 545.
17. Faccini, N., Delbono, S., Çelik Oğuz, A., Cattivelli, L., Valè, G., Tondelli, A. (2021.): Resistance of European Spring 2-Row Barley Cultivars to *Pyrenophora graminea* and Detection of Associated Loci. *Agronomy*, 11: 374.
18. Ficsor, A., Bakonyi, J., Csősz, M., Tomcsanyi, A., Varga, J., Toth, B. (2014.): Occurrence of Barley Pathogenic *Pyrenophora* Species and Their Mating Types in Hungary. *Cereal Research communications*, 42: 612–619.
19. Grgić, S., Ćosić, J., Rebekić, A., Vrandečić, K. (2016.): Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *Botrytis cinerea*. *Poljoprivreda*, 22(2): 29-33.
20. Johnston, R.H., Metz, S.G., Riesselman, J.H. (1982.): Seed treatment for control of *Pyrenophora* life stripe of barley, *Plant Pathology*, 66: 1122-1124.
21. Jurković, D., Ćosić, J., Vrandečić, K. (2017.): Pseudogljive i gljive ratarskih kultura. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

22. Kumar, V., Shekhawat, P. S., Kanwar, H. R. (2019.): Evaluation of fungicides and bio-control agents against stripe disease of barley caused by *Drechslera graminea*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5): 1684-1687.
23. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E. (2001.): A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 453–462.
24. Lee, S. O., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K., Cho, K. Y., Kim, J. C. (2007.): Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against post-harvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol J*, 23(2): 97-102.
25. Linkies, A., Jacob, S., Zink, P., Maschmer, M., Maier, M., Koch, E. (2020.): Characterization of cultural traits and fungicidal activity of strains belonging to the fungal genus *Chaetomium*. *Journal of Applied Microbiology*, 131: 375-391.
26. Nakahara, K., Alzoreky, N., Yoshihashi, T., Nguyen, H., Trakoontivakorn, G. (2013.): Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Food Technology*, 37(4): 249-252.
27. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013.): Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6: 1451-1474.
28. Nguiefack, J., Wulff, G. E., Dongmo, J. B. L., Fouelefack, F. R., Fotio, D., Mbo, J., Torp, J. (2013.): Effect of plant extracts and an essential oil on the control of brown spot disease, tillering, number of panicles and yield increase in rice. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 871-882.
29. Nielsen, B.J., Yahyaoui, A.H., Barder, L., Tekauz, A., Wallwork, H., Steffenson, B. (2002.): Screening for resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in barley. *Proceedings of the second International Workshop on barley Leaf Blights*, 277-280.
30. Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Pitte, G. J. P., Begin, A. (1997.): Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Inter J Food Microbiol*, 37: 155-162.
31. Özcan, M.M., Chalchat, J.C. (2006.): Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Ann. Microbiol.*, 56: 353–358.

32. Palfi, M. (2017.): Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u in vitro uvjetima. Doktorska disertacija, Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Zaštita prirode i okoliša, Osijek.
33. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., Čosić, J. (2018.): Antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*. *Poljoprivreda*, 24(2): 20-26.
34. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., Čosić, J. (2019.): Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Bortyitis cinerea*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(7): 544-554.
35. Park, J. Y., Kim, S. H., Kim, N. H., Lee, S. W., Jeun, S. C., Hong, J. K. (2017.): Differential Inhibitory Activities of Four Plant Essential Oils on In Vitro Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Causing Fusarium Wilt in Strawberry Plants. *The Plant Pathology Journal*, 33(6): 582-588.
36. Petrić, A., Ereš, H., Vrandečić, K., Čosić, J. (2021.): Utjecaj eteričnih ulja na rast micelija *Globisporangium ultimim* i *Globisporangium irregulare*. *Fragmenta phytomedica*, 35(7): 27-33.
37. Porta-Puglia, A., Delogu, G., and Vannacci, G. (1986.): *Pyrenophora graminea* on winter barley seed: Effect on disease incidence and yield losses. *J. Phytopathol*, 117: 26-33.
38. Posavac, I., Čosić, J., Vrandečić, K. (2014.): Utjecaj eteričnih ulja na porast *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Glasnik Zaštite Bilja*, 37(5): 70-74.
39. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006.): *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med*, 6: 39.
40. Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S., Kundu, B. (2017.): Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3): 308-313.
41. Si, E., Meng, Y., Ma, X., Li, B., Wang, J., Yao, L., Yang, K., Zhang, Y., Shang, X., Wang, H. (2020.): Genome Resource for Barley Leaf Stripe Pathogen *Pyrenophora graminea*. *Plant Disease*, 104(2): 320-322.

42. Singh, B., Mehta, S., Aggarwal, S. K., Tiwari, M., Bhuyan, S. I., Bhatia, S., Islam, M. A. (2019.): Barley, Disease Resistance, and Molecular Breeding Approaches. Disease Resistance in Crop Plants, 261-299.
43. Stefan, M., Zamfirache, M., Padurariu, C., Trută, E., Gostin, I. (2013.): The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. Central European Journal of Biology, 8(6): 600-608.
44. Tabassum, N., Vidyasagar, G. M. (2013.): ANTIFUNGAL INVESTIGATIONS ON PLANT ESSENTIAL OILS. A REVIEW., International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5:19-28
45. Tanović B, Milijašević S, Todorović B, Potočnik I, Rekanović E. (2005.): Toxicity of essential oils to *Botrytis cinerea* Pers. in vitro. Pesticidi i fitomedicina, 20(2): 109-114.
46. Tekauz, A., Chiko, A.W. (1980.): Leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora graminea*: Occurrence in Canada and comparisons with barley stripe mosaic. Can. J. Plant Pathol., 2: 152–158.
47. Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, G., Vale, G., Tacconi, M., Malnati, M. (2007.): In vitro antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. Letters in Applied Microbiology 44(6): 613- 618.
48. Zad, J., Aghakhani, M., Etebarian, R., Okhovat, M. (2002.): Barley leaf stripe disease, Meded. Rijksuniv. Gent Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet., 67: 279-281.
49. Zambonelli, A., D'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., Albasini, A. (1996.): Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi In Vitro. J Phytopathol 144(9-10): 491-494.

## 8. SAŽETAK

Cilj je ovoga istraživanja bio je ispitati utjecaj temperature (15, 20 i 30 °C) i dvanaest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Pyrenophora graminea*. Eterična ulja primijenjena su u količini od 25 µL, a zona inhibicije mjerila se četvrtog i osmog dana od inokulacije. Prema rezultatima istraživanja utvrđeno je da inhibitorni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti ulja. Na pojedina eterična ulja je utjecala i temperatura i dužina inkubacije. Ulje timijana pokazalo je najjače antifungalno djelovanje odnosno potpuno je inhibiralo porast micelija pri svim temperaturama. Osim ulja timijana, jak su antifungalni učinak imala eterična ulja anisa i citronele. S druge strane, eterična ulja bora, naranče slatke i eukaliptusa pokazala su najslabiji inhibitorni učinak pri svim temperaturama.

**Ključne riječi:** eterična ulja, *Pyrenophora graminea*, porast micelija, temperatura, antifungalni učinak

## 9. SUMMARY

The aim of this study was to examine the effect of temperature (15, 20, and 30 °C) and twelve essential oils on the growth of *Pyrenophora graminea* mycelium. Essential oils were administered in an amount of 25 µL, and the zone of inhibition was measured on the fourth and eighth day of inoculation. According to the results of the study, it was found that the inhibitory effect of essential oils depends on the type of oil. Some essential oils were affected by temperature and the duration incubation period. Thyme oil showed the strongest antifungal effect, i.e., it completely inhibited the growth of mycelium at all temperatures. In addition to thyme oil, anise and citronella essential oils had a strong antifungal effect. On the other hand, the essential oils of pine, sweet orange, and eucalyptus showed the weakest inhibitory effect at all temperatures.

**Keywords:** essential oils, *Pyrenophora graminea*, mycelial growth, temperature, antifungal effect

## 10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Fungistatični utjecaj eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea* četvrtog dana od inokulacije

Tablica 2. Usporedba fungistatičnog utjecaja eteričnih ulja pri različitim temperaturama i kontrole na porast micelija *P. graminea*

Tablica 3. Fungistatičan utjecaj eteričnih ulja pri različitim temperaturama na porast micelija *P. graminea* osmog dana od inokulacije

Tablica 4. Usporedba fungistatičnog utjecaja eteričnih ulja pri različitim temperaturama i kontrole na porast micelija *P. graminea* osmog dana od inokulacije

Tablica 5. Utjecaj temperatura na antifungalni učinak eteričnih ulja četvrtog dana od inokulacije

Tablica 6. Utjecaj temperatura na antifungalni učinak eteričnih ulja osmog dana od inokulacije



## 11. POPIS SLIKA

Slika 1. Prugavost lista ječma (*P. graminea*) (Izvor: <https://agronomija.rs/2013/prugavost-lista-jecma-pyrenophora-graminea/>)

Slika 2. Čista kultura fitopatogene gljive *Pyrenophora graminea* (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 3. Uzimanje diska podloge s razvijenom gljivom pomoću metalnog kružnog rezača (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 4. Postavljanje 4 diska podloge s razvijenom gljivom pomoću laboratorijske igle (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 5. Termostat komora (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 6. Postavljanje Petrijevih zdjelica u termostat komoru (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 7. Mjerenje zone inhibicije (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 8. Antifungalni učinak eteričnih ulja timijana, lavande i čajevca pri 15 °C četvrtog dana inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 9. Antifungalni učinak eteričnih ulja anisa, eukaliptusa i čempresa na 30 °C četvrtog dana od inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2022.)

Slika 10. Antifungalni učinak eteričnog ulja timijana na 20 °C četvrtog dana od inokulacije u odnosu na kontrolu (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 11. Antifungalni učinak ulja eukaliptusa, čempresa i naranče slatke na 30 °C osmog dana od inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2022.)

Slika 12. Antifungalni učinak ulja naranče slatke i bora na 20 °C osmog dana od inokulacije u odnosu na kontrolu (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 13. Fungistatični učinak eteričnog ulja anisa na 15, 20 i 30 °C četvrtog dana od inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 14. Inhibitorski učinak eteričnog ulja eukaliptusa na 20 i 30 °C četvrtog dana od inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 15. Inhibitorni učinak ulja timijana na 15, 20 i 30 °C osmog dana od inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2021.)

Slika 16. Antifungalni utjecaj ulja naranče slatke na 15, 20 i 30 °C osmog dana od inokulacije (Izvor: Dujković, A., 2021.)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

UTJECAJ TEMPERATURE I ETERIČNIH ULJA NA RAST FITOPATOGENE GLJIVE *Pyrenophora graminea*

Angelina Dujković

### Sažetak:

Cilj ovoga istraživanje je bio ispitati utjecaj temperature (15, 20 i 30 °C) i dvanaest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Pyrenophora graminea*. Eterična ulja su primijenjena u količini od 25 µL, a zona inhibicije mjerila se četvrtog i osmog dana od inokulacije. Prema rezultatima istraživanja utvrđeno je da inhibitorni učinak eteričnih ulja ovisi o vrsti ulja. Na pojedina eterična ulja je utjecala temperatura i dužina inkubacije. Ulje timijana je pokazalo najjače antifungalno djelovanje odnosno potpuno je inhibiralo porast micelija pri svim temperaturama. Osim ulja timijana, jak antifungalni učinak su imala eterična ulja anisa i citronele. S druge strane, eterična ulja bora, naranče slatke i eukaliptusa su pokazala najslabiji inhibitorni učinak pri svim temperaturama.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasenka Ćosić

**Broj stranica:**

**Broj grafikona i slika:** 16

**Broj tablica:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 49

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** eterična ulja, *Pyrenophora graminea*, porast micelija, temperatura, antifungalni učinak

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr.sc. Karolina Vrandečić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, mentor
3. prof. dr. sc. Renata Baličević, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek  
University Graduate Studies, Course Plant Protection

Graduate thesis

### INFLUENCE OF TEMPERATURE AND ESSENTIAL OILS ON GROWTH OF PHYTOPHATOGENIC FUNGUS *Pyrenophora graminea*

Angelina Dujković

**Abstract:** The aim of this study was to examine the effect of temperature (15, 20, and 30 °C) and twelve essential oils on the growth of *Pyrenophora graminea* mycelium. Essential oils were administered in an amount of 25µL, and the zone of inhibition was measured on the fourth and eighth day of inoculation. According to the results of the study, it was found that the inhibitory effect of essential oils depends on the type of oil. Some essential oils were affected by temperature and the duration incubation period. Thyme oil showed the strongest antifungal effect, i.e., it completely inhibited the growth of mycelium at all temperatures. In addition to thyme oil, anise and citronella essential oils had a strong antifungal effect. On the other hand, the essential oils of pine, sweet orange, and eucalyptus showed the weakest inhibitory effect at all temperatures.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasenka Čosić

**Number of pages:**

**Number of figures:** 16

**Number of tables:** 6

**Number of references:** 49

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** essential oils, *Pyrenophora graminea*, mycelial growth, temperature, antifungal effect

**Thesis defended on date:**

#### Reviewers:

1. prof. dr.sc. Karolina Vrandečić, president
2. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentor
3. prof. dr. sc. Renata Baličević, member

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