

Utjecaj propolisa na porast gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*

Kikić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:612459>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ana Kikić, apsolvantica

Sveučilišni diplomski studij

Studij Ekološka poljoprivreda

Utjecaj propolisa na porast gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ana Kikić, apsolventica

Sveučilišni diplomski studij

Studij Ekološka poljoprivreda

Utjecaj propolisa na porast gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ana Kikić, apsolventica

Sveučilišni diplomski studij

Studij Ekološka poljoprivreda

Utjecaj propolisa na porast gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2016.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature	3
3. Materijali i metode rada	9
4. Rezultati	13
4.1. Utjecaj alkohone otopine propolisa na porast micelija <i>Botytis cinerea</i>	13
4.2 Utjecaj alkoholne otopine propolisa na porast micelija <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	21
5. Rasprava	25
6. Zaključak.....	28
7. Popis literature.....	29
8. Sažetak	33
9. Summary	34
10. Popis tablica	35
11. Popis slika	35
12. Popis grafikona.....	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	37
BASIC DOCUMENTATION CARD	38

1. Uvod

Pod ekološkom, organskom ili biološkom poljoprivredom u široj javnosti se uglavnom misli na tzv. proizvodnju „zdrave hrane“, tj. poljoprivrednu proizvodnju bez primjene agrokemikalija.

Premda je ova definicija donekle točna i prihvatljiva, ipak treba reći da je ekološka poljoprivreda koncept poljoprivredne proizvodnje koji je mnogo složeniji i čija bit nije samo u izostavljanju agrokemikalija, već u sveukupnom gospodarenju kojim je to moguće postići.

Stoga za ekološku poljoprivredu možemo reći da je to sustav poljoprivredne proizvodnje koji nastoji maksimalno iskoristiti potencijale određenog ekosustava (autonomno gospodariti sustavom), odnosno gospodarstva stimulirajući, jačajući i harmonizirajući biološke procese pojedinih njegovih djelova.

Ekološka poljoprivreda isto tako nije niti povratak na staro, povratak na poljoprivredu naših djedova. Naprotiv ekološka poljoprivreda dio je suvremene poljoprivredne proizvodnje, trgovine i agronomske znanosti te se upravo temelji na njezinim najnovijim spoznajama i dostignućima (Znaor, 1996.).

Propolis je smolasti pčelinji proizvod kojem se još u antičkim vremenima posvećivala posebna pozornost (Kapš, 2013.).

Propolis je mješavina različitih količina voskova i smole koje pčele prikupljaju s pupova lišća ili kore drveća ili grmlja (Mujić i sur., 2014.).

Riječ propolis grčkog je porijekla (grč. *pro* prije i *polis* grad) što znači „ispred grada“ ili „obrana grada.“ (Kapš, 2013.).

U pčelinjoj zajednici služi kao građevinska denzifikacijska tvar kojom pčele popunjavaju pukotine, fiksiraju saće, dezinficiraju i poliraju stanice te smanjuju otvor košnice radi zaštite od eventualnih neprijatelja (Mujić i sur., 2014.).

Preparati na bazi propolisa mogu se koristiti u obliku vodene, alkoholne, hidroalkoholne otopine te u obliku propolisnog ulja.

Mnogi talijanski i njemački eko voćari i vinogradari u svrhu zaštite bilja koriste propolis, a broj pristaša upotrebe propolisa vrtoglavo raste svakim danom. Tome svjedoči i istraživanje o mogućnosti uporabe propolisa u zaštiti bilja koje su proveli stručnjaci zavoda za ribarstvo pčelarstvo i zootehniku sa Agronomskog fakulteta u Zagrebu iz čijeg je rada zaključeno da

propolis posjeduje antibakterijsko, antigljivično i insketicidno djelovanje te da stimulirajuće djeluje na rast i razvoj biljka (Znaor, 1996.).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary zemljišni je parazit koji napada veliki broj biljnih vrsta u svim stadijima rasta i razvoja te njihove plodove nakon žetve odnosno berbe. *S. sclerotiorum* uzročnik je bolesti za koju se, ovisno o domaćinu kojeg napada, koristi više od 60 naziva kao što su trulež stabljike, trulež vrata korijena, trulež glave, palež cvijeta, venuće, rak stabljike ili najčešće bijela trulež (Purdy, 1979.).

Botrytis cinerea fakultativno je parazitna i polifagna vrsta. Krug domaćina je brojna osobito u području umjerene klime. U jačem intenzitetu javlja se u godinama s većom količinom kiše i to uglavnom u drugom djelu vegetacije. U razvojnem ciklusu gljiva formira micelij, konidiofore s konidijama, askuse i askospore, a prema nekim autorima i mikrokonidije i hlandispore (Topolovec-Pintarić i Cvjetković, 2000.).

Ovo istraživanje imalo je za cilj utvrditi utjecaj različitih koncentracija alkoholne otopine propolisa (0,5%, 1% i 2,5%) na porast gljiva *Sclerotinia sclerotiorum* i *Botrytis cinerea*.

2. Pregled literature

Tvari nađene u propolisu uključuju: flavonidi 38%, hidroksiflavoni 27%, hidroksiflavanoni 11%, kalkoni 2%, benzojeva kiselina i derivati 12 %, derivati benzaldehida 2%, cimetni alkohol, cimetna kiselina i derivati 14 %, alkohol, ketoni, fenoli i heteroaromatični spojevi 12%, terpeni, seskviterpentski alkohol i derivati 7%, alifatski ugljikovodici 6%, mineralne tvari 22%, steroli i steridni ugljikovodici 6%, šećeri 7%, aminokiseline 24%, smole i balzami 55%, voskovi 30 %, eterična ulja 10%, pelud 5%, oksidacijska vrijednost propolisa 22%, mehanička nečistoća 20%, fenolne tvari 20% (Kapš., 2013.).

Boja propolisa varira od žute do tamnosmeđe, ovisno o porijeklu smole. Na temperaturi od 25°C do 45°C propolis je meka, podatna i vrlo ljepljiva tvar. Na manje od 15°C te kad je zamrznut ili blizu zamrzavanja, propolis postaje tvrd i lomljiv. Prema klasifikaciji proizvoda pčelarstava svjetske organizacije, postoje tri vrste propolisa: brazilski, europski i propolis sjevernih regija Rusije (Mujić i sur., 2014.).

Europski propolis istražen je u radu Bankove i suradnika (2002.) kroz tri talijanska, tri bugarska i četiri švicrska uzorka pomoću GC-MS kromatografije i identificirano je više od 80 komponenata. Uglavnom su identificirani gore navedeni spojevi, s tim da je potvrđena preporuka Bankova i sur. (2000) kako je prvi korak u kontroli propolisa utvrđivanje“tipa“ propolisa s obzirom na njegovo biljno porijeklo. Utvrđivanje geografskog porijekla kroz ispitivanje sastava propolisa potvrđuju i Popova i sur. (2009.) u mediteranskom propolisu Krete i mnogi drugi (Mujić i sur., 2014.).

Brojna istraživanja u novije vrijeme izvještavaju o različitim primjenama propolisa u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji u svrhu liječenja ili prevencije bolesti kao što su karcinom, upale, dijabetes, srčani problemi (Sforcin i Bankova, 2011.).

Primjenu propolisa u poslježetvenoj pripremi i u konzerviranju voćaka preporuča se prema istraživanju Shangallija (1990.).

O antibakterijskim aktivnostima propolisa provedena su mnoga znanstvena istraživanja diljem svijeta. Dokazana je citotoksična aktivnost, aktivnost protiv protozoa i drugi biološki učinci između kojih su: regeneracija nosnog tkiva, kostiju, zubne pulpe, anestetičko svojstvo, hepatoprotektivno, imuno protektivno, podsticanje detoksikacije jetre, antioksidativno svojstvo i inhibiranje dihidrofolatske reduktaze (Marucci, 1995.). U istraživanjima je potvrđeno postojanje različitih biloloških svojstava; antibakterijska, antiviralna, antitumorna, antiinflamatorna, antikancerogena, antifungalna (Sforcin i Bankove, 2011.)

Ljekovitost propolisa istražuje se u mnogim državama i na svim kontinentima i dobiveni su slični rezultati. Brojni znanstvenici potvrdili su protutumorsko djelovanje propolisa. Svjedoči tome i činjenica da je na savjetovanju 1976. u Bukureštu i 1978. u Portorožu, od 153 referata njih 60 bilo posvećeno upravo istraživanjima ljekovitih svojstava propolisa (Kapš, 2013.).

Istraživanjem provedenim na 94 tipa anaerobnih sojeva kliničkih bakterija koje su tretirane bugarskim propolisom, Boyanova i sur. (2005.) otkrivenoj je da propolis djeluje inhibicijski na većinu anaerobnih sojeva, te da se daljnim istraživanjem može unaprijediti njegova uporaba u medicini.

Europski propolisi (Austrija, Njemačka, Francuska) imaju slična svojstva te osobito djeluju na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*. Austrijski propolis bio je osobito učinkovit na kandidu (Abd El-Hady, Hegazi i Wollenweber, 2002.).

Propolis inhibira djelovanje bakterije *Clostridium oedematiens*. To su Gram pozitivne bakterije uzročnici bolesti ljudi i životinja. Bakterija proizvodi toksine, među njima i smrtonosni aflatoksin. Za uništavajuće djelovanje na bakterije djelotvorni su osobito sljedeći sastojci propolisa: diprenil-dihidro-kumarična kiselina (4,1%), esteri kumarične kiseline (10,9%), benzofuranov lignan (13,5%) i derivati valerične kiseline (11,4%) (Hegzi i sur., 2002.).

Istraživanje provedeno o sigurnosti propolisa u alternativnom liječenju proveli su Miguel i sur. (2011.). Svoje istraživanje su usmjerili na kemijsku varijabilnost fenola i hlapljivih tvari iz propolisa, te njihovu ponašanje u biološkim procesima. Kroz pokus su ispitivali kemijska svojstva propolisa iz različitih regija (Rusija, Brazil, Kuba, Venezuela, Okinawa i Taiwan). Unatoč različitom kemijskom sadržaju ovih propolisa otkrili su da svi imaju jednako ili slično djelovanje na biološke procese. Zaključili su da se propolis može uzimati kao alternativa za razne bolesti. Međutim nije posve bezopasan. Neki kemijski sastojci uzročnici su pojave alergija, pa se preporuča konzultiranje sa liječnikom prije upotrebe

Inhibitorno djelovanje propolisa na *Candidu albicans*, koja je uzročnik bolesti dišnog sustava, probavnog trakta i usne šupljine u svom istraživanju potvrdili su Auria i sur. (2003.). U ovom istraživanju je utvrđeno da koncentracija od 0,22 mg/ml ima inhibitoran učinak na razvoj gljive, kao i manje koncentracije korištene u istraživanju. Propolis je djelovao na strukturu plazma membrane koja se raspala vrlo brzo (15-30 sekundi nakon tretiranja).

Utvrđeno je da osam različitih vrsta propolisa sprječava oksidativne promjene štetnog (LDL) kolesterola, što inhibira napredovanje ateroskleroze te su sve istraživane vrste propolisa imale antivirusni učinak. Eksperiment je napravljen s virusima atipične kokošje kuge i zarazne vrste bursa virusa (Abd El-Hady i sur. 2002.).

Istraživanje djelotvornosti propolisa protiv protozoa izveo je Mladenov (1986.) promatrajući kulture praživotinja mikroskopom uz povećanje od 400 puta. Opazio je promijene u mikroorganizmima koje je tretirao ekstraktom propolisa u etilnom alkoholu, vodi, voćnoj i grožđanoj rakiji. Utvrdio je da su nakon miješanja s propolisom kod praživotinja pojavile degenerativne promjene. Citoplazma je potamnila, stanične strukture su se promijenile, a stanična jezgra nestala.

Antioksidativno, antimikrobno i antifungalno djelovanje propolisa pruža široku mogućnost primjene u prehrambenoj tehnologiji. Prednost propolisa nad konvencionalnim konzervansima je ta što talog propolisa ima pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Malen broj istraživanja je posvećen potencijalnim nuspojavama koje se javljaju konzumacijom iako neki od elemenata koje propolis sadrži mogu biti vrlo štetni za zdravlje (Mujić i sur., 2014.)

Najvažniji bioflavonidi u propolisu su galangin, pinocembrin, kvercetin, naringin, apigenin i krizin, a mikroorganizmi na koje djeluju su sljedeći: galangin na *Bacillus subtilis*, *Bacillus alei*, *Proteus vulgari*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* pinocembrin, *Aspergillus flavus*, *Herpes simplex virus*; kvercetin na *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Herpes simplex virus*; naringin na *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*; apigenin na *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Herpes simplex virus*; krizin na *Staphylococcus pneumoniae*, *Herpes simplex virus* (Kapš, 2013.).

Propolis povećava antimikrobno djelovanje nekih antibiotika: pencilin, klormiatin, tetraciklin dr. U normalnim uvjetima propolis i alkohoni ekstrakt propolisa čuvaju antibakterijsku aktivnost 3-4 godine. Antibakterijske tvari u propolisu i njegovim ekstraktima su termostabilne i praktično otporne na visoke temperature (Mujić i sur., 2014.).

Curifuta i sur., (2012.) dokazali su da etanolni ekstrakt čileanskog propolisa ima inhibirajuće djelovanje na ekonomski važne fitopatogene gljivice uzgojenim in vitro: *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.*, *Ulocladium sp.*, *Bortrytis cinera.*, *Penicilium expansum* i *Trichoderma resei*. Gljive su tretirali sa ekstraktom komercijalnog propolisa koji su umješali u hranjivu podlogu

(PDA) te su mjerili promjer micelija svaki dan, a promatrali su ih ovisno o dužini trajanja životnog vijeka određene kulture.

Utvrđeno je da propolis djeluje na sklerozaciju gljivice *Morchella conica* (Guler i sur., 2005.).

Testiran je inhibirajući efekt ekstrakta propolisa različitih vodenih koncentracija od 0,5% , 1,2%, 3% i 4% na porast gljivica *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* i *Pencilium digitatum*. Koncentracije 0,5%, 1,2% i 3% imale su manji učinak na porast gljiva, za razliku od koncentracije 4% koja je utjecala na 50% manji porast navedenih gljiva te pokazala najveće inhibitorno djelovanje već nakon 6 dana inkubacije. Gljive na čiji je porast koncentracija imala najveći inhibitorni učinak su *A. alternata* i *P. digitatum* (Ozcan, 1999.).

Najveći doprinos znanosti o propolisu ima S.A. Popravko koji je sa suradicima obavio brojna istraživanja o propolisu. U propolisu je pronašao flavonide koji iznose 1 do 4 % sastava propolisa: krizin, tektokrizin, galangin, izalpinin, ramnocitrin, keperol, pinocembrin, pinostrobin i izovalin (Kapš, 2013.)

Sclerotinia sclerotiorum je gljiva iz grupe fakultativnih parazita-polifaga. Snježno bijela prevlaka koja se razvija na napadnutim dijelovima biljke je micelij gljive. Sklerocije su organi gljive u kojima ona prezimljuje i održava vitalnost u tlu 8-10 godina. Sklerocije su vrlo otporne na visoke i niske temperature kao i na fungicidne pripravke. Gljivu se vrlo lako izolira na svim podlogama i jednostavna je za determinaciju. Raste i razvija se na temperaturi od 1° do 30° C, a optimalan temperatura za razvoj je 24° C (Grau i Hartman, 1999.).

Sclerotinia sclerotiorum prvi put je utvrđena i opisana u Tajlandu 1919., zatim u Njemačkoj 1921. i od tada do danas opisali su je i istražili mnogi autori diljem svijeta. Detaljan opis za bijelu trulež soje dali su Sinclair i Shurtleff (1975.) i Sinclair i Backman (1989.). U to vrijeme, prema njihovim opisima *S. sclerotiorum* nema veći ekonomski značaj u SAD-u, više sporadični. Međutim, u međuvremenu od 1990. godine dogodile su se značajne promjene i danas je ova bolest vrlo destruktivna u sjevernoj Americi (Wrather i sur., 2001.). Također, prisutna je i u južnoj Americi (Yorinori i Homechin, 1985.).

Sclerotinia sclerotiorum parazitira osim suncokreta i soje i mnoge druge kultivirane biljke kao što su npr. uljana repica, lucerna, duhan, leća, grah, rajčica, krastavac, salata, ljiljani, tulipani, salata, mrkva, bundeva, luk, češnjak, citrusno voće, začinsko bilje (timijan, ružmarin), ukupno

408 biljnih vrsta svrstanih u 278 rodova i 75 porodica (Bollad i Hall, 1994., Barkai-Golan, 2001., Saharan i Mehta, 2008.).

Uzročnik bijele truleži osim kulturnih, ima domaćine i među korovnim vrstama kao što su primjerice mračnjak (*Abutilon theophrasti*), limundžik (*Ambrosia artemisiifolia*) te oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus*) (Jurković i Culek, 1997., Jurković i Ćosić, 2004.).

Bijela trulež ubraja se u najdestruktivnije patogene koji napadaju suncokret. Napada sve dijelove biljke: glavu, stabljiku, korijen tako da može uzrokovati veliko smanjenje zrna po ha i do 100% kad su povoljni uvjeti za njen razvoj, a to je vlažno i hladno vrijeme tijekom vegetacije. Zaraza ovim patogenom značajno utječe i na kakvoću zrna, odnosno djeluje na snižavanje sadržaja ulja i bjelančevina u zrnu (Vratarić i sur., 2004.). *S. sclerotiorum* uzrokuje na suncokretu četiri tipa bolesti i to truljenje sjemena i propadanje mladih biljčica, korijenski tip bolesti i venuće biljaka, truljenje srednjeg dijela stabljike i truljenje glave (Ćosić i sur., 2012.).

Primarnu zarazu bijele truleži u početku vegetacije obavlja micelij gljive koji se razvija na prezimljenim sklerocijima u tlu ili na oboljelom sjemenu. Sekundarnu zarazu tijekom vegetacije obavljaju askospore (Vratarić i Sudarić, 2008.)

Sklerocije *S. sclerotiorum* osnovni su izvor zaraze. Sklerocije nastaju kao kompaktna bijela tijela sastavljena od hifa veličine zrna ječma, no razlikuju se s obzirom na domaćina i okolišne uvjete. Kasnije sklerocije postanu crne. Ponekad gljiva zarazi srž biljaka te nema pojave vanjskog micelija, a proraste cijelu biljku i unutar nje stvara sklerocije (Walker, 1969., Saharan i Mehta, 2008.).

Obzirom na moguću toksičnost gljive i sklerocija urađena su brojna istraživanja kojima nije utvrđen negativni učinak sklerocija na zdravlje životinja niti su nađeni toksični metaboliti (Cole i Cox, 1981.).

Kod povrća iz porodice krstašica, prvi simptom javlja se u vidu sivih linearnih lezija na glavnoj stabljici, a krajnja posljedica je zaostalost biljaka u rastu. Na ubranim plodovima u skladištu dolazi također do pojave micelija i razvoja sklerocija. Tkivo domaćina postaje meko i vodenasto kako bolest napreduje, a truli dijelovi gube vodu i suše se. Osim stabljike, zaraženi mogu biti i drugi dijelovi biljke kao što su korijen, list, peteljke, cvijet. Do zaraze plodova dolazi kako tijekom vegetacije tako i nakon berbe tijekom skladištenja (Saharan i Mehta, 2008., Walker, 1969.).

Uzročnik sive plijesni, gljiva *Botrytis cinerea*, fakultativno je parazitna i polifagna vrsta, postoje neki njeni izolati koji koji pokazuju manji ili veći stupanj specijalizacije te inficiraju samo neke domaćine. *Botrytis cinerea* ima širok krug domaćina, osobito u području umjerene klime: suncokret, soja, uljana repica, lan, vinova loza, hmelj, grah grašak, luk, rajčica, mrkva, ricinus i druge mnoge uzgajane i korovne vrste (Vratarić i sur.,2004.).

Botrytis cinerea, uzročnik sive truleži patogen je za 235 vrsta biljaka, koje se prostiru od hladnih zona Aljaske i Kanade do suptropskih područja. Značajno ugrožava proizvodnju voća, grožđa, povrća i ukrasnog bilja. Često izaziva bolesti biljaka u zaštićenom prostoru, kao i trulež plodova tokom skladištenja i transporta. Gljiva parazitira skoro sve dijelove biljke u svim fazama razvoja, a simptomi se najčešće opisuju kao siva trulež, siva plijesan, palež, a zapaženo je i polijeganje klijanaca (Verhoeff, 1970., Charabany i Shtienberg, 1999., Giraud i sur., 1999.).

U većini slučajeva, patogen je najopasniji na zrelim biljnim dijelovima ili na tkivu koje stari, mada do infekcije obično dolazi u ranijim fenofazama. Poslije 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 uskladištenih plodova bez simptoma gubici postaju vidljivi tek nakon njihovog transporta do mjesta prodaje (Williamson i sur., 2007).

Teško je sa sigurnošću procijeniti kolike su štete koje uzrokuje *B. cinerea*. Zavisno od usjeva i vremenskih prilika, gubici prinosa mogu dostići 50%, mada i potpuno propadanje usjeva nije neuobičajeno. O ekonomskom značaju patogena najbolje govori 15 - 25 miliona dolara, koliko se u svijetu godišnje utroši na fungicide za suzbijanje *B. cinerea* (Elad i sur., 2004).

Javlja se kako na kultiviranim, tako i na korovskim biljkama, može preživjeti i kao saprofit na biljnim ostacima, tako da je uzročnik u usjevu uvijek prisutan (Jarvis, 1980).

U razvojnom ciklusu gljiva formira micelij, konidiofore s konidijima, sklerocije, apotecije, askuse i askospore, a prema Topolovec-Pintarić (2000.) i mikrokonidije i hlamidospore.

3. Materijali i metode rada

U Laboratoriju za fitopatologiju na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku u veljači i ožujku 2015. godine proveden je pokus prema uzoru na pokus koji su proveli Curifita i sur. (2012.) u Čileu.

Pokusom smo istraživali inhibitorno djelovanje alkoholne otopine propolisa (slika 1.) u tri koncentracije 0,5%, 1%, 2,5% na porast dvije vrste gljiva *S. sclerotiorum* i *B. cinerea*.



Slika 1. Propolis korišten za pripremanje podloge
(original)

Istraživanje smo započeli sterilizacijom Petrijevih zdjelica 90 mm i pribora. Za pripremanje podloge koristili smo destiliranu vodu, PDA (krompirov agar) i tehnički agar.

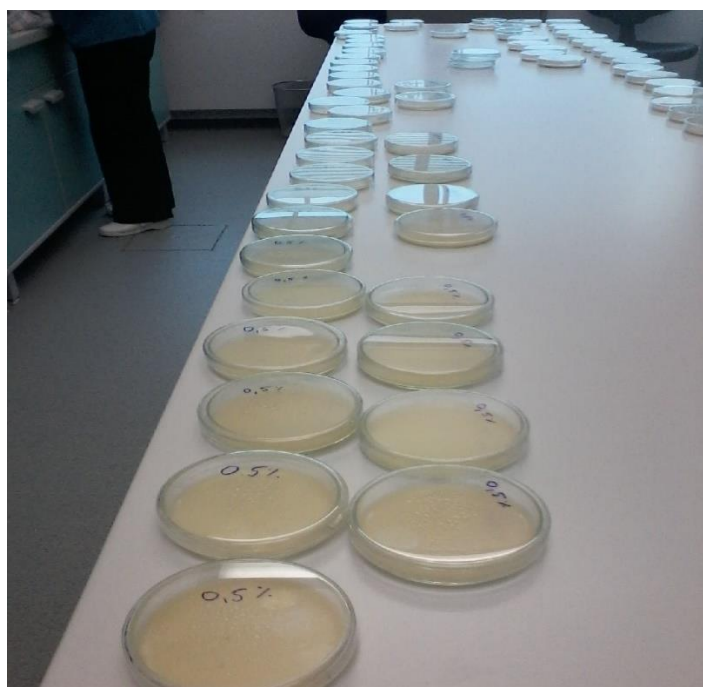
Sterilizaciju Petrijevih zdjelica izvršili smo zamatanjem u novinski papir i stavljanjem u autoklav 20 minuta na temperaturi od 121 °C.

U jednu Erlenmayerovu tikvicu dodali smo 0,725 ml destilirane vode, te 21,5 g PDA podloge u prahu i 3,5 g tehničkog agara (slika 2.). Smjesu smo otapali kuhanjem, a nakon toga hladili na temperaturi od 55° C. Koristili smo tri tikvice za tri koncentracije. Petrijeve zdjelice punili smo podlogom sa 0,5%, 1%, 2,5% alkoholom otopinom propolisa (slika 3.).



Slika 2. Miješanje smjese s propolisom za dobivanje podloge

(original)



Slika 3. Petrijeve zdjelice s podlogom alkoholne otopine propolisa

(original)

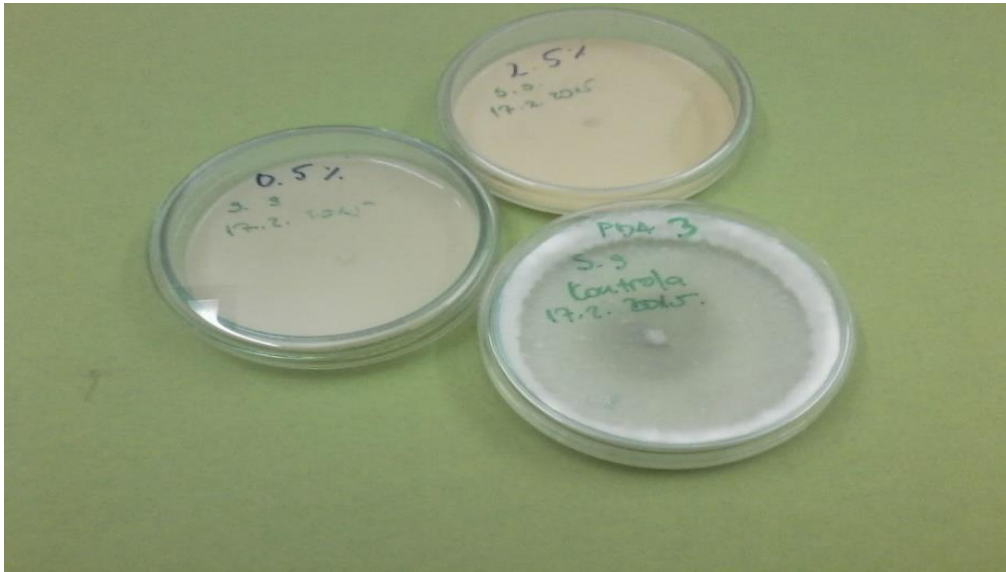
Nakon pripreme podloga slijedila je inokulacija u laminariju. Za inokulaciju je korišten sedam dana star micelij gljiva. Dobivene diskove promjera 5 mm sterilnim priborom nanosili smo na sredinu Petrijevih zdjelica (slika 4.). Micelij gljive okrenut je prema podlozi prilikom nanošenja. Nakon inokulacije Petrijeve zdjelice smo stavili u termostad, u kojem smo ih držali na temperaturi od 22° C.



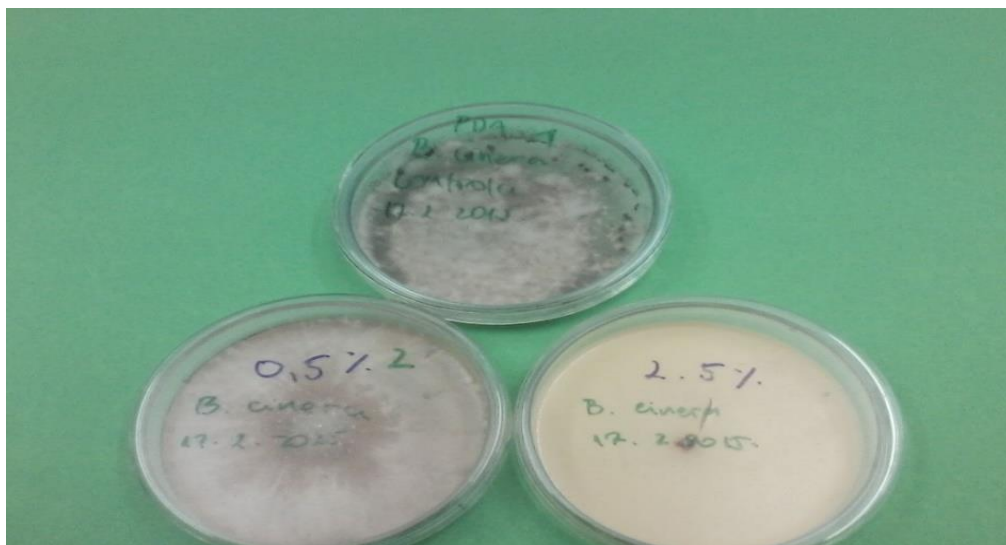
Slika 4. Inokulacija izolata *S. sclerotiorum* i *B. cinereae* unutar laminarija (original)

Prvo mjerenje porasta obavljeno je 2 dana od inokulacije. Mjerenje je izvršeno pomoću ravnala, kojim se mjerio promjer micelija preko sredine diska u vodoravnom smjeru. Mjerenje je vršeno svaki dan u periodu od 32 dana, a za rezultate i raspravu odabrani su dani sa najznačajnijim promjenama.

Slika 5. prikazuje primjer porasta *S. sclerotiorum* nakon 32 dana , a slika 6 porast *B. cinerea*



Slika 5. Porast gljive *S. sclerotiorum* nakon 25 dana (original)



Slika 6. Porast gljive *B. cinerea* na tri različite koncentracije (original)

4. Rezultati

4.1. Utjecaj alkohone otopine propolisa na porast micelija *Botytis cinerea*

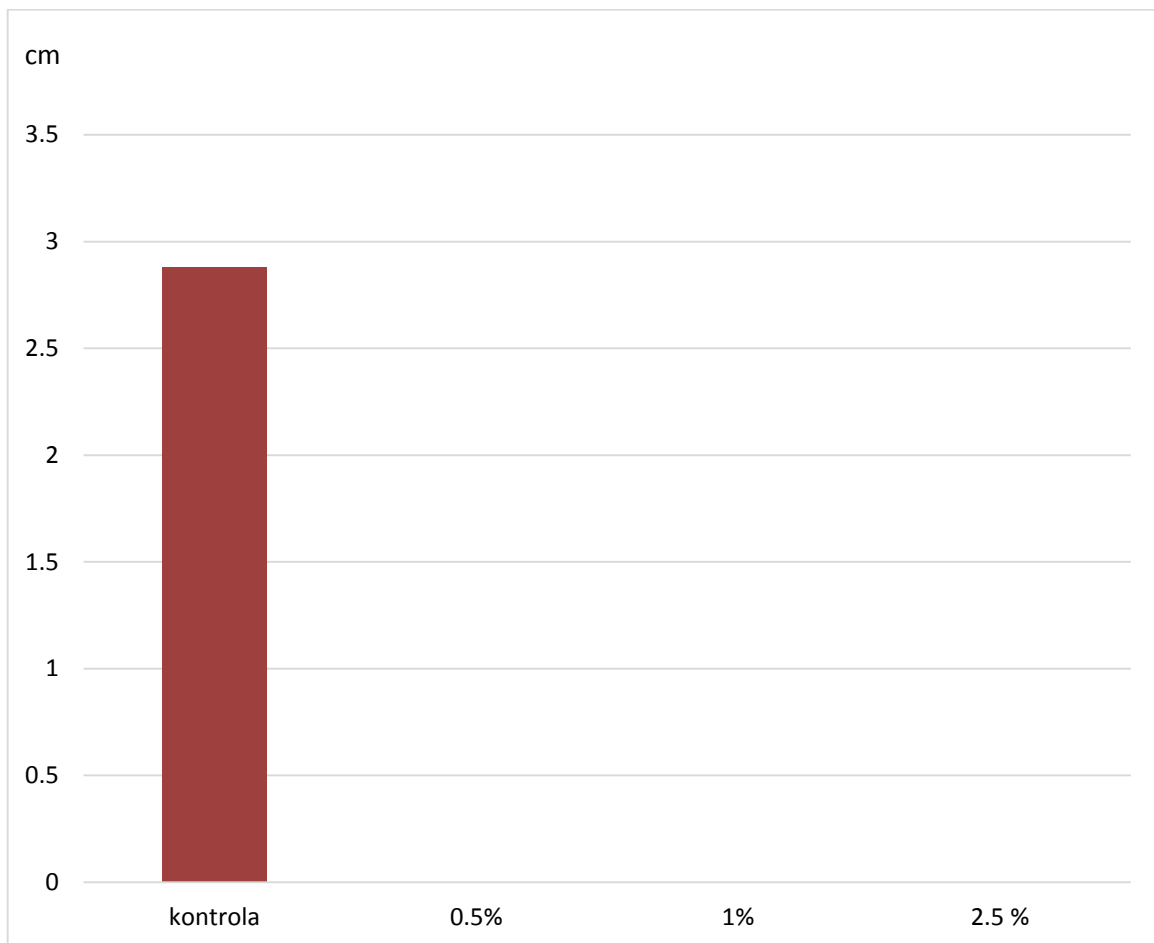
U tablici 1. prikazana je statistička analiza porasta micelija *B. cinerea* za promatrane dane mjerenja.

Tablica 1. Statistička analiza porasta micelija *B.cinerea* (cm)

2 dana od inokulacije				
	kontrola	0.5 %	1 %	2.5 %
x	2,88	0	0	0
<i>LSD</i> _{0,01} =0,1034 <i>LSD</i> _{0,05} =0.738				
5 dana od inokulacije				
X	9	0.55	0	0
<i>LSD</i> _{0,01} =0.7083 <i>LSD</i> _{0,05} =0.5052				
10 dana od inokulacije				
x	9	1,95	0	0
<i>LSD</i> _{0,01} =2,4717 <i>LSD</i> _{0,05} =1,7629				
14 dana od inokulacije				
X	9	4,50	0	0
<i>LSD</i> _{0,01} =5,6124 <i>LSD</i> _{0,05} =4,0031				
20 dana od inokulacije				
x	9	4,50	0,56	0
<i>LSD</i> _{0,01} =5,7360 <i>LSD</i> _{0,05} =4,0913				
25 dana od inokulacije				
x	9	4,50	2.23	0
<i>LSD</i> _{0,01} =6,1518 <i>LSD</i> _{0,05} =4,3878				

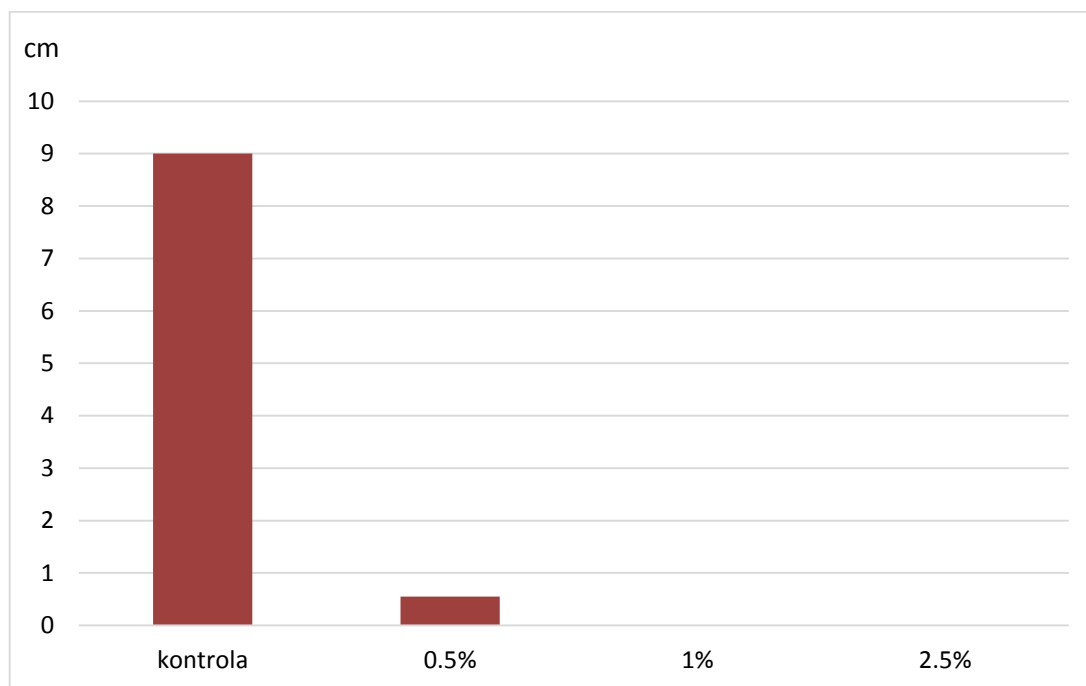
Prvi porast micelija mjereno je dva dana nakon inokulacije. Porast je mjereno za sva četiri ponavljanja različitih koncentracija alkoholne otopine propolisa i kontrolu.

Iz grafikona 1. vidljiv je značajan porast micelija kontrole, dok je na porast micelija *B. cinerea* podloga alkoholne otopine propolisa imala inhibitorni učinak za sve tri koncentracije, odnosno nije bilo porasta micelija. Između kontrole i ostalih tretmana utvrđene su statistički značajne razlike.

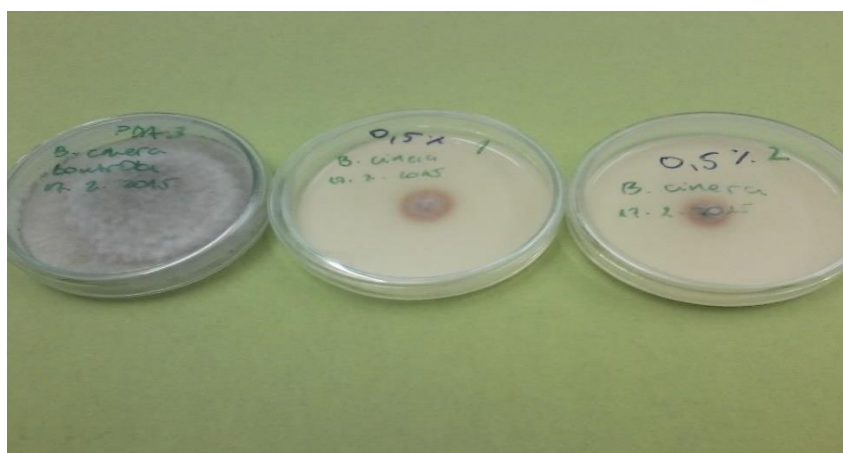


Grafikon 1. Porast micelija *B. cinerea* (cm) drugi dan od inokulacije

Drugo mjerenje urađeno je pet dana nakon inokulacije (grafikon 2). Porast micelija kontrolne skupine je bio 9 cm i stvorile su se mikrosklerocije, dok je na podlozi s 0,5% otopinom propolisa porast gljive bio 0,55 cm (slika 7.). Na podlozi sa 1% i 2,5% otopinom nije zabilježen porast. Između kontrole i ostalih tretmana utvrđene su statistički značajne razlike

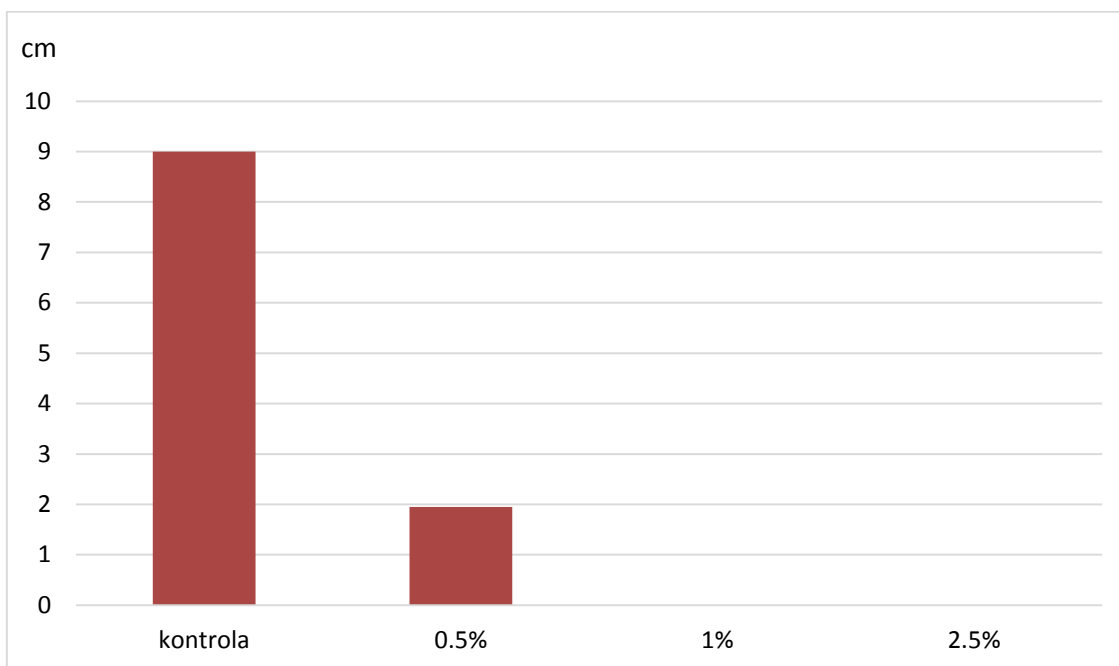


Grafikon 2. Porast micelija *B. cinerea* (cm) peti dan od inokulacije

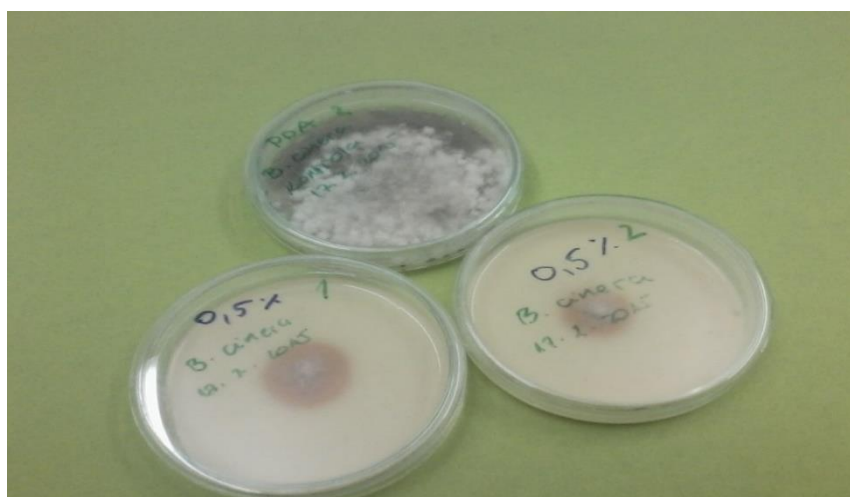


Slika 7. Porast micelija *B. cinerea* na koncentraciji 0,5 % i kontrole (5. dan) (original)

Deset dana nakon inokulacije izvršeno je treće mjerenje porasta micelija (grafikon 3). Na podlozi s 0,5% otopinom utvrđen je rast micelija od 1,95 cm (slika 8.), dok na podlozi sa 1% i 2,5% otopinom nije bilo porasta micelija. Između kontrole i ostalih tretmana utvrđene su statistički značajne razlike.

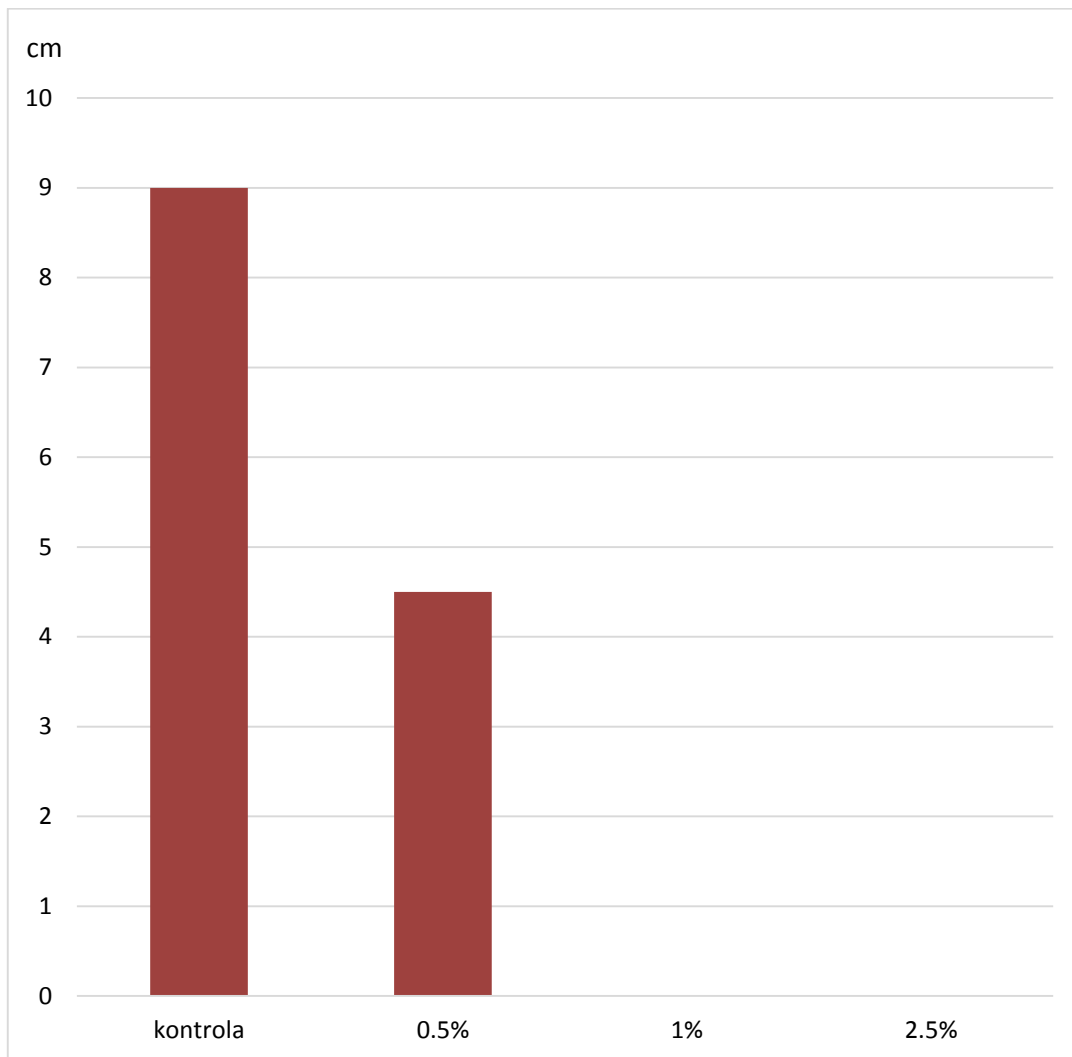


Grafikon 3. Porast micelija *B. cinerea* (cm) deseti dan od inokulacije



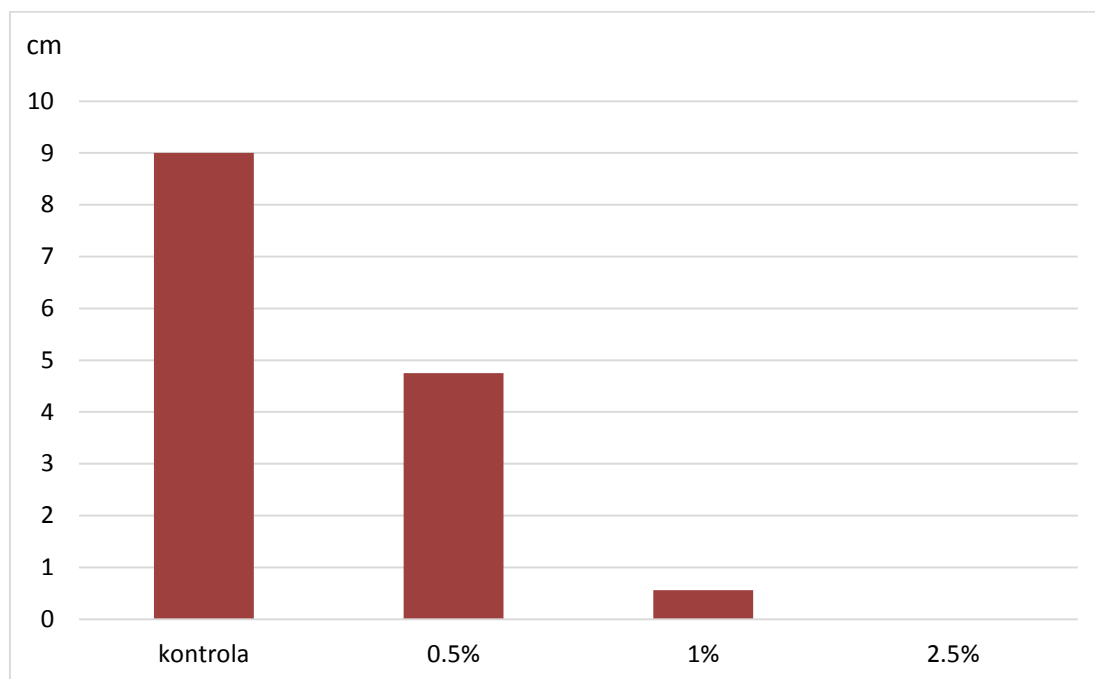
Slika 8. Porast micelija *B. cinerea* 10. dan od inokulacije (original)

Sljedeće mjerenje izvršeno je 14 dana od inokulacije. Na podlozi s 0,5% otopinom propolisa je zabilježen rast od 4,5 cm, kod podloga s 1 % i 2,5 % otopine propolisa i dalje nije zabilježen porast. Između kontrole i ostalih tretmana utvrđene su statistički značajne razlike.

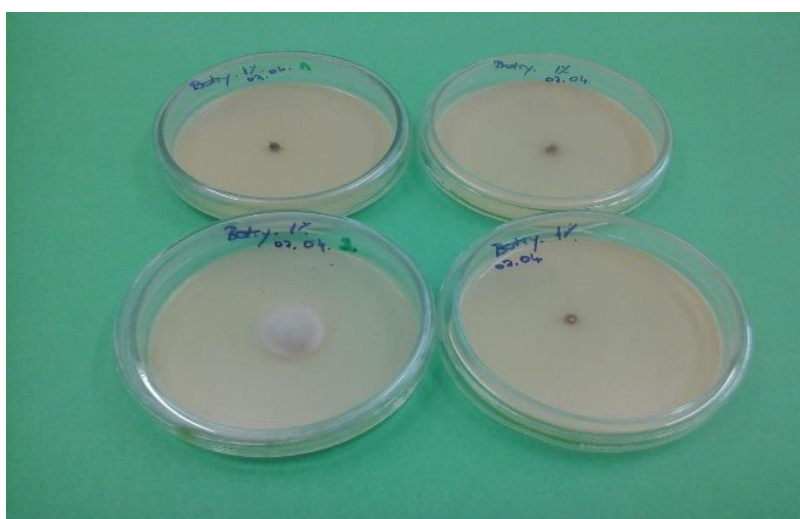


Grafikon 4. Porast micelija *B. cinerea* (cm) 14. dan od inokulacije

Peto mjerenje porasta micelija izvršeno je dvadeset dana od inokulacije. Na podlozi s 0,5% nije bilo promjena. Na podlozi s 1% otopinom propolisa utvrđene je neznatan porast micelija (slika 9.) , dok na podlozi s 2,5% otopinom nije zabilježen rast. Između svih tretmana su utvrđene statistički značajne razlike



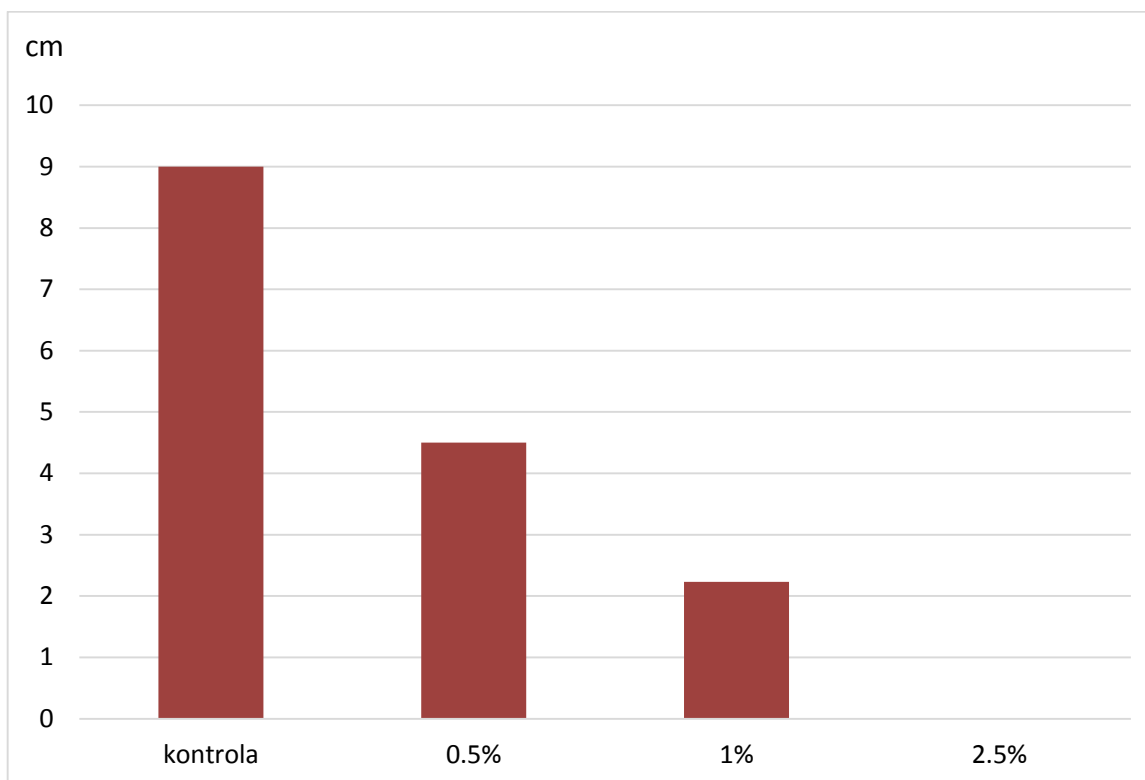
Grafikon 5. Porast micelija *B. cinerea* (cm) dvadeseti dan od inokulacije



Slika 9. Porast micelija *B. cinerea* na koncentraciji 1 % (20. dan)

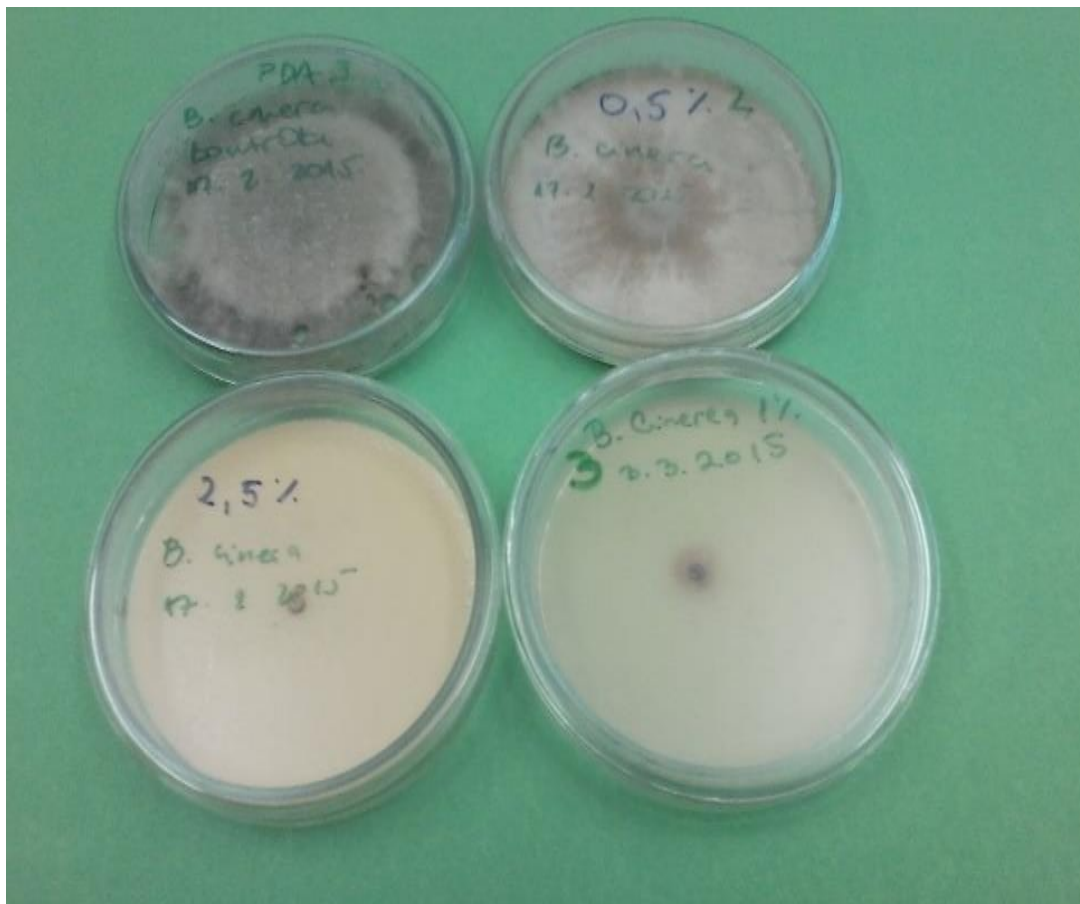
(original)

Završno šesto mjerenje izvršeno je 25. dan od inokulacije. Na podlogama s 0,5% i 2,5% otopinom propolisa nije došlo do promijene. Na podlozi s 1% otopinom zabilježen je značajniji porast u odnosu na ostale dane mjerenje (2,23 cm u prosjeku). Između svih tretmana su utvrđene statistički značajne razlike.



Grafikon 6. Porast micelij *B. cinerea* (cm) dvadestpeti dan od inokulacije

Na slici 10. prikazan je porast micelija *B. cinerea* na tri različite koncentracije propolisa (podloge s 0,5 %, 1 % i 2,5 % - tnom otopinom propolisa) i kontrola.

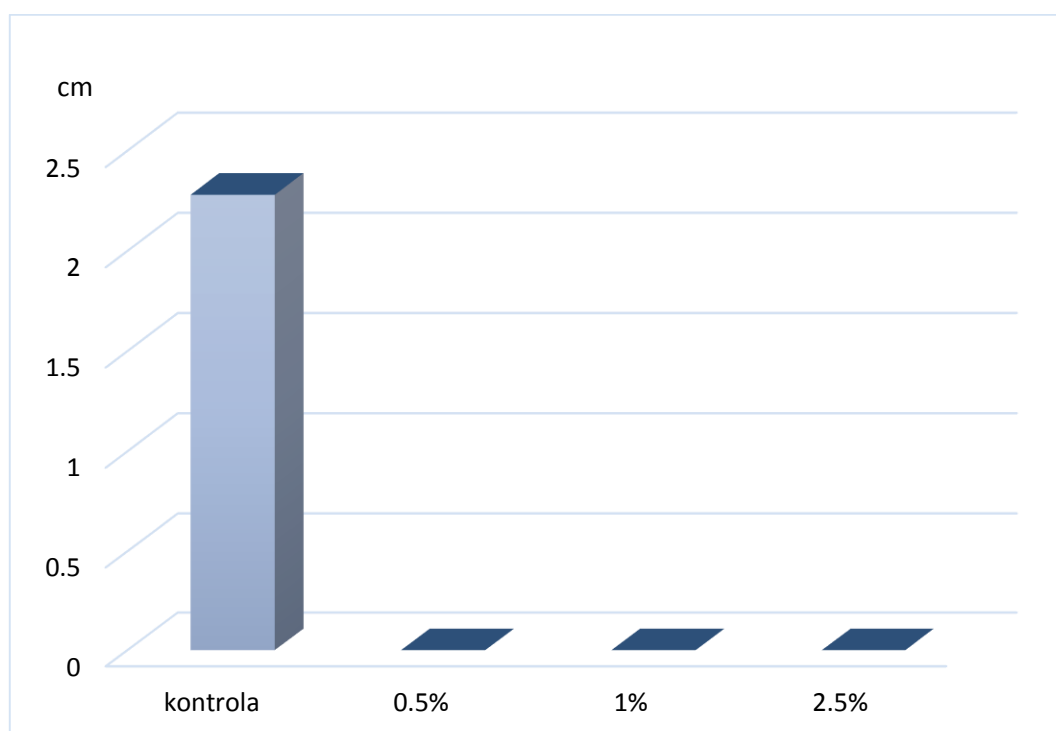


Slika 10. Porast micelija *B. cinerea* na različitim koncentracijama (original)

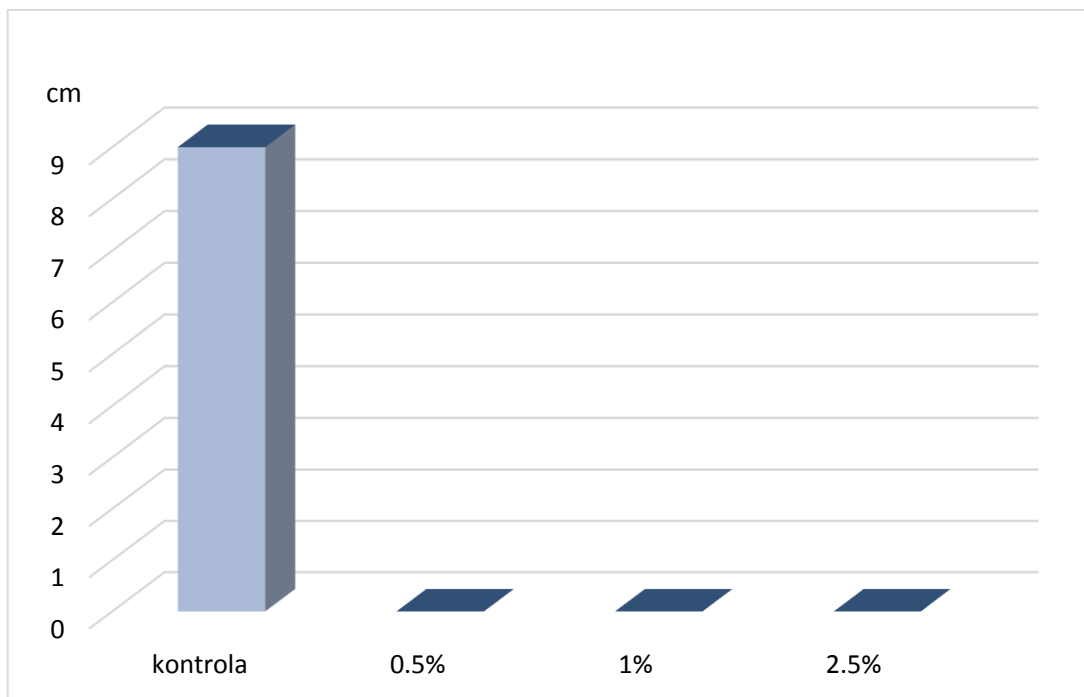
4.2 Utjecaj alkoholne otopine propolisa na porast micelija *Sclerotinia sclerotiorum*

Alkoholna otopina propolisa imala je inhibitorni učinak na porast micelija *S. sclerotiorum* u svim koncentracijama tijekom svih dana mjerenja gdje je zabilježen rast samo kontrolne skupine. Analiza varijance u ovom slučaju nije imala smisla jer u tretmanima s propolisom u svim ponavljanjima nije bilo porasta.

Dva dana od inokulacije kod micelija kontrolne skupine došlo je do porasta od 2,28 cm (grafikon 7.) dok nakon petog dana mjerenja micelij u kontroli je dosegao rub Petrijeve zdjelice promjera 9 cm (grafikon 8.).

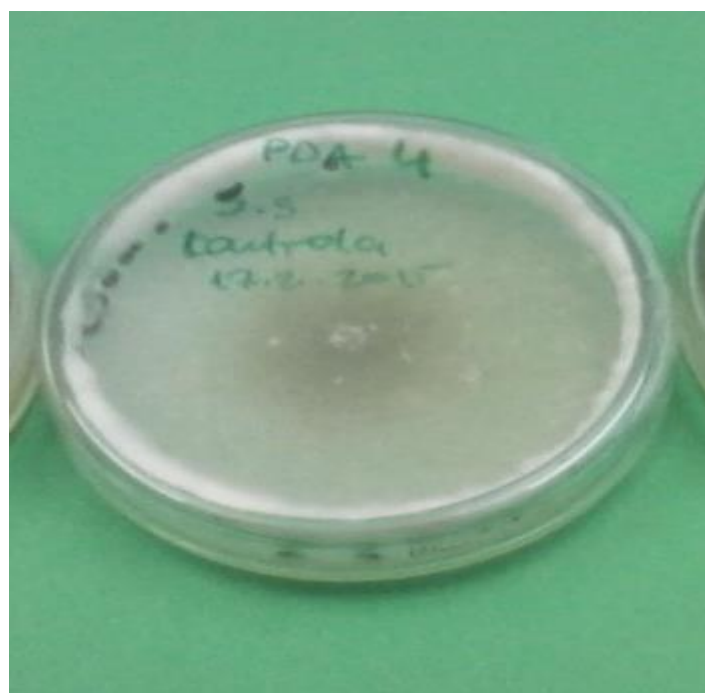


Grafikon 7. Porast micelija *S. sclerotiorum* (cm) od drugog dana mjerenja



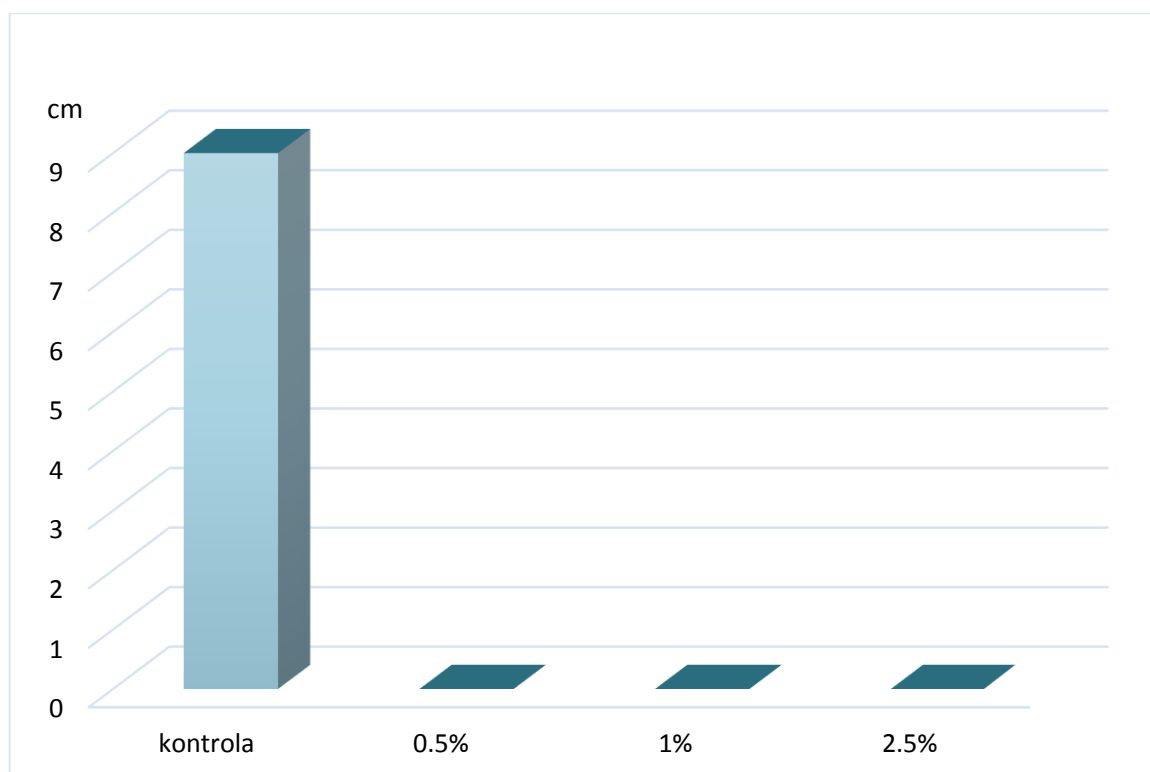
Grafikon 8. Porast micelija *S. sclerotiorum* (cm) pet dana od inokulacije

Izgled micelija *S. sclerotiorum* na PDA podlozi pet dana od inokulacije prikazan je na slici 11.



Slika 11. Porast micelija *S. sclerotiorum* kontrolne skupine (original)

Treće mjerenje porasta micelija gljive *S. sclerotiorum* izvršeno je 10 dana od inokulacije pri kojem također, nije zabilježen rast micelija na podlogama s alkoholnom otopinom propolisa u kontroli je micelij došao do ruba zdjelice i razvile su se sklerocije (grafikon 9.). Niti 14 dana od inokulacije, kada smo izvršili četvrto mjerenje, nije bilo promjena u donosu na prethodna mjerenja. Kod dva zadnja mjerenja nije došlo do promjena u odnosu na prethodna mjerenja. Peto mjerenje izvršeno je 20 dana nakon inokulacije, a šesto 25 dana od inokulacije.



Grafikon 9. Porast micelija *S. sclerotiorum* (cm) 10. dan od inokulacije

Alkoholna otopina propolisa u sve tri koncentracije 0,5 %, 1 % i 2,5 % inhibitorno je djelovala na porat micelija *S. sclerotiorum* tijekom svih mjerenja dok je kod kontrolne skupine već pri drugom mjerenju zabilježen porast od 9 cm što je prikazano na slici 12.



Slika 12. Razvoj micelija *S. sclerotiorum* na tri različite koncentracije (original)

5. Rasprava

Proučavanje rasta i morfogeneze gljiva moguće je njihovim uzgojem na različitim podlogama pri čemu se mogu kontrolirati brojni nutritivni i nenutritivni čimbenici (svjetlost, temperatura, pH podloge) (Le Tourneau, 1979.).

Bez obzira na koncentraciju sve podloge s alkoholnom otopinom propolisa pokazale su inhibitorno djelovanje na porast micelija *S. sclerotiorum* i *B. cinerea* što ukazuje na protugljivično djelovanje propolisa, a to potvrđuje istraživanje Ghisalbertia (1979.) u kojem je iz ekstrakta propolisa izolirano više komponenti kod kojih je utvrđeno antifungalno djelovanje.

Razvoj i porast micelija na PDA podlozi na kraju pokusa bio je značajno viši i brži u odnosu na razvoj i porast micelija *B. cinerea* i *S. sclerotiorum* na podlogama s alkoholnom otopinom propolisa u sve tri koncentracije. Dobiveni rezultati slažu se s rezultatima drugih prema kojima je porast micelija najbrži i najbujniji na čistoj PDA podlozi, dok na podlogama s otopinom propolisa rast micelija gljiva smanjen je za 50 % u početnom razvoju (Ozcan, 1999.) te 60 % kod nižih koncentracija (0,5%) i 100 % kod viših koncentracija (5 %) (Curifuta i sur. 2012).

Mjerenja porasta gljive *B. cinerea* pokazalo je zanimljive rezultate. Podloge s propolisom pokazale su različito djelovanje na porast gljive. Kod prvog mjerenja porasta, dva dana od inokulacije, sve tri koncentracije pokazale su inhibitorno djelovanje dok je kod kontrolne skupine izmjeren porast od 2,88 cm u prosjeku. Sljedeća mjerenja imala su značajne statističke razlike između kontrole i ostalih tretmana. Već pri drugom mjerenju u kontrolnoj skupini izmjeren je porast od 9 cm, a kod koncentracije od 0,5 % otopine propolisa 0,55 cm što pokazuje inhibitorno djelovanje veće od 70 % na porast gljive, inhibitorni učinak se smanjuje s vremenom te pri zadnjem mjerenju iznosi 50 % gdje je zabilježen porast od 4,5 cm u prosjeku. Koncentracije od 1 % i 2,5 % na početku pokusa imale su 100 % inhibitorno djelovanje na porast gljive, taj se postotak kod koncentracije od 1 % smanjuje te je pri zadnjem mjerenju izmjeren porast od 2,23 cm. Najveći inhibitorni učinak zabilježen je kod koncentracije 2,5 % gdje do kraja pokusa nije došlo do porasta gljive. Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja, također, potvrđuju inhibitorni učinak otopine propolisa na porast *B. cinereae*. Takvo istraživanje proveo je i Ozcan (1999.) koji je u pokusu koristio vodenu otopinu propolisa u koncentracijama od 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % i 4 %. Djelovanje propolisa imalo je slične rezultate, gdje je inhibitorni učinak najveći kod

koncentracije od 4 % i 2 % dok je kod ostalih koncentracija zabilježen manji od 50 % inhibitorni učinak na porast gljive *B. cinereae*.

Iako oba istraživanja potvrđuju protugljivično djelovanje propolisa na porast *B. cinereae*, alkoholna otopina propolisa pokazala se djelotvornijom jer kod koncentracije od 2,5 % ne dolazi do porasta gljive uopće. Međutim, rezultat je isti, slabiji i sporiji rast gljive na podlogama s otopinom propolisa.

Slab i sporiji rast micelija na nekim podlogama moguć je zbog prisutnosti inhibitornih tvari ili za gljivu nepovoljnog nutritivnog sastava (Purdy i Grogan, 1954.).

Djelovanje alkoholne otopine na porast *B. cinereae* potvrđeno je i u istraživanju koje su proveli Curifuta i suradnici (2012.) koji su koristili podloge koncentracije 0,5 %, 1 % i 2, 5 % i 5,5 %. Gljiva (*B. cinereae*) kao i kod našeg pokusa imala je najveći porast na koncentraciji 0,5 % gdje je inhibitorni učinak na porast gljive 50 %. Koncentraciji 1 % zabilježeno je 70 % - tni inhibitorni učinak na porast *B. cinereae*. Dok su koncentracije od 2,5 % i 5,5 % imale najveći inhibitorni učinak na porast gljive preko 90 %. Rezultati ovog istraživanja slažu se s dobivenim rezultatima našeg pokusa u kojem je najveći inhibicijorni učinak na porast (100 %) zabilježen kod najveće koncentracije od 2,5 %.

Rezultati dobiveni provedenim pokusom potvrđuju značajan utjecaj propolisa na karakteristike rasta *S. sclerotiorum*.

Sposobnost gljive *S. sclerotiorum* da svoj životni ciklus završi na različitim umjetnim i sintetičkim podlogama omogućuje praćenje njenog rasta i produkcije sklerocija u raznolikim uvjetima (Le Tourneau, 1979.).

Alkoholna otopina propolisa imala je 100 % inhibitorni učinak na porast gljive *S. sclerotiorum* u svim danima mjerenja i na sve tri koncentracije (slika 12. i 13.). Kontrolnoj skupini je zabilježen porast drugi dan od inokulacije od 2,28 cm, a već kod drugog mjerenja, peti dan od inokulacije, 9 cm. Premda se dobiveni rezultati slažu s drugim rezultatima prema kojima je porast micelija najbrži i najbujniji na PDA podlozi, dok je na nekim drugim podlogama kao što su podloga od kukuruznog brašna i lista salate (Cuong i Dohroo, 2006.) slabiji, rezultati ovog pokusa zanimljiviji su time što ni kod jedne koncentracije ni nakon 25 dana od inokulacije nije zabilježen porast *S. sclerotiorum*. Dobar porast na PDA podlozi u odnosu na druge podloge pokazuju i druge gljive kao što je *Rhizoctonia solani* (Ritchie i sur., 2009.).

Antifugalno djelovanje na gljivu *S. sclerotiorum* i njezin sporiji razvoj pod utjecajem propolisa potvrđuje i istraživanje provedeno od strane Matny i sur. u kojem je istraživano djelovanje propolisa na razvoj micelija *S. sclerotiorum* na dvije hranjive podloge mrkvi i mahuni. Proveden je pokus umjetne infekcije plodova mrkve i mahune koje su potom tretirane alkoholnom otopinom propolisa u dvije koncentracije 2 % i 5 %. Inficirani plodovi potopljeni su u obje koncentracije na 1 minutu, osušeni na zraku pri sobnoj temperaturi i stavljani u plastične kutije kako bi se pratio razvoj micelija *S. sclerotiorum* te pojava simptoma. Pokus se provodio četiri tjedna. U prva tri tjedna alkoholna otopina propolisa imala je 100 % - tno inhibitorno djelovanje na porast gljive kod ploda mahune, dok je u četvrtom tjednu razvoj gljive u odnosu na kontrolu iznosio 25 %. Na plodu mrkve inhibitorni učinak alkoholne otopine propolisa bio je znatno manji, u prvom tjednu kod koncentracije od 2 % porast gljive bio je 8,3 % u odnosu na kontrolu dok je u četvrtom tjednu iznosio 83,3 %. Koncentracija 5 % u prvom tjednu imala je 100 % - tni inhibitorni učinak na porast micelija gljive dok je taj učinak postupno smanjivan do kraja postupka te je u četvrtom tjednu porast gljive 91,7 % u odnosu na kontrolu. Rezultati ovog istraživanja pokazuju visok stupanj učinkovitosti alkoholne otopine propolisa na porast i razvoj gljive *S. sclerotiorum*.

Nekoliko sličnih istraživanja potvrdilo je antibakterijsko i antifugalno djelovanje propolisa na širok spektar patogena (Soylu i sur., 2004.).

Alkoholna otopina propolisa kod ovog pokusa pokazala se djelotvornom u suzbijanju porasta ispitivanih gljiva. Pronalazak čimbenika koji negativno utječu na produkciju i klijavost sklerocija ili ih inhibiraju i tako prekidaju životni ciklus gljive značajni su zbog mogućnosti njene kontrole i suzbijanja (Le Tourneau, 1979.).

6. Zaključak

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj alkoholne otopine propolisa u tri koncentracije (0,5%, 1%, 2,5%) na porast micelija dvije fitopatogene gljive *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Nakon provedenog pokusa i obrađenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

- Podloga s 0,5% alkoholnom otopinom propolisa najaveći inhibitorni učinak na porast micelija *Botrytis cinerea* imala je drugi dan od inokulacije gdje nije zabilježen porast, dok je taj trend postupno smanjivan, te je pri zadnjem mjerenju (25 dan) inhibitorni učinak 50 % u odnosu na kontrolnu skupinu. Ova podloga imala je manje inhibitorno djelovanje na porast gljive, ujedno je i najmanja koncentracija koju smo koristili u istraživanju. Koncentracija 1 % imala je potpuni inhibitorni učinak na porast gljive do zadnja dva mjerenja (20 i 25 dan) kad se bilježi neznatan porast 0,56 cm i 2,23 cm. Do razvoja micelija nije došlo na 2,5 %-tnoj koncentraciji koja je na porast *Botrytis cinerea* imala potpuni inhibitorni učinak, to je ujedno i podloga s najvećom koncentracijom korištenom u pokusu. Utvrđene su statistički visoko značajne razlike između porasta micelija na koncentraciji propolisa od 0,5 %, 1 %, kontroli i podlozi s 2,5 % koncentracijom.
- Porast micelija *S. sclerotiorum* nije zabilježen niti na jednoj podlozi s koncentracijama alkoholne otopine propolisa. Kontrolna skupina dosegla je svoj potpuni razvoj već peti dan od inokulacije. Inhibitorni učinak alkoholne otopine na porast micelija *S. sclerotiorum* kod ovog pokusa je 100 %.
- Navedene gljive u pokusu razvijale su se različitom brzinom i različito na sve tri koncentracije, a na takav ishod utječe više parametara. Izbor vrste gljive, sve gljive nemaju jednak porast, progresivnost gljive gdje se očituje da su neke gljive manje, a druge više progresivne. Podloge s većom koncentracijom propolisa pokazale su bolji antifungalni utjecaj.
- S obzirom da je na svim podlogama s alkoholnom otopinom propolisa razvoj gljiva bio inhibiran, a kod koncentracije 2,5 % nije došlo do razvoja gljive uopće, potvrđeno je antifungalno djelovanje propolisa na porast micelija gljive *B. cinerea* i *S. sclerotiorum*.

7. Popis literature

1. Abd El-Hady F.K., Hegazi, A.G., Wollenweber, E., (2002.): Effect of Egyptian Propolis on the Susceptibility of LDL to Oxidative Modification and its Antiviral Activity with Special Emphasis on Chemical Composition. *Z. Naturforsch C.* (9-10): 645-55.
2. Auria, D., Tecca, M., Scazzocchio, F., Renzini, V., Strippoli, V. (2003.): Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *US National library of Medicine, National institutes of health*, 15(5): 454-60.
3. Bankova V. (2005.): Recent trends and important developments in propolis research 2: 29-32.
4. Bankova V., Solange De Castro, Marcucci M. (2000.) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, Springer Verlag, 31 (1), pp.3-15.
5. Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A.G. (2002.): Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 57, 530–533.
6. Barkai-Golan, R. (2001.): Postharvest diseases of fruits and vegetables. Elsevier Science B.V., The Netherlands
7. Boland, G.J., Hall, R. (1994.): Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93-108.
8. Boyanova, L., Gregorova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., Mitov, I., Krastev, Z., (2005.): Activity of bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol.* 54(5):481-3.
9. Charabany, G. and Shtienberg, D. (1999.): Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Sweet Basil and implications for disease management. *Plant Disease*, 83: 554-560.
10. Cole RJ. Cox RH. (1981.): The trichothecenes, In: Cole RA. Cox RH. (eds) handbook of toxic fungal metabolites, Academic Press, toronto, ON, 152 – 263.
11. Coung, N.G., Dohroo, N.P. (2006.): Morphological, cultural and physiological studies on *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk root of cauliflower. *Omonrice*, 14: 71-77.
12. Curfiuta, M., Vidal, J., Sanchez-Venegas, J., Contreras, A., Salazar, L.A., Alvear, M. (2012.): The in vitro antifungal evaluation of a comercial extarct of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance 39(2): 347-359.
13. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K., Kaučić, D. (2012.): Survival of buried *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in undisturbed soil. *Helia*, 35(56): 73-78.

14. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (2004.): *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1-8.
15. Ghisalberti, E. L. (1979).—«Propolis: A review». 60, 59-84.
16. Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K. and Brygoo, Y. (1999.): Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacua*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology*, 89: 967-973.
17. Grau, C.R., and Hartman G.L. (1999.): *Sclerotinia* stem rot. 46–48.
18. Guler, P., Bozcuk, S., Mutlu, F., Sorkun, K. (2005.): Propolis effect on sclerotial formations of *Morchella conica* pers. Department of Biology and Literature, Kirikkale. 37 (4): 1015-1022.
19. Hegazi, A.G., Faten, K., Abd El-Hady (2002.): Egyptian propolis: 2-Chemical composition, antiviral and antimicrobial activity of East Nile Delta propolis. *Z. Naturforsch.* 386-391.
20. Jarvis, W.R.(1980.): Epidemiology. In: *The biology of Botrytis*. Academic Press, London, UK, 219-250.
21. Jurković, D., Čosić, J. (2004.): Bolesti suncokreta. U: knjizi *Suncokret (Helianthus annuus L.)*, Vratarić i sur. (ur.). Poljoprivredni institut Osijek, 283-328.
22. Kapš, P. (2013): Liječenje pčelinjim proizvodima, Apiterapija. Naklada Geromar.
23. Le Tourneau, D. (1979.): Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. *Phytopathology*, 69(8): 887-890.
24. Marcucci, M. C., Bankova, V.S., (1995.): Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Curr Top Phytochem* 1999.; 2:115-123.
25. Marcucci, M. C. (1995.): Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26, 83-99.
26. Miguel, M. G., Antunes, M. D. (2011.): Is propolis safe as an alternative medicine? *Journal list, J Pharm Bioallied Sci.*, 3(4): 479-495.
27. Mladenov, S., Kazandijeva, V.I. (1986.): Our Experiments on the Therapeutical, 1965 in 1986 in 2010: Medical centre of Apitherapy (APIMED) *Mladost* 4, 401.
28. Mujić, I., Alibabić, V., Travljanin, D. (2014.): Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda. *Studiograf Rijeka*.
29. Matny O.N., Abdul-Karim E. K., Naemah R. A. and Rakeb A. (2014.): Activity of propolis and *Boswellia* sp resins extract against *Sclerotinia sclerotiorum* causative

- agent of white rot disease of *Phaseolus vulgaris* and *Daucus carota* under storage conditionis. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, February - 2014; 2(1)
30. Ozcan, M., (1999.): Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites*, 5: 395-398.
 31. Radman, Lj., (1978.): *Fitopatologija, bolesti ratarskih kultura*. Univerzitet, Poljoprivredni fakultet, Sarajevo.
 32. Popova, M., Chinou, I. Marekov, I., Bankova V. (2009.): Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70: 1262-1271.
 33. Purdy, L.H. (1979.): *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology*, 69: 875-880.
 34. Purdy, L.H., Grogan, R.C. (1954.): Physiological studies of *Sclerotinia sclerotiorum* in liquid and agar culture. *Phytopathology*, 44: 36-38.
 35. Ritchie, F., Bain, R.A., McQuilken, M.P. (2009.): Effects on nutrient status, temperature and pH on mycelial growth, sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. *Journal of Plant Pathology*, 91(3): 589-596.
 36. Saharan, G.S., Mehta, N. (2008.): *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Crop Management*. Springer Science & Business Media, The Netherlands.
 37. Sforcin, J.M. and Bankova, V. (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 253-260.
 38. Shangalli, A (1990.): *la propoli*. *Lape Nostra Amica*, 12 (4):16-25.
 39. Sinclair, J.B., Backman, P.A. (1989.): *Compendium of Soybean Diseases*, American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
 40. Sinclair J.B. and Shurtleff M.C., (1975.): *Compendium of Soybean Diseases*, Am. Phytopathol Soc., St. Paul, Minnesota.
 41. Soylu, E.M., Özdemir, A.E., Ertürk, E., and Şahinler. N. (2004.): Antifungal activity of propolis against *Penicillium digitatum*, causal agent of green mold of citrus fruits. *Proceedings of the First European Conference of Apidology 'EurBee'*, Udine, Italy, 160.
 42. Topolovec-Pintarić S., Cvjetković B., Miličević T. (2002.): The sensitivity of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. to new botryticides in the protection of vineyards, *Plant Protection Science*, 38 (2), 670-673.
 43. Verhoeff, K. (1970.): Spotting of tomato fruits caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 76: 219-226.

44. Vratarić, M., Sudarić, A. (2008): Soja. Poljoprivredni institut Osijek
45. Vratarić, M. (2004): Suncokret. Poljoprivredni institut Osijek.
46. Jurković, D., Culek, M. (1997.): *Abutilon theophrasti* Medik. - a new host for *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in Croatia. // *Acta phytopathologica et entomologica Hungarica*. 32 (3/4): 307-312.
47. Willets, H.J., Wong, J.A.L. (1980.): The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review*, 46: 101-165.
48. Walker, J.C. (1969.): *Plant Pathology*, 3rd ed. McGraw-Hill, New York, 819.
49. Wraithera J.A., Stienstrab W.C. & Koenningc S.R. (2001.): Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998, 23, 122-131.
50. Yorinori J.T. and Homechin M. (1985.): *Sclerotinia* stem rot of Soybeans, its importance and reswarch in Brazil. In R. Shibles ed. *proc. 3rd World Soybean Res. Conf*, Ames, Iowa 12 - 17 1984., 582 – 588.
51. Znaor, D. (1996): *Ekološka poljoprivreda*. Nakladni zavod Globus.

8. Sažetak

Ekološka poljoprivreda u zaštiti bilja od patogena koristi se alternativnim metodama, a jedna od takvih metoda je upotreba propolisa. Propolis kao pčelinji proizvod posjeduje brojna pozitivna svojstva, kao što je antifungalno svojstvo. Baš zbog svojih povoljnih svojstava našao je primjenu u svim proizvodnim granama, pa tako i u poljoprivredi. U laboratorijskim uvjetima istraživana je utjecaj različitih koncentracija propolisa na porast gljiva *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Otopina propolisa napravljena je u tri koncentracije 0,5 %, 1 % i 2,5 %. Sve tri koncentracije imale su inhibitorni učinak na porast gljiva. Potpuno inhibitorno djelovanje na porast *B. cinerea* imala je koncentracija 2,5 %, dok je porast zabilježen na koncentraciji od 0,5 % i 1 %. *S. sclerotiorum* nije se razvila niti na jednoj koncentraciji, te je propolis pokazao potpuno inhibitorno djelovanje na porast gljive. Utvrđene su statistički visoko značajne razlike kod obje gljive između porasta micelija između kontrolne skupine i tretmana s propolisom.

Ključne riječi: propolis, ekološka poljoprivreda, gljive, inhibitorno djelovanje

9. Summary

Organic agriculture in plant protection from pathogens used alternative methods and propolis is significant product. Propolis is a bee product which is attributed to a number of positive characteristics, one of them is the antifungal activity. Widespread use of propolis affects on increasing interest how in agriculture also in other productive industries. The influence of different propolis concentration on growth and development of *Botritis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* was researched under laboratory conditions. Alcoholic propolis diluted on 3 concentrations 0.5 %, 1 % and 2.5 %. These concentrations had inhibitory effect on the growth of fungi. Full inhibitory activity on the growth of mycelium of *B. cinerea* and had a concentration of 2.5 %, the growth of mycelium of tested fungi recorded at a concentration of 0.5 % and 1 %. All three concentrations had inhibitory effect on the growth of mycelium of *S. sclerotiorum*. There were statistically significant differences in the growth of the mycelium for both fungi on the concentration of propolis of 0.5 %, 1 %, 2.5 % concentration and control.

Key words: propolis, organic agriculture, fungi, inhibitory activity

10. Popis tablica

Red.br.	Naziv tablice	Str.
Tablica 1.	Statistička analiza porasta micelija <i>B.cinerea</i> (cm).....	14.

11. Popis slika

Red. br	Naziv slike	Str.
Slika 1.	Propolis korišten za pripemanje podloge.....	10.
Slika 2.	Mješanje smjese s propolisom za dobivanje podloge.....	11.
Slika 3.	Petrijeve zdjelice s podlogom alkoholne otopine propolisa	11.
Slika 4.	Inokulacija izolata <i>S. sclerotiorum</i> i <i>B. cinereae</i> unutar laminarija.....	12.
Slika 5.	Porast gljive <i>S. sclerotiorum</i> nakon 25 dana.....	13.
Slika 6.	Porast gljive <i>B. cinerea</i> na tri različite koncentracije.....	13.
Slika 7.	Porast micelija kontrole i <i>B. cinerae</i> na podlozi 0,5 % otopine propolisa (5. dan).....	16.
Slika 8.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> 10. dan od inokulacije.....	17.
Slika 9.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> na podlozi s 1 % otopinom alkohola (20. dan).....	19.
Slika 10.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> na različitim koncentracijama.....	21.
Slika 11.	Porast micelija <i>S. sclerotiorum</i> kontrolne skupine.....	24.
Slika 12.	Razvoj micelija <i>S. sclerotiorum</i> na tri različite koncentracije.....	27.

12. Popis grafikona

Red. br	Naziv grafikona	Str.
Grafikon 1.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> (cm) drugi dan od inokulacije.....	15.
Grafikon 2.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> (cm) peti dan od inokulacije.....	16.
Grafikon 3.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> (cm) deseti dan od inokulacije.....	17.
Grafikon 4.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> (cm) 14. dan od inokulacije.....	18.
Grafikon 5.	Porast micelija <i>B. cinerea</i> (cm) dvadeseti dan od inokulacije.....	19.
Grafikon 6.	Porast micelij <i>B. cinerea</i> (cm) dvadestpeti dan od inokulacije.....	20.
Grafikon 7.	Porast micelija <i>S. sclerotiorum</i> (cm) od drugog dana mjerenja.....	23.
Grafikon 8.	Porast micelija <i>S. sclerotiorum</i> (cm) deset dana od inokulacije.....	24.
Grafikon 9.	Porast micelija <i>S. sclerotiorum</i> (cm) 10. dan od inokulacije.....	25.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Sveučilišni diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Diplomski rad

Utjecaj propolisa na razvoj *Botrytis cinerea* i
Sclerotinia sclerotiorum

Ana Kikić

Sažetak

Ekološka poljoprivreda u zaštiti bilja od patogena koristi se alternativnim metodama, a jedna od takvih metoda je upotreba propolisa. Propolis kao pčelinji proizvod posjeduje brojna pozitivna svojstva, kao što je antifungalno svojstvo. Baš zbog svojih povoljnih svojstava našao je primjenu u svim proizvodnim granama, pa tako i u poljoprivredi. U laboratorijskim uvjetima istraživana je utjecaj različitih koncentracija propolisa na porast gljiva *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Otopina propolisa napravljena je u tri koncentracije 0,5 %, 1 % i 2,5 %. Sve tri koncentracije imale su inhibitorni učinak na porast gljiva. Potpuno inhibitorno djelovanje na porast *B. cinerea* imala je koncentracija 2,5 %, dok je porast zabilježen na koncentraciji od 0,5 % i 1 %. *S. sclerotiorum* nije se razvila niti na jednoj koncentraciji, te je propolis pokazao potpuno inhibitorno djelovanje na porast gljive. Utvrđene su statistički visoko značajne razlike kod obje gljive između porasta micelija između kontrolne skupine i tretmana s propolisom.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: izv. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Broj stranica: 38

Broj grafikona i slika: 21

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 50

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: propolis, ekološka poljoprivreda, gljive, inhibitorno djelovanje

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agriculture
University Graduate Studies, Organic agriculture

Graduate thesis

Influence of propolis on growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia*

sclerotiorum

Ana Kikić

Abstract:

Organic agriculture in plant protection from pathogens used alternative methods and propolis is significant product. Propolis is a bee product which is attributed to a number of positive characteristics, one of them is the antifungal activity. Widespread use of propolis affects on increasing interest how in agriculture also in other productive industries. The influence of different propolis concentration on growth and development of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* was researched under laboratory conditions. Alcoholic propolis diluted on 3 concentrations 0.5 %, 1 % and 2.5 %. These concentrations had inhibitory effect on the growth of fungi. Full inhibitory activity on the growth of mycelium of *B. cinereae* and had a concentration of 2.5 %, the growth of mycelium of tested fungi recorded at a concentration of 0.5 % and 1 %. All three concentrations had inhibitory effect on the growth of mycelium of *S. sclerotiorum*. There were statistically significant differences in the growth of the mycelium for both fungi on the concentration of propolis of 0.5 %, 1 %, 2.5 % and control.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: DSc Karolina Vrandečić, Associate Professor

Number of pages: 38

Number of figures: 21

Number of tables: 1

Number of references: 50

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: propolis, organic agriculture, fungi, inhibitory activity

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. DSc Karolina Vrandečić, Associate professor, mentor
2. DSc Jasenka Ćosić, Full Professor, member
3. DSc Renata Baličević Associate Professor, member

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

