

Antifungalni učinak eteričnih ulja na gljivu *Rhizoctonia solani*

Ereš, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:151:958427>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Helena Ereš

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Antifungalni učinak eteričnih ulja na gljivu *Rhizoctonia solani*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Helena Ereš

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Antifungalni učinak eteričnih ulja na gljivu *Rhizoctonia solani*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Helena Ereš

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda

Smjer Hortikultura

Antifungalni učinak eteričnih ulja na gljivu *Rhizoctonia solani*

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Jasenka Čosić, mentorica
2. prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, član
3. izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda, smjer Hortikultura

Završni rad

Helena Ereš

Antifungalni učinak eteričnih ulja na gljivu *Rhizoctonia solani*

Sažetak: Cilj je ovog rada utvrditi kakav su utjecaj eterična ulja imala na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani* i koja su eterična ulja i pri kojoj količini imala antifungalni učinak. Radilo se sa sljedećim eteričnim uljima: anis, bor, cimet kora, citronela, čajevac, čempres, eukaliptus, klinčić, lavanda, naranča slatka, ružmarin i timijan. Ulja su se primjenjivala u količinama od 5, 10, 15, 25 i 50 μ l, a zona inhibicije mjerila se četvrti i sedmi dan. Učinci dvanaest eteričnih ulja na gljivu *Rhizoctonia solani* rađeni su u uvjetima *in vitro*. Najjači antifungalni učinak imalo je eterično ulje timijana i anisa koje je izuzetno inhibiralo rast micelija i s primjenom u najmanjoj količini. Uz eterično ulje timijana i anisa jak utjecaj imala su i ulja lavande, citronele i čajevca. Najslabije antifungalno djelovanje imalo je eterično ulje eukaliptusa, bora i naranče slatke koja pri određenim količinama nisu ni imala antifungalni učinak.

Ključne riječi: *Rhizoctonia solani*, eterična ulja, inhibicija, antifungalni učinak

20 stranica, 2 tablice, 15 slika, 18 literaturnih navoda

Završni rad pohranjen je u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture

BSc Thesis

Helena Ereš

Antifungal activity of essential oils against fungus *Rhizoctonia solani*

Summary: The aim of this study was to determine what kind of effect did the essential oils have on the mycelial growth of the fungus *Rhizoctonia solani*, which essential oils and at what quantity had an antifungal effect. The study was done with the following essential oils: anise, pine, cinnamon bark, citronella, tea tree, cypress, eucalyptus, clove, lavender, sweet orange, rosemary and thyme. Oils were applied in quantities of 5, 10, 15, 25 and 50 μ L, and the zone of inhibition was measured on the fourth and the seventh day of incubation. The effects of twelve essential oils on the fungus *Rhizoctonia solani* were performed *in vitro*. The strongest antifungal effect had the essential oil of thyme and anise which completely inhibited the mycelial growth even in the smallest amount of application. Along with the essential oil of thyme and anise, the lavender, citronella and tea tree oils also had a strong impact. The weakest antifungal effect had the essential oil of eucalyptus, pine and sweet orange, which in certain quantities did not even have an antifungal effect.

Key words: *Rhizoctonia solani*, essential oils, inhibition, antifungal activity

20 pages, 2 tables, 15 figures, 18 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE.....	3
2.1. Priprema hranjive podloge	3
2.2. Eterična ulja.....	5
2.3. Postavljanje pokusa	5
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	8
3.1. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja 4. dan od nacjepljivanja.....	8
3.2. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja 7. dan od nacjepljivanja.....	13
4. ZAKLJUČAK.....	18
5. LITERATURA	19

1. UVOD

Rhizoctonia solani Kühn (teleomorf *Tanatephorus cucumeris* (Frank) Donk najznačajnija je vrsta roda *Rhizoctonia*, koja je stanovnik tla i izraziti polifag s više od 200 biljnih domaćina te uzrokuje velike gubitke na različitim kultiviranim vrstama, ali parazitira i brojne korove. Najznačajniji domaćini među kultiviranim vrstama pripadaju porodici *Solanaceae* i uzrokuju velike štete na povrću, cvijeću i ratarskim kulturama. *Rhizoctonia solani* jedna je od najproučavanijih gljiva iz roda *Rhizoctonia*, a prvi je put utvrđena na bolesnom gomolju krumpira te nakon toga i opisana 1858. godine (Sneh i sur., 1993.). Napada prvenstveno sjeme, hipokotil i korijen biljaka, ali je ovaj patogen također sposoban zaraziti i nadzemne dijelove biljaka. Prezimljuje kao micelij ili sklerocije u tlu i na biljnim ostacima. Prisutna je u svim agroklimatskim područjima svijeta te se može pronaći i u svakom tlu bez obzira na njegovu teksturu, strukturu, kiselost i druge karakteristike.

Zaštita uzgajanih biljaka od ovog patogena, kao i svih drugih zemljišnih patogena, ponajviše se svodi na provođenje agrotehničkih mjera poput izbora tla, plodoreda, dubokog zaoravanja biljnih ostataka i uravnotežene gnojidbe te značajno manje na primjenu kemijskih fungicida budući da je njihova učinkovitost na ove parazite upitna. S obzirom na to da učestala primjena fungicida u velikoj mjeri zagađuje atmosferu, vodu i tlo te da se oni sporo razgrađuju u okolišu, posljednjih desetljeća se intenzivno provode istraživanja o mogućnosti primjene nepesticidnih mjera koje manje štete okolišu (Holmes i Eckert, 1999.). Povećana i učestala uporaba kemijskih fungicida može dovesti do rezistentnosti gljiva na različite aktivne tvari što posljedično dovodi do gubljenja učinkovitosti fungicida. Osim navedenoga, povećana uporaba fungicida dovodi i do akumulacije rezidua fungicida u hrani iznad dopuštene propisane količine (El-Nahhal, 2004.). Budući da je sve značajniji trend izbjegavanja kemijskih fungicida i ekološki uzgoj biljaka, eterična ulja svojim djelovanjem potencijalno omogućuju drugačiji pristup zaštiti od uzročnika biljnih bolesti. Eterična ulja su hlapljivi, prirodni, složeni spojevi intenzivnog mirisa koji se dobivaju iz biljaka, a imaju antifungalno, antivirusno i antibakterijsko djelovanje (Kalemba i Kunicka 2003., Bakkali i sur. 2008., Banihashemi i Abivardi, 2011.). Dobivaju se hidrodestilacijom i često se tradicionalno koriste kao zaštita za žitarice i povrće tijekom skladištenja (Murray, 2000.). S obzirom na to da oko 300 eteričnih ulja ima komercijalnu važnost, najviše se koriste u sanitarnoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i agronomskoj industriji (Bakkali i sur. 2008.). Ona su prikladna zamjena za kemijske fungicide, ekološki su prihvatljiva i biorazgradiva (Zygadlo i Grosso, 1995.). Antifungalni učinak eteričnih ulja

ovisi o sastavu ulja, okolišnim uvjetima i zemljopisnom podrijetlu biljaka iz kojih se ulja dobivaju, primijenjenim količinama ulja, načinu primjene, ali i vrsti gljive na koju ulja djeluju. Mehanizam njihova djelovanja temelji se pretežito na uništavanju strukture staničnih membrana kod gljiva, blokiranju izgradnje membrane kao i inhibiciji disanja stanica, rasta micelija i klijanja spora (Harris, 2002.).

Cilj ovoga rada je u *in vitro* uvjetima utvrditi utjecaj dvanaest eteričnih ulja primijenjenih u različitim količinama na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani*.

2. MATERIJAL I METODE

Istraživanje antifungalnog učinka dvanaest eteričnih ulja na rast micelija fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani* provedeno je u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek.

2.1. Priprema hranjive podloge

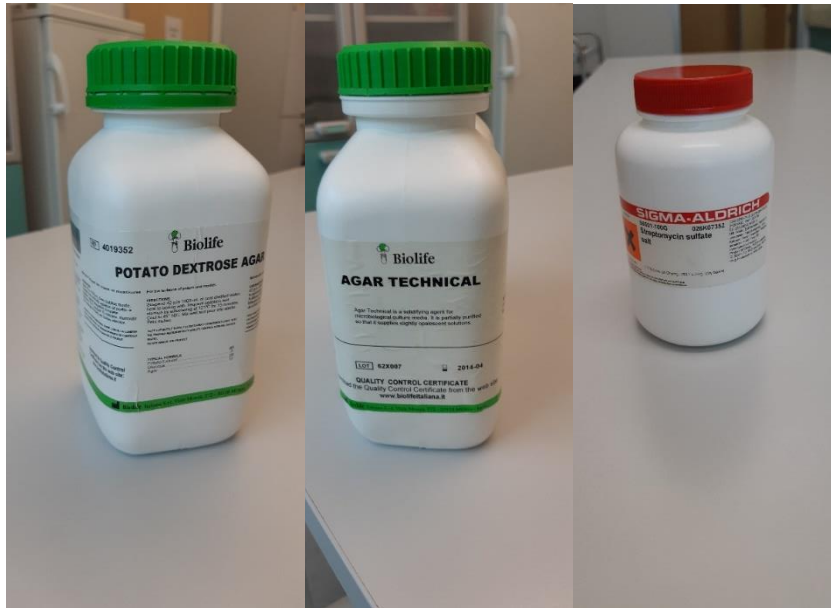
Prije samoga postupka izrade hranjive podloge potrebno je Petrijeve zdjelice sterilizirati u autoklavu. Autoklav je parni sterilizator koji se koristi za sterilizaciju svih vrsta materijala i tekućina. Po deset Petrijevih zdjelica stavlja se u posebne aluminijske stalke koji se potom stavljaju u autoklav na temperaturu 120°C u trajanju 20 minuta (Slika 1.). Kako bi Petrijeve zdjelice ostale sterilizirane ne smiju se otvarati sve do sipanja hranjive podloge.



Slika 1. Petrijeve zdjelice u aluminijskim stalcima u autoklavu

Izvor: Ereš, H. 2019.

Za detaljno mjerenje sastojaka potrebnih za pripremu podloge koristi se digitalna vaga na kojoj se odvaži 21 g krumpir dekstroznog agara i 1,40 g tehničkog agara (Slika 2.). U Erlenmeyerovu tikvicu, u kojoj se nalazi 500 mL destilirane vode, dodaju se izvagani sastojci i kuhaju se u vodenoj kupelji sat vremena, odnosno dok se agar ne otopi. Nakon toga se, tikвица zatvorena aluminijskom folijom, stavlja u autoklav na sterilizaciju (Slika 3.). Vrlo važno je, nakon sterilizacije u tikvicu dodati 0,50 g antibiotika rastopljenog u 2 mL sterilne destilirane vode.



Slika 2. Sastojci korišteni za izradu hranjive podloge

Izvor: Ereš, H. 2019.



Slika 3. Hranjiva podloga u Erlenmeyerovoj tikvici

Izvor: Ereš, H. 2019.

Pripremljena hranjiva podloga izlijeva se u sterilizirane Petrijeve zdjelice (10 mL podloge u svaku zdjelicu). Nakon što se podloga ohladi Petrijeve zdjelice stavljaju se u hladnjak na čuvanje (Slika 4).



Slika 4. Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom u hladnjaku

Izvor: Ereš, H. 2019.

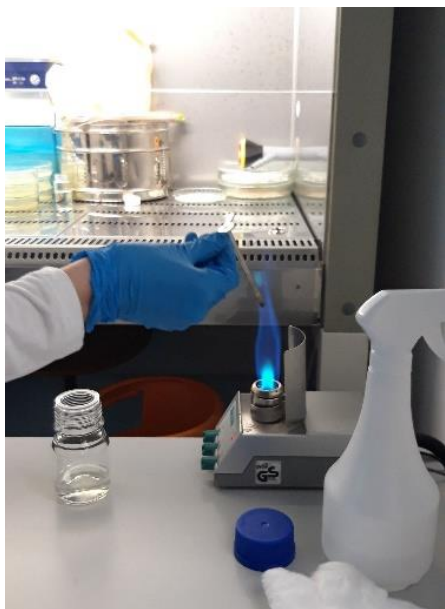
2.2. Eterična ulja

U istraživanju upotrijebljeno je dvanaest eteričnih ulja kako bi se utvrdilo djelovanje na rast micelija. Korištena su sljedeća eterična ulja: anis (*Pimpinella anisum* L.), bor (*Pinus sylvestris* L.), cimet kora (*Cinnamomum verum* Bercht & Presl), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), čajevac (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), čempres (*Cupressus sempervirens* L.), eukaliptus (*Eucalyptus globulus* Labill.), klinčić (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry), lavanda (*Lavandula angustifolia* L.), naranča slatka (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) i timijan (*Thymus vulgaris* L.). Sva eterična ulja korištena su u količinama 5, 10, 15, 25 i 50 μ L.

2.3. Postavljanje pokusa

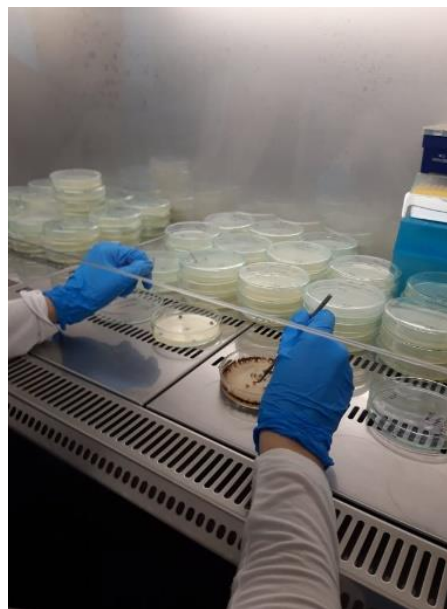
Cijelo postavljanje pokusa obavljeno je u komori za rad u čistom (laminar). Pokus je postavljen u tri ponavljanja za svaku količinu i svako eterično ulje. Prije samog početka potrebno je cijelu površinu u laminaru dezinficirati etilnim alkoholom. Na svaku Petrijevu zdjelicu potrebno je napisati naziv gljive, naziv eteričnog ulja, primijenjenu količinu ulja, broj ponavljanja i datum. Sav pribor koji će se pri postavljanju pokusa koristiti neophodno je sterilizirati na plameniku (Slika 5.). Čista kultura gljive *Rizoctonia solani* buši se pomoću posebnog alata, metalnog kružnog rezača, uz sami rub Petrijeve zdjelice, a potom se pomoću sterilne laboratorijske igle uzima isječak i postavlja na određeno mjesto u novu Petrijevu zdjelicu (Slika 6.). Ispod Petrijeve zdjelice s pripremljenom hranjivom podlogom stavlja se uzorak s označenim mjestima gdje je potrebno staviti gljivu iz čiste kulture. Gljiva se stavlja nasuprotno na četiri mjesta, a u samo središte zdjelice pomoću pincete

stavlja se okrugli sterilni filter papir (Slika 7.). Kad se sve pripremljene Petrijevke naprave na isti način, pomoću pipete stavlja se određena vrsta i količina eteričnog ulja na sredinu filter papira (Slika 8.). U kontrolnoj varijanti umjesto eteričnog ulja aplicira se sterilna destilirana voda.



Slika 5. Sterilizacija pribora

Izvor: Ereš, H. 2019.



Slika 6. Postavljanje čiste kulture pomoću

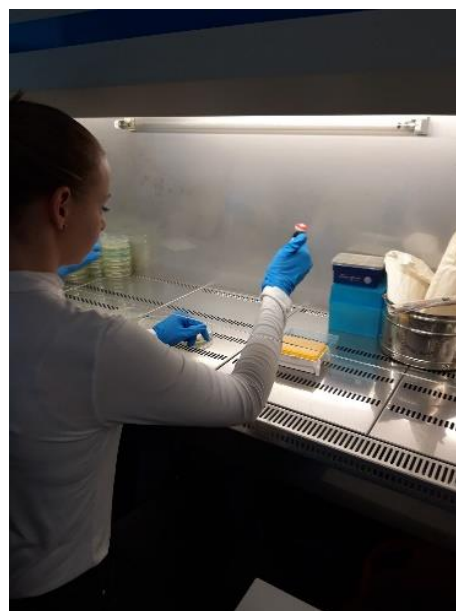
igle na hranjivu podlogu

Izvor: Ereš, H. 2019.



Slika 7. Čista kultura gljive postavljena na
označena mjesta

Izvor: Ereš, H. 2019.



Slika 8. Aplikacija eteričnog ulja pomoću pipete

Izvor: Ereš, H. 2019.

Sve se Petrijeve zdjelice odnose u termostat komoru na temperaturu 22°C i relativnu vlažnost zraka 70%. Svjetlosni režim postavljen je na 12 sati svjetlo / 12 sati tama. Četvrti i sedmi dan nakon postavljanja pokusa mjerena je zona inhibicije na način da se pomoću ravnala mjerio prazan prostor od filter papira do ruba micelija gljive.

Svi podaci razvoja micelija bilježeni su u tablici, a nakon obavljenih svih mjerenja izračunavala se srednja vrijednost. Statistička obrada podataka napravljena je pomoću programa Statistica for Windows 10.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj je ovog istraživanja utvrditi postoje li statistički značajne razlike u djelovanju dvanaest različitih eteričnih ulja na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani* međusobno i u odnosu na kontrolu i postoje li razlike u djelovanju istog ulja pri primjeni u različitim količinama.

3.1. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja 4. dan od nacjepljivanja

Fungistatični učinak eteričnih ulja primijenjenih u različitim količinama na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani* 4. dan od nacjepljivanja prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Fungistatični utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *Rhizoctonia solani* četvrti dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

Ulje	10 µl	15 µl	25 µl	50 µl	LSD	
					0,05	0,01
Lavanda	23,50	28,83	29,92	30,00	0,96	1,40
Citronela	28,42	28,33	29,58	29,75	1,78	2,59
Čajevac	27,73	29,67	30	29,92	1,84	2,67
Cimet kora	29,58	26,75	29,92	27,92	1,97	2,86
Eukaliptus	0	0	23,58	19,25	2,26	3,29
Bor	0	0	29,17	20,25	1,96	2,85
Timijan	29,58	29,00	30	29,83	1,89	2,75
Ružmarin	0	0	29,67	29,92	0,61	0,88
Anis	29,58	29,58	30	30	0,61	0,81
Naranča slatka	0	0	2,50	0	3,68	5,35
Čempres	0	10,42	30	28,17	3,81	5,55
Klinčić	9,08	12,67	26	11,67	3,60	5,24
Kontrola	0	0	0	0		
LSD 0,05	1,18	2,43	2,58	1,45		
0,01	1,60	3,29	3,48	1,96		

Budući da je već nakon četiri dana od inokulacije zona inhibicije kod svih varijanti u pokusu (s uljima i u kontroli) bila 0 mm, rezultati za 5 µL nisu prikazani. Prema tome ispitivana ulja u količini od 5 µL nisu negativno djelovala na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani*.

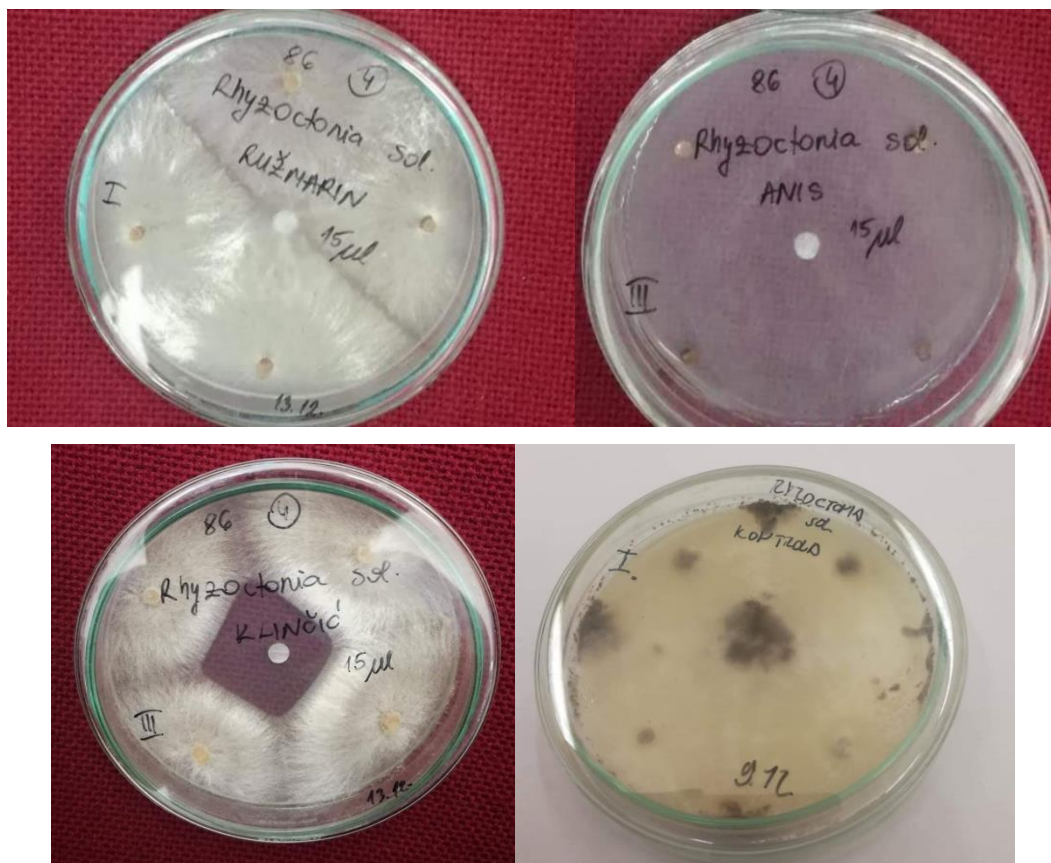
Četvrti dan od nacjepljivanja kod primjene ulja eukaliptusa, bora, ružmarina, naranče slatke i čempresa u količini 10 µL kao i kontrolnoj varijanti s destiliranom vodom, micelij

gljive *Rhizoctonia solani* prerastao je cijelu Petrijevu zdjelicu (zona inhibicije 0 mm). Iz gore opisanoga vidljivo je da navedena ulja u ovoj količini nisu imala fungistatični učinak.

S druge strane ulja lavande, citronele, čajevca, cimeta kore, timijana, anisa i klinčića primijenjena u istoj količini statistički su vrlo značajno inhibirala porast micelija u odnosu na sva druga ulja i kontrolu. Ulja timijana, anisa, čajevca, cimeta kore i citronele statistički vrlo značajno jače inhibiraju porast micelija *R. solani* u odnosu na ulja lavande i klinčića, a ulje lavande statistički vrlo značajno jače inhibira porast micelija u odnosu na ulje klinčića. Ulje klinčića, lavande i čempresa u količini 10 μL ima statistički vrlo značajno slabiji antifungalni učinak u odnosu na ista ulja kod primjene u količinama 15, 25 i 50 μL .

Kod primjene eteričnih ulja u količini 15 μL utvrđeno je da eterična ulja eukaliptusa, bora, ružmarina i naranče slatke nisu imala negativan utjecaj na razvoj micelija kao ni kontrola. Sva ostala ulja statistički su vrlo značajno inhibirala rast micelija u odnosu na kontrolu, ali i na prethodno navedena četiri ulja. Ulja čempresa i klinčića statistički su vrlo značajno slabije inhibirala rast micelija u odnosu na ulja lavande, citronele, čajevca, cimeta, timijana i anisa. Ulje cimeta kore statistički je značajno slabije inhibiralo porast micelija u odnosu na ulje anisa. Ulje čempresa u količini 15 μL statistički vrlo značajno slabije, a ulje lavande statistički značajno slabije inhibira rast gljive u odnosu na ista ulja, ali u količinama 25 i 50 μL .

Razvoj micelija gljive *Rhizoctonia solani* pri primjeni ulja klinčića, ružmarina i anisa u količini 15 μL i kontrole prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Razvoj micelija pri primjeni eteričnih ulja ružmarina, anisa i klinčića u količini 15 μ L u odnosu na kontrolu

Izvor: Ereš, H. 2019.

Pri primjeni ulja u količini 25 μ L utvrđeno je da su sva ulja, izuzev ulja naranče slatke, statistički vrlo značajno jače inhibirala rast micelija u odnosu na kontrolu te da su ulja čajevca, timijana, anisa i čempresa potpuno inhibirala rast micelija. Antifungalni učinak ulja lavande, citronele, čajevca, cimet kore, timijana, anisa, bora, ružmarina i čempresa statistički je vrlo značajno jače u odnosu na ulja naranče slatke, klinčića i eukaliptusa. Ulje naranče slatke nije inhibiralo rast micelija pri primjeni u količini 25 μ L.

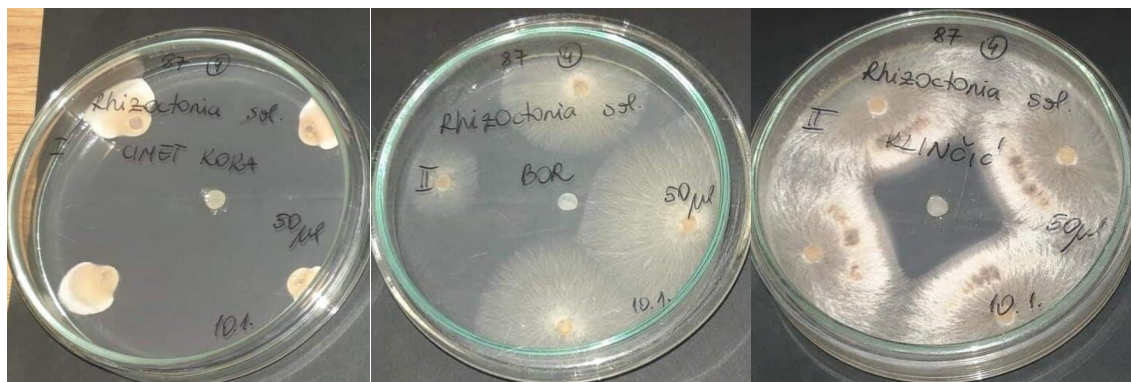
Pri najvećoj primijenjenoj količini (50 μ L) eterična ulja lavande i anisa potpuno su inhibirala rast gljive. Prema Huang i sur. (2010.) spoj antenol, glavna komponenta ulja anisa, ima vrlo jako antifungalno djelovanje na rast micelija gljiva *F. graminearum* i *Fusarium oxysporum* (f. sp. *cucumerinum*, f. sp. *lycopersici*, f. sp. *vasinfectum*). U primijenjenoj količini 50 μ L jedino ulje naranče slatke nije imalo negativni učinak na rast gljive *R. solani* (zona inhibicije 0 mm) (Slika 10.). Naši se rezultati podudaraju s rezultatima Lee i sur. (2007.) koji su utvrdili da ulje naranče slatke nije imalo inhibitorni učinak na *R. solani*, ali ni na razvoj gljiva *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Pythium ultimum*. Ulja eukaliptusa, bora i klinčića imala

su statistički vrlo slabiji antifungalni utjecaj pri primjeni u količini 50 μ L u odnosu na ostala ulja pri istoj količini. Ulje klinčića statistički je vrlo značajno slabije inhibiralo porast micelija u odnosu na sva ulja izuzev ulja naranče slatke. Na Slici 11. prikazan je rast micelija primjenom eteričnih ulja cimet kore, klinčića i bora u količini 50 μ L.



Slika 10. Razvoj micelija kod primjene ulja naranče slatke u količini 50 μ L 4 dana od nacepljivanja

Izvor: Ereš, H. 2020.



Slika 11. Antifungalni utjecaj eteričnog ulja bora, klinčića i kore cimeta u količini 50 μ L 4 dana od inokulacije

Izvor: Ereš, H. 2020.

Eterična ulja bora, eukalptusa i klinčića u količini su od 25 μ L statistički vrlo značajno jače inhibirala rast micelija u odnosu na rast pri primjeni ulja u količini 50 μ L. Za ulja lavande, čajevca, citronele, cimet kore, timijana, ružmarina, anisa i čempresa nisu utvrđene statistički značajne razlike u fungistatičnom učinku primjenom u količinama 25 i 50 μ L.

Najjače antifungalno djelovanje četvrti dan od inokulacije utvrđeno je kod primjene eteričnih ulja anisa i timijana u svim količinama u odnosu na kontrolu i sva ostala ulja.

Ulje timijana imalo je jak antifungalni učinak na porast micelija *R. solani* u našim istraživanjima, ali je pokazalo jak antifungalni učinak primijenjeno u količini 250 ppm i na gljive *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* i *Alternaria citri* (Arras i Usai 2001.). Ćosić i sur. (2010.) ispitali su utjecaj eteričnih ulja na dvanaest fitopatogenih gljiva, a eterična ulja klinčića, ružmarina, anisa, lavande i timijana imala su značajan antifungalni učinak na *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Diaporthe helianthi*, *Diaporthe caulivora*, *Diaporthe longicolla*, *Phomopsis viticola*, *Helminthosporium sativum*, *Colletotrichum coccodes* i *Rhizoctonia solani*.

Prema rezultatima Tanović i sur. (2005.) najbolji antifungalni učinak na porast *Botrytis cinerea* imaju ulja timijana, cimeta i anisa za razliku od ulja naranče koje je pokazalo najslabije djelovanje.

Palfi (2017.) također navodi da je od deset ispitanih eteričnih ulja na porast micelija *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* i *Colletotrichum coccodes* najjače inhibitorno djelovanje imalo ulje timijana.

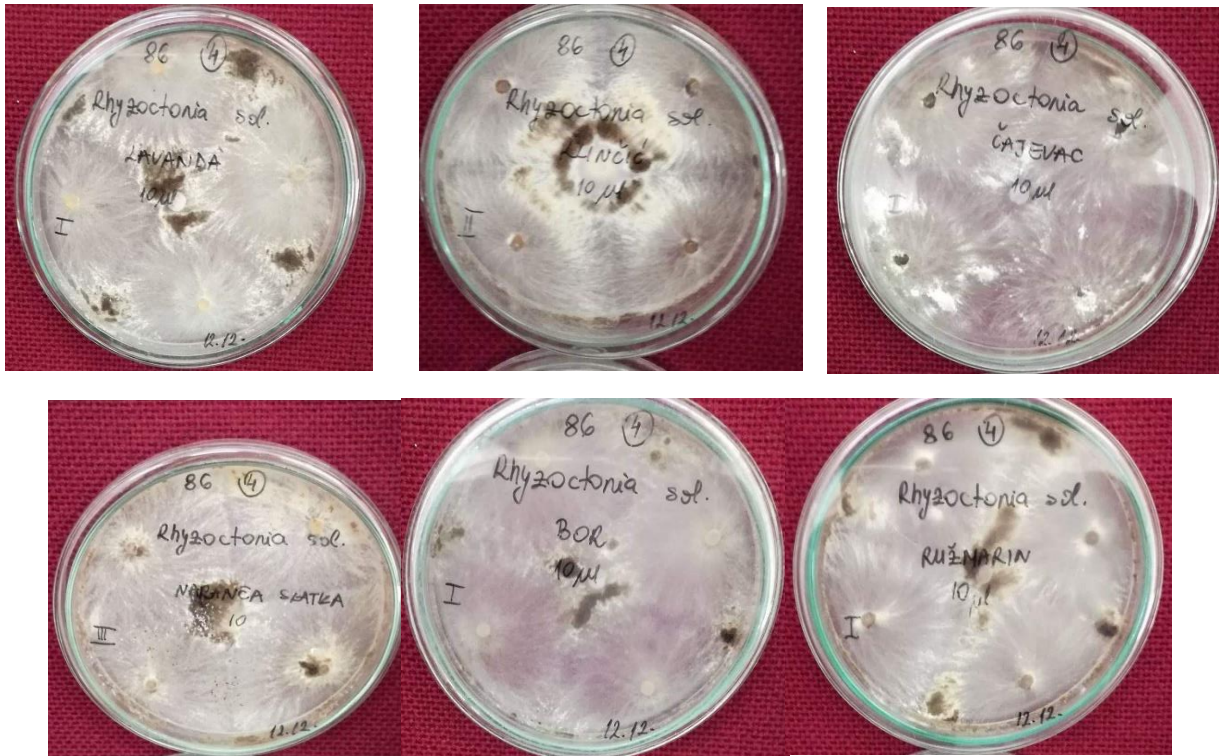
3.2. Antifungalno djelovanje eteričnih ulja 7. dan od nacjepljivanja

Fungistatični učinak eteričnih ulja primijenjenih u različitim količinama na porast micelija gljive *Rhizoctonia solani* 7. dan od nacjepljivanja prikazan je u Tablici 2.

Tablica 2. Fungistatični utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *Rhizoctonia solani* sedmi dan od nacjepljivanja (zona inhibicije u mm)

Ulje	10 μ l	15 μ l	25 μ l	50 μ l	LSD	
					0,05	0,01
Lavanda	0	0,58	29,92	30,00	0,99	1,44
Citronela	13,75	26,00	29,58	29,83	4,85	7,06
Čajevac	0	29,67	30,00	29,92	0,38	0,56
Cimet kora	28,75	18,00	29,83	27,25	3,70	5,39
Eukaliptus	0	0	0	0		
Bor	0	0	3,50	0	0,24	0,34
Timijan	29,58	29,00	30,00	29,83	1,54	2,24
Ružmarin	0	0	11,33	29,92	3,53	5,13
Anis	29,25	29,57	30,00	30,00	1,03	1,51
Naranča slatka	0	0	0	0		
Čempres	0	0	8,92	9,75	2,08	3,03
Klinčić	0	0	16,92	0	2,31	3,36
Kontrola	0	0	0	0		
LSD 0,05	2,12	2,19	2,27	1,09		
0,01	2,86	2,96	3,07	1,48		

Sedam dana od nacjepljivanja gljive utvrđeno je da kod primjene ulja u količini 10 μ L, ulja lavande, čajevca, eukaliptusa, bora, ružmarina, naranče slatke, čempresa i klinčića, inhibiraju rast micelija gljive *Rhizoctonia solani* pri čemu je zona inhibicije iznosila 0 mm jednako kao i u kontrolnoj varijanti (Slika 12.). Eterična ulja citronele, cimeta kore, timijana i anisa statistički su vrlo značajno jače inhibirala porast micelija u odnosu na prethodno navedena ulja i kontrolu. Ipak, ulje citronele statistički je vrlo značajno slabije inhibiralo rast gljive u odnosu na ulja timijana, anisa i cimeta kore.



Slika 12. Eterična ulja koja nemaju antifungalni učinak 7 dana od naciepljivanja (10 μ L)

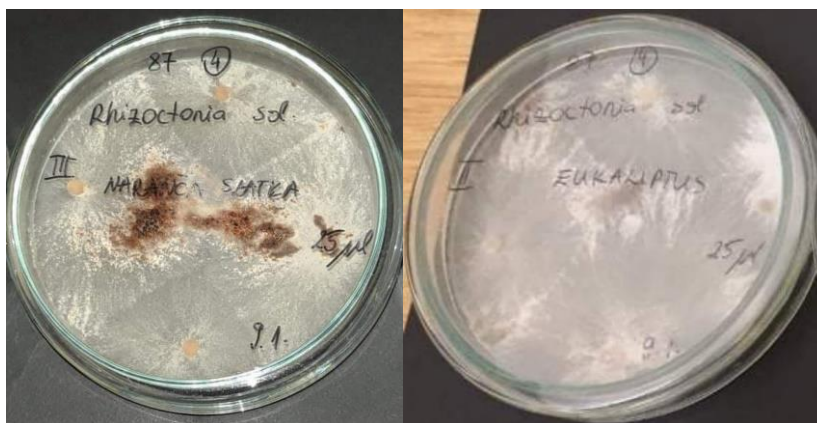
Izvor: Ereš. H. 2019.

Pri primjeni ulja u količini 15 μ L statistički vrlo značajno jače antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu imaju ulja čajevca, timijana, anisa, cimet kore i cintronele, koja su gotovo potpuno inhibirala rast micelija *R. solani*. Ista ulja imaju i vrlo značajno jače inhibitorno djelovanje u odnosu na sva ostala testirana ulja (Slika 13). Ulja cimet kore i citronele vrlo značajno manje inhibiraju rast gljive u odnosu na ulja čajevca, timijana i anisa. Između ova tri ulja nema statistički značajnih razlika u djelovanju. Ulja eukaliptusa, bora, ružmarina, naranče slatke, čempresa i klinčića nemaju inhibitorno djelovanje ukoliko se primijene u količini 15 μ L.



Slika 13. Utjecaj eteričnog ulja klinčića, cimeta kore i anisa u količini 15 μ L na porast micelija *R. solani* 7 dana od naciepljivanja
Izvor: Ereš, H. 2019.

Pri primjeni ulja u količini 25 μ L utvrđeno je da su ulja čajevca, timijana i anisa potpuno inhibirala rast micelija *R. solani*. Navedena ulja statistički su vrlo značajno jače inhibirala rast micelija u odnosu na ulja bora, ružmarina, čempresa, klinčića, eukaliptusa i naranče slatke. Ulja eukaliptusa i naranče slatke nisu djelovala inhibitorno na porast micelija pri količini 25 μ L, a micelij je potpuno prerastao Petrijevu zdjelicu kao i u kontrolnoj varijanti (Slika 14.). Kod primjene ulja bora, ružmarina, čempresa i klinčića u količinama 10 i 15 μ L nije utvrđeno inhibitorno djelovanje dok je primjenom ulja u količini 25 μ L utvrđeno statističko vrlo značajno antifungalno djelovanje. Također za sva četiri ulja zona inhibicije kod primjene 25 μ L statistički je vrlo značajno veća u odnosu na veličinu zone inhibicije pri primjeni 10 i 15 μ L ulja. Kod ulja timijana i anisa nema statistički značajnih razlika u veličini zone inhibicije bez obzira na primijenjenu količinu ulja. Koselec i sur. (2005.) navode da eterično ulje anisa inhibira rast micelija *Aspergillus niger* i *Aspergillus parasiticus*, vrste iz rodova *Candida*, *Trichophyton* i *Microsporum*, a pozitivno djeluje na rast vrsta iz roda *Geotrichum*.



Slika 14. Ulje naranče slatke i eukaliptusa koje nema antifungalno djelovanje pri količini od 25 μ L 7 dana od nacjepljivanja

Izvor: Ereš, H. 2020.

Prilikom primjene ulja u količini 50 μ L utvrđeno je da eterična ulja eukaliptusa, bora i naranče slatke nemaju inhibitorno djelovanje na porast micelija sedam dana od inokulacije. Ćosić i sur. (2010.) navode da ulja bora i gorke naranče ne inhibiraju porast ni jedne od dvanaest ispitivanih fitopatogenih gljiva, a na neke od njih imaju i stimulirajuće djelovanje. Ulja lavande, citronele, čajevca, timijana, ružmarina i anisa potpuno su ili gotovo potpuno inhibirala rast gljive. De i sur. (2002) ispitivali su djelovanje zvjezdolikog anisa na 12 bakterija i 15 gljivica i utvrdili su da ovo ulje posjeduje jaka antifungalna svojstva te da se ona u najvećoj mjeri mogu pripisati anetolu, glavnoj komponenti ovoga eteričnog ulja. Ulja cimet kore i čempresa statistički su značajno slabije inhibirala rast gljive od prethodno navedenih ulja, ali i statistički vrlo značajno jače u odnosu na kontrolu i ulja eukaliptusa, bora i naranče slatke.

Na Slici 15. prikazano je djelovanje eteričnih ulja klinčića, čempresa i lavande sedam dana nakon nacjepljivanja.



Slika 15. Različito djelovanje eteričnih ulja pri količini 50 µL 7 dana od naciepljivanja

Izvor: Ereš. H. 2020.

Piyo i sur. (2009.) navode da antifungalna svojstva eteričnih ulja ovise i o svojstvima biljaka iz kojih su ekstrahirana, koncentraciji ili količini ispitivanih eteričnih ulja i uvjetima ispitivanja. Naša istraživanja podudaraju se s brojnim svjetskim istraživanjima koja pokazuju da antifungalni učinak ulja u velikoj mjeri ovisi o količini eteričnog ulja koja će se primijeniti. Najjače antifungalno djelovanje na porast micelija *Rhizoctonia solani* pokazala su ulja timijana i anisa u svim količinama 7 dana od naciepljivanja. Amvam Zollo i sur. (1998.) navode da minimalna inhibitorna količina ulja timijana pri suzbijanju rasta *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *Auerobasidium pullulans*, *Microsporium gypseum* iznosi 5 µl. S druge strane ulje eukaliptusa i naranče slatke pokazala su da kod primjene i u najvećoj količini nemaju inhibitorno djelovanje na porast micelija. Klinčić i bor pokazali su vrlo slabo inhibitorno djelovanje i to samo kod primjene u količini 25 µL. Ulja lavande, citronele, ružmarina i čempresa pokazuju da se povećanjem primijenjene količine ulja povećava fungistatično djelovanje.

4. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata o antifungalnom utjecaju eteričnih ulja na porast micelija fitopatogene gljive *Rhizoctonia solani* u *in vitro* uvjetima može se zaključiti da su dobiveni rezultati u skladu s drugim rezultatima koje su provodili brojni znanstvenici i pritom ispitivali utjecaj različitih eteričnih ulja na velikom broju fitopatogenih gljiva.

Četiri dana od naciepljivanja uz primjenu ulja u svim količinama samo su eterična ulja timijana i anisa pokazala potpuno inhibitorno djelovanje na rast micelija *R. solani*. Prema učinkovitosti slijede eterična ulja lavande, citronele i čajevca dok su pri većoj količini dobro djelovala i ulja ružmarina i čempresa. Najslabiji antifungalni utjecaj imalo je ulje naranče slatke, a pri količini od 10 i 15 μL ulje eukaliptusa, bora, ružmarina i čempresa.

Sedmi dan ispitivanja ulja timijana i anisa potpuno su inhibirala porast micelija pri svim primijenjenim količinama ulja. Ulja eukaliptusa i naranče slatke pokazala su da kod primjene i u najvećoj količini nemaju inhibitorno djelovanje na porast micelija. Klinčić i bor pokazali su vrlo slabo inhibitorno djelovanje i to samo kod primjene u količini 25 μL . Kod ulja lavande, citronele, ružmarina i čempresa vidljivo je da se povećanjem primijenjene količine ulja povećava fungistatično djelovanje.

5. LITERATURA

1. Amvam Zollo, P.H., Biyiti, L., Tchoumboungang, T., Menut, C., Lamaty, G., Bouchet, Ph. (1998.): Aromatic Plants of Tropical Central Africa, Part XXXII, Chemical Composition and Antifungal Activity of Thirteen Essential Oils from Aromatic Plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2): 107-114.
2. Arras, G., Usai, M. (2001.): Fungitoxic Activity of 12 Essential Oils against Four Post harvest Citrus Pathogens: Chemical Analysis of *Thymus capitatus* Oil and its Effect in Subatmospheric Pressure Conditions. *J. Food Prot.*, 64(7), 1025-1029.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008.): Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-476.
4. Banihashemi, Z., Abivard, C. (2011.): Evaluation of fungicidal and fungistatic activity of plant. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(2): 245-256.
5. Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., Ravlić, M. (2010): In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda*, 16(2): 25-28.
6. De M, De AK, Sen P, Banerjee AB, 2002. Antimicrobial Properties of Star Anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytother Res* 16(1):94–95.
7. El-Nahhal, Y. (2004.): Contamination and Safety Status of Plant Food in Arab Countries. *Journal of Applied Science*, 4(3): 411-417.
8. Harris, R. (2002.): Progress with superficial mycoses using essential oils. *Int J Aromather*, 12(2): 83 – 91.
9. Holmes, G. L., Eckert, J. W. (1999.): Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to post harvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89(9): 716–721.
10. Kalemba, D., Kunicka, A. (2003.): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Currnet Medicinal Chemistry*, 10(10): 813-829.
11. Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Kuštrak, D. (2005.): Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruit (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm.*, 55(4): 377-385.
12. 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 postharvest and soilborne plantpathogenic fungi. *Plant Pathol J*, 23(2): 97-102.

13. Murray, I. (2000.): Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10): 603-608.
14. Palfi, M. (2017.): Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u in vitro uvjetima. Doktorski rad, Sveučilište J.J. Strossmayera i Institut Ruđer Bošković.
15. Piyo A, Udomsilp J, Khang-Khun P, Thobunluepop P. (2009.): Antifungal activity of essential oils basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *As J Food AgInd, Special Issue*, 2-9.
16. Sneh B., Burpee L., Ogoshi, A. (1993.): Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press.
17. Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E. (2005.): Toksičnost etarskih ulja za *Botrytis cinerea* Pers. in vitro, *Pesticidi i fitomedicina*, 20(2): 109-114.
18. Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. (1995): Comparative study on the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(2): 113-118.