

Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i *Fusarium solani*

Krajinović, Sanja

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:151:026221>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-02**



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

Sanja Krajinović, apsolvant

Sveučilišni diplomski studij

Zaštita bilja

Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i

Fusarium solani

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Sanja Krajinović, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij

Zaštita bilja

**Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i
*Fusarium solani***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Sanja Krajinović, apsolvent

Sveučilišni diplomski studij

Zaštita bilja

**Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i
*Fusarium solani***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, 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.....	2
2.1. Rod <i>Fusarium</i>	9
2.2. Rod <i>Pythium</i>	11
3. Materijali i metode.....	13
4. Rezultati i rasprava	15
4.1. Utjecaj alkoholne otopine različitih koncentracija propolisa na porast micelija <i>Pythium irregulare</i>	15
4.2. Utjecaj alkoholne otopine različitih koncentracija propolisa na porast micelija <i>Fusarium solani</i>	17
5. Zaključak	22
6. Popis literature.....	23
7. Sažetak.....	25
8. Summary.....	26
9. Popis tablica.....	27
10. Popis slika.....	27
11. Popis grafikona.....	28

1. Uvod

U Hrvatskoj i drugim zemljama diljem svijeta, fitopatogene gljive mogu uzrokovati ozbiljne ekonomske štete.

Iako je upotreba fungicida kontroverzna, to je važna komponenta borbe protiv štetočina i bolesti unutar poljoprivredne proizvodnje. Kako bi se osigurala održivost poljoprivrednih sustava, mora se pronaći ravnoteža između kontrole rizika od gljivičnih bolesti u usjevima i zaštite vodenih i kopnenih ekosustava (Wightwick i sur., 2010). Tijekom posljednjih nekoliko godina, uloženi su znatni naponi kako bi se prepoznali prirodni proizvodi za kontrolu bolesti biljaka, a upotreba prirodnih spojeva, kao što su ekstrakti propolisa u alkoholnoj otopini, predloženi su kao pristup za smanjenje određenih fitopatogenih gljiva (Giovanelli, 2008).

Općenito, pod pojmom ekološka poljoprivreda podrazumijeva se specifični sustav održivoga gospodarenja u poljoprivredi s ciljem proizvodnje zdrave hrane, odnosno zadovoljavanja odgovarajućih društvenih i gospodarskih potreba uz očuvanje prirodnog ekosustava i krajolika (Znaor, D., 1996).

Propolis je pčelinji proizvod koji pčelama služi kao lijek i građevna tvar. To je smolasta, ljepljiva tvar ugodna mirisa koja svojim najvećim dijelom sadrži raznovrsne biljne smole. Te biljne smole potječu s oštećenih dijelova biljaka (i do 70 %) ili pupoljaka, a ostalo u procesu prerade dodaju pčele. One smolama dodaju vosak (koji čini masu ljepljivom), pelud te obogaćuju propolis izlučevinama svojih žlijezda.

Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi utjecaj propolisa na vrste *Fusarium solani* i *Pythium irregulare*.

Fusarium vrste napadaju velik broj biljaka (kultiviranih i korovnih) iz različitih porodica i izazivaju različite tipove bolesti - palež klijanaca (pšenica, ječam, kukuruz), trulež korijena (pšenica, ječam, kukuruz), lukovica (tulipani, narcisi, luk) i gomolja (krumpir), trulež stabljike (kukuruz), palež klasova (pšenica), trulež klipa (kukuruz) i slično. Mogu izazvati uvelost biljaka (karanfili, rajčica, krastavci) kada se razvijaju u provodnim elementima, te govorimo o traheofuzariozama.

Kada su uvjeti povoljni za razvoj gljivica, a manje povoljni za domaćina, *Pythium* vrste mogu postati vrlo patogene i uzrokovati polijeganje, trulež korijena u staklenicima i na otvorenom, osobito u vlažnim uvjetima koji pogoduju razvoju zoospora.

2. Pregled literature

Prvi izvještaj antimikrobnog djelovanja propolisa protiv gljivičnih patogena biljaka bio je rad Ghaly i sur. (1998), koji određuju efikasnost određenog alkoholnog ekstrakta propolisa na gljivicu *Aspergillus flavus* s ciljem smanjenja proizvodnje aflatoksina.

Gljivične bolesti uzrokuju gubitke na usjevima na oko 12 % svjetske proizvodnje (ElShafei i sur., 2010), što uzrokuje opasnost za našu opskrbu hranom. Zbog visoke razine genetskih varijacija fitopatogenih gljiva pojava gubitka djelotvornosti kemijskih fungicida na gljivične patogene (Latorre i sur., 2001) rezultira rezistentnošću na fungicide (Zhao i sur., 2009). Stoga, uporaba prirodnih proizvoda poput propolisa za kontrolu gljivičnih bolesti biljaka se smatra obećavajućom alternativom sintetičkih fungicida, te ima manje negativan utjecaj na okoliš (Ordóñez i sur., 2011).

U posljednjih tridesetak godina, postoji znatan naglasak na studije koje uključuju propolis. Ustanovljeno je da su flavonoidi, benzojeva kiselina i derivati pronađeni u propolisu pokazali antibiotski, antivirusni i antifungalni učinak. Isto tako, vodeni ekstrakti propolisa su korišteni za liječenje nekoliko bolesti uočenih u sisavaca. 70 % alkoholni propolis je pokazao sinergistično djelovanje s antibioticima. Takva otopina je inhibirala klijavost povrća, kao što su krumpir, češnjak te izliječila opekline drugog stupnja, te pokazala anestetski, antiseptički i antioksidativni učinak.

Pokazano je da se uporaba propolisa u medicinske svrhe provodi još od davnina. Također, propolis se koristi u kozmetičkoj industriji svaki dan sve više. Zabilježeno je da propolis ima antibakterijsko djelovanje protiv vrsta *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei* i *Proteus vulgaris*.

Powers (1964) je utvrdio da propolis ima značajan antibiotski učinak na vrste *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* i *Escherichia coli*. Rosential (1989) je pokazao da je otopina alkohola s koncentracijom propolisa od 30 % učinkovita u inhibiranju *Bacillus cereus* i *Escherichia coli*.

Lindenfelser (1967) je analizirao propolis prikupljen iz različitih izvora, te istraživao njegovo antibakterijsko djelovanje na 25-39 bakterijskih vrsta *in vitro*, te izvijestio da je propolis bio učinkovit u inhibiranju *Bacillus larvae*.

Ime propolis prema pojedinim tumačenjima nastao je od grčke riječi "pro" - prije ili ispred i "polis"- grad, zbog upotrebe propolisa za izgradnju i regulaciju ulaza u košnicu dok drugi misle da nosi naziv prema riječi propoliso koja bi na grčkom ili latinskom značila zaglađivati. Pčele medarice skupljaju propolis tako da sa svojim čeljustima skinu smolu s drveta i zatim pomoću četkica stopala prve i druge noge prebace u košarice (corbicula) na stražnjim nogama i odnose ga u košnicu (Slika 1.).



Slika 1. Pčele nose propolis u košaricama (corbicula) na stražnjim nogama

Izvor: http://apikultura.blog.hr/slike/originals/pcela_s_propolisom.jpg

Boja propolisa je u rasponu od žutozelene do smeđe i tamnocrvene (Slika 2.) te varira ovisno o botaničkom i geografskom podrijetlu. Do sada je utvrđeno da pčele prikupljaju propolis sa preko 60 različitih vrsta biljaka. Na boju može utjecati i starost propolisa.



Slika 2. Propolis

Izvor: <http://www.antolcic-med.com/propolis.html>

Pčele propolisom dezinficiraju i štite svoju košnicu od nepoželjnih vanjskih utjecaja: od gljivica, bakterija, manjih životinja (miševi, rovke), vlage i propuha (Slika 3.).



Slika 3. Pčela štiti košnicu pomoću propolisa

Izvor: http://apikultura.blog.hr/slike/originals/pcela_s_propolisom_2.jpg

Za propolis je utvrđeno da ima sljedeća svojstva: antibakterijska (djeluje protubakterijski), antigljivična (djeluje protugljivično na preko 60 vrsta gljivica), antivirusna (djeluje

protuvirusno na viruse herpesa, virus gripe tipa II), protuupalna, antioksidativna, anestetička (vrlo jak lokalni anestetik), antitumorska svojstva (ometa razvoj tumora), imunostimularna svojstva (stimulira rad odnosno jača imunosustav), potiče regeneraciju tkiva (obnavlja oštećena tkiva), štiti organizam od posljedica zračenja (<http://www.antolcic-med.com/propolis.html>).

Prednost propolisa je u tome što kao prirodni antibiotik nije škodljiv za ljudski organizam, a mikroorganizmi ne mogu stvoriti otpornost na njega.

Kemijski sastav propolisa dosta je promjenjiv budući da ovisi o vrsti biljke s koje su ga pčele sakupile. Sastav je opisan s rasponom tvari koje se nalaze u propolisu.

Propolis na drvenoj površini sadrži smole i balzame (40 - 60 %), pčelinji vosak (oko 30 %), eterična ulja (5 - 10 %), tanin (5 - 15 %), pelud (oko 5 %), minerale i druge organske spojeve (oko 5 %).

U propolisu je do sada otkriveno više od 300 različitih sastojaka, 22 minerala, 7 vitamina, ali još uvijek nije do kraja istražen. Najveći dio sastojaka je biljnog porijekla i tu spadaju flavonoidi, organske kiseline, terpeni, alkoholi i esteri. Do sada je u propolisu nađeno 38 različitih vrsta flavonoida.

Specifična težina propolisa pri temperaturi od 20 °C je 1,113 do 1,136 g/cm³.

Ispod 15 °C propolis je krut i lomljiv, iznad 30 °C propolis je mekan i vrlo ljepljiv, talište mu je između 80 i 105 °C, ovisno o sastavu.

Niti jedno otapalo ga u potpunosti ne otapa pa tako na sobnoj temperaturi alkohol ga može otopiti 60 do 70 %, a voda između 7 i 11 %.

Njegova glavna funkcija jeste da spriječi raspadanje organske materije u košnici pčela tako što inhibira rast mikroorganizama. Dakle, prisutnost propolisa može osigurati okruženje koje je neprikladno za rast gljivica i drugih mikroorganizama (Falcão i sur., 2010) te stvoriti zaštitnu barijeru protiv neprijatelja. Propolis se smatra najvažnijim "kemijskim oružjem" pčela protiv patogenih mikroorganizama.

To saznanje su primjenili mnogi talijanski i njemački eko-voćari i vinogradari koji u svrhu zaštite bilja koriste propolis (tablica 1.), te broj pristaša upotrebe propolisa u zaštiti bilja raste iz dana u dan. Stručnjaci Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo i specijalnu zoologiju,

Agronomskog fakulteta u Zagrebu inventarizirali su mogućnosti upotrebe propolisa u zaštiti bilja. Iz njihovog rada, vidljivo je da propolis ima antibakterijsko i antigljivično djelovanje, insekticidno djelovanje, te da stimulirajuće djeluje na razvoj biljaka (Medved, 2015). Preparate na bazi propolisa koristimo u obliku vodene otopine (150 grama samljevenog propolisa dodaje se vodi, uz povremeno miješanje) kroz dva tjedna u 1 litri kišnice ili izvorske vode. U svrhu pospješivanja disperzije sitnih dijelova propolisa u vodi moguće je dodati i 1 gram sojinog lecitina, ili bjelanjka jajeta. Nakon dva tjedna tekućinu je potrebno procijediti kroz filter papir. Također, moguće je pripremljati alkoholne otopine tzv. tinkture (slika 4.) koja se priprema tako da se 300 grama propolisa uz povremeno miješanje, dodaje kroz 20 dana u 850 mililitara denaturiranog alkohola, pri čemu je također korisno dodati sojin lecitin ili bjelanjak. Zadnjih pet dana otopina se ne miješa, kako bi se upotrebom filter papira olakšalo odvajanje tekućeg dijela od taloga. Postoje i hidro-alkoholne otopine, koje dobivamo miješanjem 100 grama vodene otopine propolisa s jednakim dijelom tinkture propolisa, što se sve otopi u 100 litara vode. U svrhu pojačavanja fungicidnog i insekticidnog učinka, na 100 litara ove otopine moguće je dodati i 1 litru natrijevog silikata.

Koriste se i smjese hidro-alkoholne otopine propolisa s koloidalnim sumporom. Njih dobivamo razrjeđivanjem 3 grama koloidalnog sumpora u 1 litri hidro-alkoholne otopine, a moguće je i izravno dodati u hidro-alkoholnu otopinu močivi sumpor u količini od 350 grama na svakih 100 litara vode.

Sljedeći pripravak za zaštitu bilja koji sadrži propolis je propolisno ulje, koje dobivamo petodnevnim močenjem 25 grama samljevenog propolisa u 100 litara ulja, nakon čega se odvoji uljna frakcija sedimenta, te doda još 25 litara hidro-alkoholne otopine.

Za zaštitu većine kultura najčešće se upotrebljavaju upravo smjese hidro-alkoholne otopine propolisa (0,15 do 0,2 %) s koloidalnim sumporom (0,25 do 0,3 %). Tretiranja propolisom se provode svakih desetak dana, i to u vrijeme zalaska sunca.



Slika 4. Alkoholna otopina propolisa koja sadrži 35 % propolisa, 65 % alkohola

Izvor: <http://yahoo.aleado.com/lot?auctionID=o130699471>

Tablica 1. Uporaba preparata na bazi propolisa u zaštiti voćaka i vinove loze (prema Tringale, 1989.)

Voće	Bolest ili štetnik	Upotreba propolisa
Aktinidija	Siva plijesan (<i>Botrytis</i>)	0,2 % hidro-alkoholna otopina + 0,3 % močivi sumpor
	Lisnate uši	2-3 tretiranja alkoholnom otopinom
Agumi	Antraknoza (<i>Colletotrichum cjlloesporoides</i>)	Nakon uklanjanja napadnutih grana provesti 2-3 tretiranja s 0,2% hidro-alkoholnom otopinom
	Plijesan plodova (<i>Phytophthora citrophthora</i>)	Tretiranje plodova prije ili odmah nakon berbe s 0,1% alkoholnom otopinom i ostaviti ih da se osuše na zraku
	Štitaste uši (<i>Mytilococcus beckii</i> , <i>Lepidosaphes gloverii</i> i druge)	Premazati napadnute grane propolisnim uljem
Maslina	Maslinova muha (<i>Dacus oleae</i>)	Kada se nije na vrijeme zaustavio napad, alkoholnom otopinom od 0,1% + močivi sumpor efikasno se uništavaju jaja maslinove muhe u unutrašnjosti posla
	Rak (<i>Pseudomonas savastanoi</i>)	2-3 tretiranja s 0,2% hidro-alkoholnom otopinom
	Štitaste uši (<i>Lepidosaphes destefani</i> , <i>Lucaspis riceae</i>)	Premazati napadnute grane propolisnim uljem
Breskva	Kovrčavost (<i>Taphrina deformans</i>)	Pojavom prvih simpotoma provesti višekratna tretiranja alkoholnom otopinom propolisa (0,2%) + močivi sumpor (0,35%)
Vinova loza	Peronospora (<i>Plasmopara viticola</i>)	Prema meteorološkim prilikama provesti brojna tretiranja hidro-alkoholnom otopinom (0,2%) + močivi sumpor (0,3%)
	Siva plijesan (<i>Botrytis cinerea</i>)	Provesti tretiranja hidro-alkoholnom otopinom (0,2%) + močivi sumpor (0,2-0,3%) prema meteorološkim prilikama

Guginski-Pival i sur. (2015), su istraživali utjecaj različitih koncentracija i vremena primjene alkoholnog ekstrakta propolisa (EEP) na pepelnicu (*Podosphaera fuliginea*) u kulturi krastavca te nastojali uspostaviti najprikladniji način za kontrolu bolesti. Pokus je proveden u stakleniku. Pokus je postavljen po potpuno slučajnom planu, u kojem je ispitivan utjecaj šest koncentracija propolisa (0; 0,5; 1; 2; 4 i 8 %) i aplikacije alkoholnog ekstrakta propolisa tri puta (24 sata prije inokulacije patogena, 24 sata nakon inokulacije patogena i pri pojavi prvih simptoma bolesti), te je to sve replicirano četiri puta.

Značajna interakcija je zabilježena između faktora (vrijeme aplikacije x koncentracija) za pojavu bolesti. Pojava bolesti je bila manja za primjenu propolisa 24 sata nakon inokulacije patogena, prvenstveno u najvišoj koncentraciji (8 %). Koncentracija 8 % alkoholnog ekstrakta propolisa kontrolirala je jačinu bolesti od 31,33 i 43,68 % za prvi i drugi usjev. Primjena koncentracija propolisa 24 sata prije i 24 sata nakon inokulacije patogena pokazala je pojavu bolesti, ali ta razlika nije bila značajna za nijedan usjev.

Također su promatrali efekt utjecaja različitih koncentracija alkoholnog ekstrakta propolisa na aktivaciju obrambenog mehanizma kod biljke i to kroz indukciju (poticanje) fitoaleksina u kotiledonu soje (*Glycine max*).

Sjeme soje sorte BMX Apollo posijano je u posude koje sadrže supstrat Plantmax. Nakon deset dana uklonjeni su kotiledoni iz sadnica i isprani destiliranom vodom. Nakon ovog napravljeni su rezovi na listu, oko 1 mm duboki i 6 mm promjera, i na taj rez nanešena je količina od 50 μ L otopine (0 % (voda), 0,5, 1, 2, 4 i 8 % ekstrakta propolisa).

Alkoholni ekstrakt propolisa je izazivao povećanje razine fitoaleksina (služi kao dio obrambenog mehanizma protiv patogena) u kotiledonu soje kako se primijenjena koncentracija alkoholnog ekstrakta povećavala.

Ovdje je dokazano da alkoholni ekstrakt propolisa ima potencijal u suzbijanje pepelnice na krastavcu, kroz preventivne primjene koncentracije od 8 %.

2.1. Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* pripada razredu *Hyphomycetes*, redu *Hyphales*. Rod sadrži velik broj vrsta koje su većinom saprofiti, a fitoparazitne vrste pripadaju u grupu fakultativnih parazita. Izvor inokuluma mogu biti zaraženo tlo, zaraženo sjeme ili alternativni domaćini, prvenstveno brojne korovne vrste. *Fusarium* vrste napadaju velik broj biljaka i parazitiraju različite biljne dijelove (Slika 5.).



Slika 5. Lijevo- korijen zdrave biljke, desno- korijen biljke zaražene s *Fusarium solani*

Izvor: <http://ucce.ucdavis.edu/files/repository/calag/img4504p28a.jpg>

Patogena gljiva *Fusarium solani* je ubikvist raširen širom svijeta. Ekonomski je značajan patogen velikog broja biljnih kultura. Najčešće uzrokuje trulež korijena biljke i trulež sjemena. Primarno stanište mu je tlo. Budući da kolonizira korijen biljke, najefikasniji i ekonomski isplativ način borbe protiv *F. solani* je tretiranje sjemena. (Medved, 2015.)

Fusarium solani formira makrokonidije. One ovisno o izolatu nastaju u manjem ili većem broju, jednostačne su, rjeđe dvostanične, ovalnog ili burežastog oblika (Ćosić, 2001.). Makrokonidije su blago srpastog oblika i krupne, najčešće s pet septi, ali broj septi može biti od tri do sedam (Poštić, 2012.).

2.2. Rod *Pythium*

Rod *Pythium* ima nerazgranate konidiofore, nema sterigme, ima okrugle konidije koje nastaju u nizu i kliju u micelij.

Vrste *Pythium* mogu živjeti kao saprofiti ili paraziti. Njihova parazitska uloga često ovisi o vanjskim čimbenicima. Kada su uvjeti povoljni za gljivice, a manje povoljni za domaćina, *Pythium* vrste mogu postati vrlo patogene i uzrokovati polijeganje, trulež korijena u staklenicima i na otvorenom, osobito u vlažnim uvjetima koji pogoduju razvoju zoospora.

Prvenstveno su napadnuta mlada tkiva.

Pythium irregulare je patogen kojeg možemo pronaći širom svijeta na stotinama različitih biljnih domaćina.

Zabilježen je na svim glavnim kontinentima i identificiran na više od 200 vrsta domaćina. Utvrđen je diljem svijeta na ananasu, žitaricama, travama, celeru, paprici, duhanu, stablu oraha, agruma, na jagodama, leći, kukuruzu, soji, krastavcu, luku, mrkvi i nizu cvječarskih usjeva poput gerbera, tratinčice i geranija.

Voli uvjete visoke vlage (Hendrix i Campbell 1973) i obično se nalazi u staklenicima kao patogen, širi se pomoću vode, često iz kontaminiranih izvora za navodnjavanje. *P. irregulare* vrši zarazu pri nižim temperaturama.

Kao i većina *Pythium* vrsta, *P. irregulare* može uzrokovati palež sjemena prije i nakon klijanja te trulež korijena starijih biljaka. I prije i poslije klijanja se može pojaviti u stakleniku. Trulež korijena se obično javlja na otvorenom.

Korijen poprima smeđu boju, mogu se pojaviti vodenaste pjege i nekroze (slika 6.). Vodom natopljena područja hipokotila promatrana iznad tla mogu razviti suhe do smeđe lezije, lišće može poprimiti zelenkasto-sivu boju. Trulež se može pojaviti nakon raspadanja biljnog tkiva.



Slika 6. Pelargonije - trulež korijena uzrokovana *P. irregulare*

Izvor:

https://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Pythium_irregulare/Pythium_irregulare.html

Za suzbijanje *Pythium irregulare* se preporuča sistemski fungicid, koji djeluje preventivno, tako što sprječava formiranje i klijanje spora, zaustavlja infekciju i njeno daljnje širenje u biljci.

Ostali načini suzbijanja su dezinfekcija tla u proizvodnji rasada, ne pregusta sjetva, uništavanje bolesnih biljčica, presađivanje samo zdravih, umjereno zalijevanje u jutarnjim satima (Raspudić i sur., 2009).

3. Materijali i metode

Istraživanje je obavljeno u in vitro uvjetima u laboratoriju Katedre za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

U pokusu smo ispitali utjecaj propolisa otopljenog u alkoholu u tri koncentracije: 0,5 %, 1 % te 2,5 % na dvije vrste fitopatogenih gljiva *Fusarium solani* i *Phytium irregulare*.

Koristili smo propolis koji sadrži 34% ekstrakta propolisa i 56% alkohola.

Najprije smo pripremili pribor za pravljenje hranjivih podloga, tako da smo Petrijeve zdjelice zamotali u porozni papir, zatim stavili u autoklav na sterilizaciju i to 21 minutu na 121°C, te ih potom označavali, pojedinačno za svaku podlogu. U jednu Erlenmayerovu tikvicu dodali smo 725 ml destilirane vode te 21,5 g PDA podloge u prahu i 3,5 g tehničkog agara. Smjesu smo otapali kuhanjem, a nakon toga hladili na temperaturi od 55°C.

Koristili smo 3 tikvice za tri koncentracije. Petrijeve zdjelice punili smo podlogom s koncentracijama od 0,5 %, 1 % te 2,5 % propolisa, po 4 zdjelice za svaku koncentraciju.

Nakon pripreme podloga slijedila je inokulacija izolata u laminariju. Za inokulaciju je korišten 7 dana star micelij gljiva. Dobivene diskove promjera 5 mm smo sterilnim priborom nanosili na sredinu Petrijeve zdjelice. Micelij gljive okrenut je prema podlozi prilikom nanošenja. Nakon inokulacije Petrijeve zdjelice smo stavili u termostat, u kojem smo ih držali na temperaturi od 22°C (slika 7.).



Slika 7. Petrijeve zdjelice u termostatu (original)

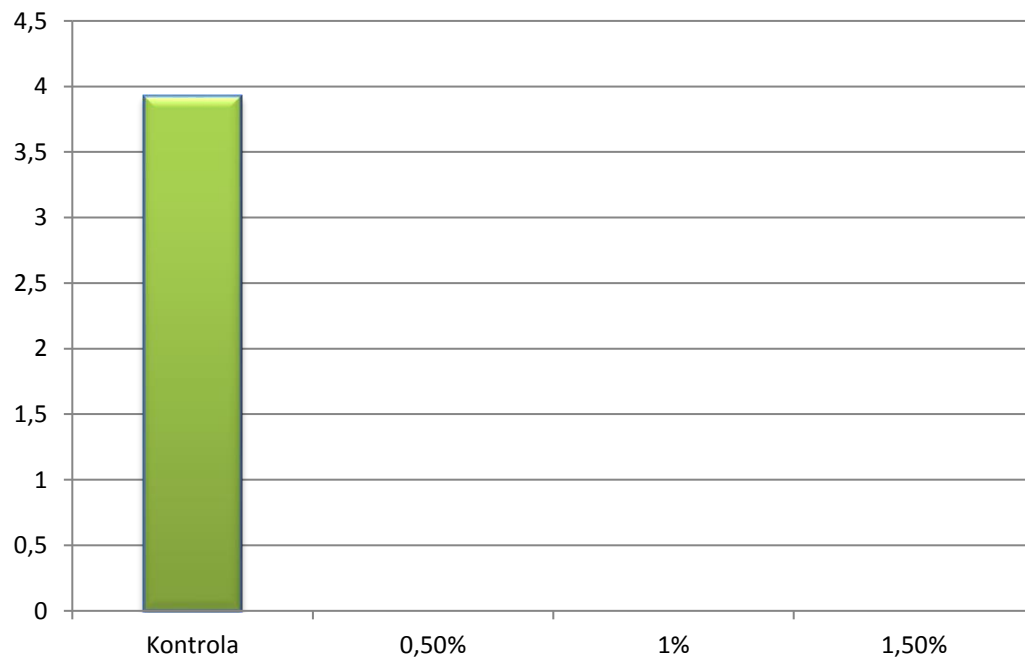
Prvo mjerenje porasta micelija obavljeno je 2 dana od inokulacije. Mjerenje je izvršeno pomoću ravnala, kojim se mjerio promjer micelija preko sredine diska u vodoravnom smjeru. Mjerenje je vršeno svaka dva/tri dana u periodu od 35 dana, a za rezultate i raspravu odabrani su dani s najznačajnijim promjenama. Svi rezultati su statistički obrađeni uz pomoć analize varijance koristeći računalni program VVSTAT (Vukadinović, 1994.).

4. Rezultati i rasprava

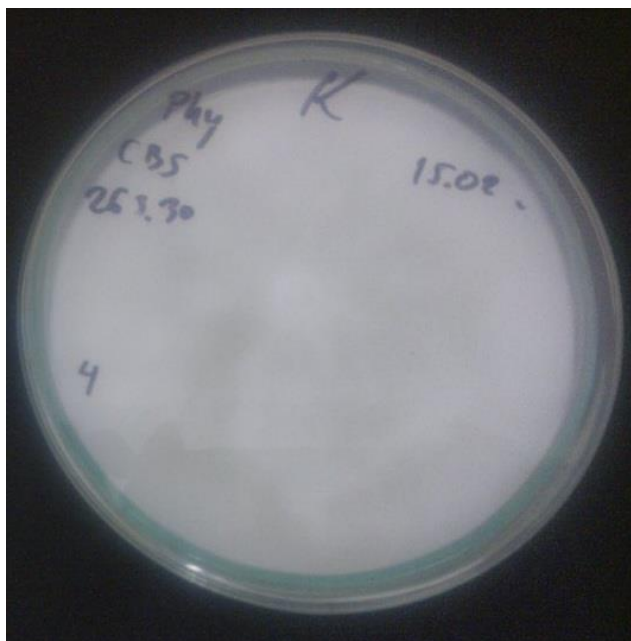
4.1. Utjecaj alkoholne otopine različitih koncentracija propolisa na porast micelija *Pythium irregulare*

Dva dana od tretiranja kontrola je narasla do 3,92 cm (grafikon 1.), nakon četiri dana micelij kontrole je dosegao svoj maksimum, odnosno prekrio je cijelo dno Petrijeve zdjelice promjera 9 cm (slika 8.).

cm



Grafikon 1. Porast micelija *Pythium irregulare* (cm) 2 dana od inokulacije na različitim koncentracijama



Slika 8. *Pythium irregulare* - kontrola, četvrti dan od inokulacije (original)

Pythium irregulare tretiran s propolisom (svim koncentracijama) uopće nije narastao, odnosno propolis je u potpunosti inhibirao rast micelija (slika 9.). Drugi dan od mjerenja utvrđena je statistički značajna razlika između kontrole i ostalih mjerenja. Analiza varijance u ovom slučaju nije imala smisla jer u tretmanima s propolisom u svim ponavljanjima nije bilo porasta.



Slika 9. *Pythium irregulare* tretiran propolisom (1 %, 2,5 %, 0,5 % - redom), posljednji dan mjerenja (original)

4.2. Utjecaj alkoholne otopine različitih koncentracija propolisa na porast micelija *Fusarium solani*

U tablici 2. prikazana je statistička analiza porasta micelija *Fusarium solani* za promatrane dane mjerenja

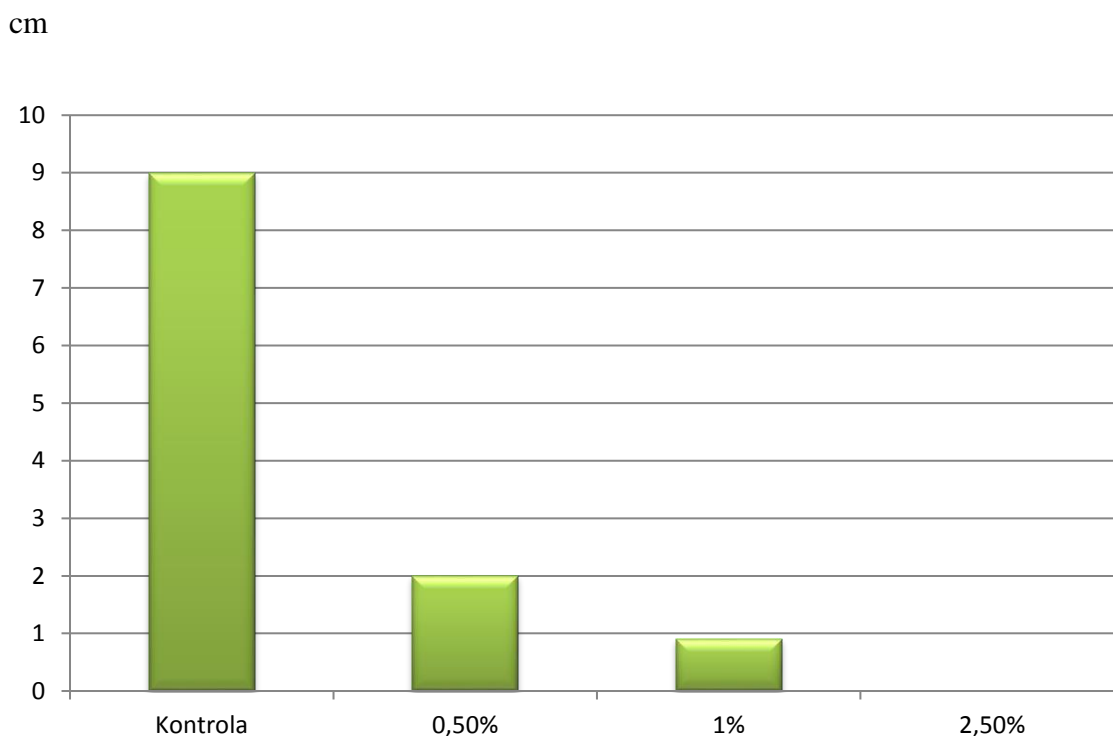
Tablica 2. Prosječni porast micelija *Fusarium solani* (cm) na 0,5 %, 1 % i 2,5 % koncentraciji propolisa

Broj dana od inokulacije	Kontrola	0,5 %	1 %	2,5 %
2.	3,48	0	0	0
LSD _{0,01} =0,16 LSD _{0,05} =0,12				
4.	9	0	0	0
LSD _{0,01} =0,86 LSD _{0,05} =0,62				
7.	9	2	0,9	0
LSD _{0,01} =1,03 LSD _{0,05} =0,73				
9.	9	2,47	1,23	0
LSD _{0,01} =0,97 LSD _{0,05} =0,69				
14.	9	4	2,65	0
LSD _{0,01} =1,19 LSD _{0,05} =0,86				
18.	9	5,28	3,65	0
LSD _{0,01} =1,22 LSD _{0,05} =0,87				
23.	9	6,5	5,18	0
LSD _{0,01} =0,85 LSD _{0,05} =0,61				
35.	9	6,63	6,32	0
LSD _{0,01} =0,75 LSD _{0,05} =0,53				

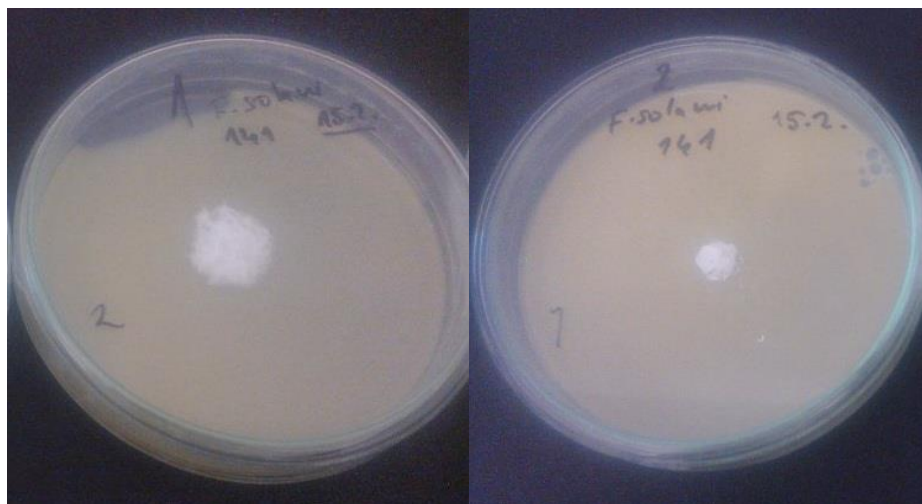
Dva dana od inokulacije, kontrola je dosegla promjer od 3,48 cm, a micelij tretiran propolisom se još nije razvio.

Četvrti dan je micelij kontrole dosegao svoj maksimum, dok se micelij tretiran propolisom još nije razvio.

Sedmi dan već uočavamo promjene (grafikon 2.) Postoji razlika između tretmana i to između micelija tretiranog 0,5 % propolisom i onim tretiranim 1 % - tnim propolisom. Micelij tretiran 0,5 % propolisom je imao veći porast i to na razini značajnosti od 95 % (slika 10.).



Grafikon 2. Porast micelija *Fusarium solani* (cm) 7 dana od inokulacije na različitim koncentracijama



Slika 10. *Fusarium solani* tretiran koncentracijom propolisa od 0,5 % (tretman 1) i 1 % (tretman 2), sedmi dan mjerenja (original)

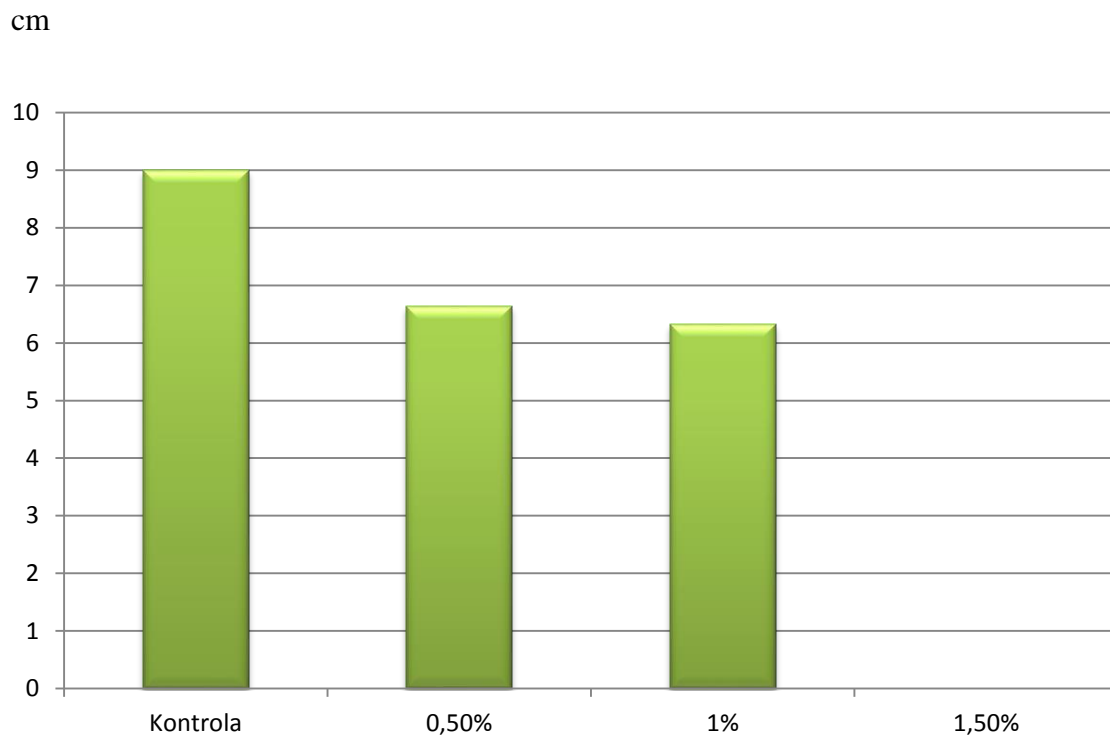
Deveti dan za micelij tretiran s 2,5 % - tnim propolisom nije zabilježen porast, tj propolis je potpuno inhibirao njegov rast. Micelij tretiran s 0,5 % - tnim propolisom imao je promjer 2,47cm, dok je micelij tretiran s 1%-tnim propolisom imao promjer 1,23 cm. Postoje razlike između ta dva tretmana, na razini značajnosti od 99 %.

U istraživanju Palameta (2015.) gdje je testiran utjecaj propolisa na *Fusarium oxysporum*, deseti dan od inokulacije zabilježen je porast jedino na miceliju tretiranom 0,5 % -tnim propolisom. Tretiranje koncentracijom od 1 % i 2,5 % nije izazvalo promjene.

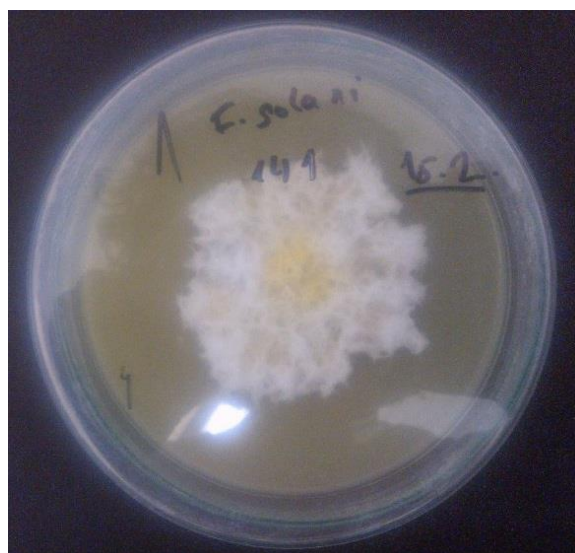
Dvadeset i treći dan od inokulacije na podlozi s 0,5 % propolisom u našem istraživanju, utvrđen je micelij promjera 6,5 cm, na podlozi s 1 % propolisom micelij promjera 5,18 cm. I dalje postoje statistički značajne razlike između tretmana.

U istraživanju Palameta (2015.) 25 dana nakon inokulacije (što je bio i posljednji dan mjerenja) na koncentraciji od 0,5 % utvrđen je promjer micelija od 7,75 cm, dok je na 1 % koncentraciji porast bio neznatan i statistički visoko značajno manji odnosu na kontrolu i 2,5 % koncentraciju. Porast na 2,5 %-tnoj koncentraciji ostaje nepromijenjen.

I posljednji dan mjerenja u našem istraživanju, trideset i peti dan, na podlozi s 0,5 % propolisom promjer micelija je iznosio 6,63 cm (slika 11.), tretman s 1 % propolisom, utvrđen je micelij promjera 6,32cm. Između ova dva tretmana nije bilo statistički značajnih razlika (grafikon 3.).



Grafikon 3. Porast micelija *Fusarium solani* (cm) 35 dana od inokulacije na različitim koncentracijama



Slika 11. *Fusarium solani* tretiran 0,5 % - tnm propolisom, trideset i peti dan mjerenja (original)

Između tretmana s 2,5 % propolisom i ostalih tretmana ima statistički značajnih razlika, na razini značajnosti od 99%.

U našem istraživanju, 2,5 % propolis je djelovao potpuno inhibitorno na porast micelija *Fusarium solani*.

5. Zaključak

U istraživanju koje smo proveli testirali smo utjecaj različitih koncentracija propolisa na porast gljivica *Pythium irregulare* i *Fusarium solani*.

Rezultati su slijedeći:

- sve tri koncentracije propolisa (0,5 %, 1 % te 2,5 %) djelovale su inhibitorno na porast micelija *Pythium irregulare*.
- Koncentracija propolisa od 2,5 % djelovala je od prvog do posljednjeg dana istraživanja potpuno inhibitorno na porast micelija *Fusarium solani*. U razdoblju od 35 dana micelij tretiran spomenutom koncentracijom se nije razvio. Micelij tretiran koncentracijama od 0,5 % i 1 % se vremenom razvio, iako je i dalje propolis djelovao inhibitorno na micelij, odnosno smanjio je njegov porast u odnosu na kontrolu.

Najveći nedostatak kod primjene propolisa u suzbijanju porasta micelija fitopatogenih gljiva je taj što su ovakvi preparati skuplji od konvencionalnih fungicida.

Zbog toga ovakva tretiranja nisu još u potpunosti zaživjela. Tijekom istraživanja nije pronađen niti jedan članak u kojem se navodi da je tretiranje propolisom provedeno u praksi u Republici Hrvatskoj. Za očekivati je da će u budućnosti propolis zaista biti sastavni dio ekološke poljoprivrede, te da će se znanost sve više okretati ovakvom pristupu i pokušati pronaći način u kojem neće trpjeti niti okoliš niti financije.

6. Popis literature

1. Ćosić J. (2001.): Taksonomija Fusarium vrsta izoliranih s kultiviranog bilja, korova i njihova patogenost za pšenicu, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
2. ElShafei, G., M.M. El-Said, H. Attia, and T.G.M. Mohammed, (2010.): Environmentally friendly pesticides: Essential oil-based w/o/w multiple emulsions for anti-fungal formulations. *Industrial Crops and Products* 31: 99-106.
3. Falcão, S. I., Vilas Boas, M., Estevinho L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., & Cardoso, S. M., (2010.): Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 887-897.
4. Ghaly, M.F., S.M. Ezzat and M.M. Sarhan (1998.): Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. *Folia Microbiol.*, 43:156-160.
5. Giovanelli L.C. (2008.): Evaluation of an Ethanolic Extract of Propolis as a Potential Pre- and Post-Harvest Fungicide for 'Fuerte' Avocado (*Persea americana* Mill.) Fruits and Orchards, University of the Witwatersrand, Johannesburg, 11-12
6. Guginski-Piva1 i sur. (2015.): Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber , Volumen 33, N° 1. Páginas, IDESIA, Chile; 39-47
7. Hendrix F.F. and Campbell W.A. (1973.): Pythiums as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11, 77-98.
8. Latorre, B. A., C. Lillo, and M. E. Rioja, (2001.): Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de Botrytis cinerea de la vid en función de la época de aplicación. *Ciencia e Investigación Agraria* 28: 61-66.
9. Lindenfelser, L. A. (1967.): Antimicrobial activity of propolis, *Am. Bee F.*, 107, 90-92,130-131.
10. Medved, M., (2015.): Testiranje osjetljivosti Fusarium solani na tebukonazol i TMTD, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
11. Palameta, M. (2015.): Utjecaj propolisa na porast gljiva Fusarium oxysporum i Alternaria brassicae, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
12. Poštić, J. (2012.): Morfološka i molekularna identifikacija Fusarium vrsta i njihova patogenost za pšenicu, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek
13. Powers, J. J. (1964.): *Proc. IV Int. Symp. Fd. Microbial*, 59-75.
14. Raspudić E. i sur, (2009) Najznačajniji štetnici, bolesti i korovi u uzgoju povrća, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek

15. Rosential, C. (1989.): Demonstration of inhibitory effect of propolis on Microbial strains, XXXII. Int. Cong. Of. Apiculture. Apimondia, Bucharest.
16. Tringale, M., (1989.): Produzione e uso della propoli in agricoltura, cosmesi e medicina, 46-61.
17. Vukadinović, V. (1994.): VVSTAT - računalni program za statističku obradu podataka. Poljoprivredni fakultet Osijek.
18. Wightwick A., Robert Walters, Graeme Allinson, Suzanne Reichman, and Neal Menzies (2010.) : Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems, The University of Queensland, 1-2.
19. Zhao, M., J.Y. Zhou, Z.D. Li, W.W., Song, Y.J. Tan, and T. Hong, (2009.): Boty-II, a novel LTR retrotransposon in Botrytis cinerea B05.10 revealed by genomic sequence. Electronic Journal of Biotechnology 12:2-3.
20. Znaor, D. (1996): Ekološka poljoprivreda. Nakladni zavod Globus

Internet stranice:

1. <http://antolcic-med.com/propolis.html>, (04.travnja 2016.)
2. <http://apikultura.blog.hr/>, (23. ožujka 2016.)
3. <http://ucce.ucdavis.edu/files/repository/calag/img4504p28a.jpg>, (22. ožujka 2016.)
4. <http://yahoo.aledo.com/lot?auctionID=o130699471>, (10. ožujka 2016.)

7. Sažetak

Proučavali smo utjecaj propolisa na dvije fitopatogene gljivice, *Fusarium solani* i *Pythium irregulare*. Oba patogena prave velike štete na usjevima, kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Kontrola od ovih uzročnika bolesti se provodi osim agrotehničkim i kemijskim mjerama borbe što vjerojatno jeste ekonomski isplativiji način suzbijanja, ali je i nepovoljniji za okoliš i čovjeka. Alternativa za suzbijanje ovih patogena jeste ekološki način suzbijanja, u koji spada i propolis. Propolis je proizvod pčela, koji prvenstveno njima služi za dezinfekciju i zaštitu košnice kojom nastoje eliminirati sve štetne organizme koji su u doticaju s košnicom. U istraživanju smo koristili tri koncentracije propolisa u alkoholnoj otopini, a to su 0,5 %, 1 % i 2,5 %. Za *Pythium irregulare*, sve tri koncentracije su se pokazale uspješne u inhibiciji rasta micelija, koji u ovom slučaju nije uopće porastao. Za *Fusarium solani* je utvrđeno da koncentracija propolisa od 2,5 % u potpunosti inhibira rast *Fusarium solani* dok je na nižim koncentracijama zabilježen manji porast, ali statistički značajno manji od kontrole.

Ključne riječi: propolis, *Fusarium solani*, *Pythium irregulare*, ekološka poljoprivreda

8. Summary

We studied the influence of propolis on two pathogenic fungus, *Fusarium solani* and *Pythium irregulare*. Both pathogens make damage to crops worldwide and in Croatia. So far, they are suppressed by using fungicides, which is probably more cost-effective way to control, but it is worse for the environment and human. The alternative for the control of these pathogens is an environmentally friendly way to combat, which includes propolis. Propolis is a bee product, which primarily serves them for disinfection and protection of the hive, which seek to eliminate all harmful organisms that come into contact with the hive. We used three concentrations of propolis in alcoholic solution 0.5 %, 1 % and 2.5 %. The suppression of *Pythium irregulare*, all three concentrations have proved successful in inhibiting the growth of mycelium, which in this case is not at all increased. The suppression of *Fusarium solani*, as the best solution proved to be expected, the highest concentration of propolis, or those of 2.5 %, which was completely inhibited the growth of *Fusarium solani*, while the lower concentration recorded minor increase, but significantly higher than the control.

Key words: propolis, *Fusarium solani*, *Pythium irregulare*, organic agriculture

9. Popis tablica

Red.br.	Naziv tablice	Str
Tablica 1.	Uporaba preparata na bazi propolisa u zaštiti voćaka i vinove loze (prema Tringale, 1989.	9.
Tablica 2.	Prosječni porast micelija <i>Fusarium solani</i> (cm) na 0,5 %, 1 % i 2,5 % koncentraciji propolisa.....	17.

10. Popis slika

Red.br.	Naziv slike	Str
Slika 1.	Pčele nose propolis u košaricama (corbicula) na stražnjim nogama.....	5.
Slika 2.	Propolis	6.
Slika 3.	Pčela štiti košnicu pomoću propolisa.....	6.
Slika 4.	Alkoholna otopina propolisa koja sadrži 35 % propolisa i 65 % alkohola.....	9.
Slika 5.	Lijevo- korijen zdrave biljke, desno- korijen biljke zaražene s <i>Fusarium solani</i>	11.
Slika 6.	Pelargonije - trulež korijena uzrokovana <i>P. irregulare</i>	13.
Slika 7.	Petrijeve zdjelice u termostatu.....	15.
Slika 8.	<i>Pythium irregulare</i> - kontrola, četvrti dan od inokulacije	17.
Slika 9.	<i>Pythium irregulare</i> tretiran propolisom (1 %, 2,5 %, 0,5 % - redom), posljednji dan mjerenja.....	17.

Slika 10. <i>Fusarium solani</i> tretiran koncentracijom propolisa od 0,5 % (tretman1) i 1 % (tretman 2), sedmi dan mjerenja	18.
Slika 11. <i>Fusarium solani</i> tretiran 0,5 % - tnm propolisom, trideset i peti dan mjerenja.....	19.

11. Popis grafikona

Red.br.	Naziv grafikona	Str
Grafikon 1.	Porast micelija <i>Pythium irregulare</i> (cm) 2 dana od inokulacije na različitim koncentracijama.....	17.
Grafikon 2.	Porast micelija <i>Fusarium solani</i> (cm) 7 dana od inokulacije na različitim koncentracijama.....	20.
Grafikon 3.	Porast micelija <i>Fusarium solani</i> (cm) 35 dana od inokulacije na različitim koncentracijama.....	21.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Sveučilišni diplomski studij, Zaštita bilja

Diplomski rad

Utjecaj propolisa na porast fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare* i *Fusarium solani*

Sanja Krajinović

Sažetak:

Proučavali smo utjecaj propolisa na dvije fitopatogene gljivice, *Fusarium solani* i *Pythium irregulare*. Oba patogena prave velike štete na usjevima, kako u svijetu tako i u Hrvatskoj. Kontrola od ovih uzročnika bolesti se provodi osim agrotehničkim i kemijskim mjerama borbe što vjerojatno jeste ekonomski isplativiji način suzbijanja, ali je i nepovoljniji za okoliš i čovjeka. Alternativa za suzbijanje ovih patogena jeste ekološki način suzbijanja, u koji spada i propolis. Propolis je proizvod pčela, koji prvenstveno njima služi za dezinfekciju i zaštitu košnice kojom nastoje eliminirati sve štetne organizme koji su u doticaju s košnicom. U istraživanju smo koristili tri koncentracije propolisa u alkoholnoj otopini, a to su 0,5 %, 1 % i 2,5 %. Za *Pythium irregulare*, sve tri koncentracije su se pokazale uspješne u inhibiciji rasta micelija, koji u ovom slučaju nije uopće porastao. Za *Fusarium solani* je utvrđeno da koncentracija propolisa od 2,5 % u potpunosti inhibira rast *Fusarium solani* dok je na nižim koncentracijama zabilježen manji porast, ali statistički značajno manji od kontrole.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić

Broj stranica: 31

Broj grafikona i slika: 14

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 13

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Gljučne riječi: propolis, *Fusarium solani*, *Pythium irregulare*, ekološka poljoprivreda

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića

1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Faculty of Agriculture

University Graduate Studies, Plant Protection

Graduate thesis

Influence of propolis on mycelium growth of *Pythium irregulare* and *Fusarium solani*

Sanja Krajinović

Abstract:

We studied the influence of propolis on two pathogenic fungus, *Fusarium solani* and *Pythium irregulare*. Both pathogens make damage to crops worldwide and in Croatia. So far, they are suppressed by using fungicides, which is probably more cost-effective way to control, but it is worse for the environment and human. The alternative for the control of these pathogens is an environmentally friendly way to combat, which includes propolis. Propolis is a bee product, which primarily serves them for disinfection and protection of the hive, which seek to eliminate all harmful organisms that come into contact with the hive. We used three concentrations of propolis in alcoholic solution 0.5 %, 1 % and 2.5 %. The suppression of *Pythium irregulare*, all three concentrations have proved successful in inhibiting the growth of mycelium, which in this case is not at all increased. The suppression of *Fusarium solani*, as the best solution proved to be expected, the highest concentration of propolis, or those of 2.5 %, which was completely inhibited the growth of *Fusarium solani*, while the lower concentration recorded minor increase, but significantly higher than the control.

Thesis performed at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: DSc Karolina Vrandečić, Associate Professor

Number of pages: 31

Number of figures: 14

Number of tables: 3

Number of references: 13

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: propolis, *Fusarium solani*, *Pythium irregulare*, organic agriculture

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. DSc Karolina Vrandečić, Associate professor, mentor
2. Dsc Jasenka Čosić, 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.

