

# Inhibicija rasta fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae* djelovanjem kinazolinona

---

Martić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:229786>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



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

Marija Martić

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE BAKTERIJE  
*PSEUDOMONAS SYRINGAE* DJELOVANJEM  
KINAZOLINONA**

Diplomski rad

**Osijek, 2022.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marija Martić

Diplomski studij Ekološka poljoprivreda

**INHIBICIJA RASTA FITOPATOGENE BAKTERIJE  
*PSEUDOMONAS SYRINGAE* DJELOVANJEM  
KINAZOLINONA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskoga rada:

1. prof. dr. sc. Vesna Rastija, predsjednik
2. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. doc. dr. sc. Dejan Agić, član

**Osijek, 2022.**

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD.....  | 1  |
| 2. PREGLED LITERATURE.....  | 2  |
| 2.1. Utjecaj kemijskih sredstava na ekosustav .....                   | 2  |
| 2.2. Biološka aktivnost kinazolinona.....                             | 4  |
| 2.3. Osobine fitopatogene bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> ..... | 6  |
| 2.4. Zaštita usjeva od bakterioza .....                               | 10 |
| 3. MATERIJAL I METODE .....   | 15 |
| 4. REZULTATI .....  | 19 |
| 5. RASPRAVA .....   | 22 |
| 6. ZAKLJUČAK.....   | 27 |
| 7. POPIS LITERATURE .....   | 28 |
| 8. SAŽETAK .....  | 32 |
| 9. SUMMARY .....  | 33 |
| 10. POPIS SLIKA.....  | 34 |
| 11. POPIS TABLICA.....  | 35 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

Porast broja stanovništva na Zemlji i globalno zatopljenje su trenutno dva glavna problema čije posljedice zabrinjavaju populaciju diljem svijeta (Kumar i sur., 2017.). Stvara se pritisak na proizvodnju hrane, ograničenu dostupnost zemljišta te stanje okoliša (Kumar i sur., 2017.). Glavni izazov za poljoprivrednu proizvodnju je povećanje prinosa uz očuvanje okoliša. Kako bi se zadovoljile velike potrebe za hranom, poljoprivredni proizvođači koriste velike količine gnojiva i pesticida (Kumar i sur., 2017.). Brojni biotski i abiotski čimbenici utječu na rast i razvoj biljaka (Kumar i sur., 2017.). Zbog borbe s uzročnicima bolesti, proizvođači posežu za pesticidima. Njihova primjena je često obilna i neprikladna, što za posledicu može uzrokovati otpornost patogenih organizama na zaštitna sredstva. Kemijsko suzbijanje biljnih bolesti uzrokovanih bakterijama je manje učinkovito nego suzbijanje bolesti uzrokovanih fitopatogenim gljivama (Thind, 2019.). Razlog tome je smanjen broj dostupnih učinkovitih kemikalija (Thind, 2019.). Nadalje, brojni antibiotici, koji su učinkoviti pri suzbijanju bakterija, su zabranjeni za korištenje zbog mogućeg prijenosa rezistencije na ljudske i životinjske patogene (Thind, 2019.). Zabrinutost za stanje okoliša i zdravlje ljudi, teži se pronalasku djelotvornih sredstava koji ne ugrožavaju ekosustav.

Derivati kinazolinona su pokazali veliku učinkovitost u medicini, suzbijajući brojne uzročnike bolesti, djelujući antibakterijski, antifungalno, antivirusno, protuupalno, antikancerogeno, antioksidativno i drugo (Asif, 2014.). U ovom radu dat je osvrt na mogućnost njihove upotrebe u poljoprivrednoj proizvodnji u suzbijanju fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae*.

## **2. PREGLED LITERATURE**

Tijekom proizvodnje poljoprivrednih proizvoda te njihova skladištenja, brojne bolesti i štetnici uzrokuju velike gubitke i povećane troškove. Nastala je potreba za novim metodama suzbijanja bolesti i njihovih uzročnika kako bi se povećala proizvodnja bez utjecaja na okoliš (Kumar i sur., 2017.).

### **2.1. Utjecaj kemijskih sredstava na ekosustav**

Cilj intenzivne poljoprivredne proizvodnje jest ostvarivanje visokih prinosa, odnosno profita (Šeremešić i sur., 2017.). Kako bi se to postiglo, uzgajaju se visokoprinosne sorte i hibridi uz obilnu upotrebu mineralnih gnojiva, kemijskih sredstava za zaštitu bilja, navodnjavanjem, upotrebom teške mehanizacije i genetičkog inženjeringa (Kovačević i sur., 2011., Kumar i sur., 2017., Šeremešić i sur., 2017.). Dolazi do niza promjena prirodnog okruženja, uklanjanjem drveća i prenamjenom zemljišta, intenzivna obrada tla, smanjena biološka raznolikost s ciljem održavanja uniformnosti – uzgoj monokultura na većim površinama, nepoštivanje plodoređa (Kovačević i sur., 2011.). Šezdesetih godina prošloga stoljeća počela je rasti zabrinutost za zdravlje ljudi i ekosustav zbog povećane upotrebe pesticida u poljoprivredi (Šeremešić i sur., 2017.). Tehnološki napredak i visoki prinosi donose kratkoročnu dobit i dugoročne posljedice (Fanuko, 2005.). Uz promet i industriju, konvencionalna poljoprivredna proizvodnja je najveći zagađivač okoliša (Srpak i Zeman, 2018.). Zbog neracionalne upotrebe mineralnih gnojiva, pesticida, veterinarskih preparata, hormona, rada mehanizacije, velikog broja grla u stadu na jednoj površini, prevelike proizvodnje nusproizvoda kao što su stajnjak ili metan, pretjerane ispaše i drugo (Kovačević i sur., 2011.).

FAO je 2015. godine proglasio zemljište neobnovljivim prirodnim resursom (Šeremešić i sur., 2017.). Održiva poljoprivreda teži očuvanju zdravog i kvalitetnog tla. Tijekom vegetacijske sezone, biljke iz tla iznose različite količine dušika, fosfora i kalija, koje se moraju nadoknaditi gnojidbom. Problem nastupa kada ta gnojidba nije adekvatna. Upotrebljavaju se pogrešna gnojiva u velikim količinama. Usjevi ne mogu koristiti elemente ishrane, kvari se struktura tla, smanjuje se razgradnja organske tvari, ispiru se u dublje slojeve tla te dospijevaju u podzemne vode (Kovačević i sur., 2011.).

Poljoprivreda predstavlja opasnost za zagađenje vode. Velike količine različitih kemijskih sredstava dospijevaju u zemljište, površinske i podzemne vode. Voda se zagađuje teškim metalima, nitratima, nitritima, fosfatima, policikličnim aromatskim ugljikovodicima. Posljedice su uništavanje pitkih voda, utjecaj na zdravlje biljaka, ljudi i životinja, eutrofikacija (Kovačević i sur., 2011.).

Poljoprivrednim aktivnostima, sagorijevanjem ulja i goriva, prirodnih plinova, drveta, ispušta se velika količina ugljikova dioksida, ugljikova monoksida, sumporovog dioksida, dušikova oksida, metana, čestica čađi i prašine. Tako dolazi do promjene prirodnog odnosa i koncentracije osnovnih elemenata atmosfere (Kovačević i sur., 2011.).

Gubitak biološke raznolikosti, jedan je od važnih problema 21. stoljeća (Šeremešić i sur., 2017.). Biološka raznolikost, odnosno biodiverzitet je na samitu UN-a 1992. godine u Rio de Janeiru definiran kao „raznolikost među organizmima svih staništa“ s naglaskom na njegovo očuvanje (Šeremešić i sur., 2017.). Ove teze su uklopljene i u nove globalne ciljeve održivog razvoja UN-a. U Republici Hrvatskoj su nestale brojne sorte biljaka te životinjske pasmine jer nisu produktivne i konkurentne kao što je riječ o konvencionalnim sortama i pasminama (Fanuko, 2005.). Mnogi su razlozi smanjenja biološke raznolikosti. Među najvažnijim i najčešćim razlogom jest uništavanje staništa. Krčenjem šuma dobivaju se velike oranice, no gubi se stanište brojnih organizama (Fanuko, 2005.). Staništa se presijecaju brojnim prometnicama, građevinskim objektima, brojne biljne i životinjske vrste se prekomjerno iskorištavaju i love, mijenja se klima, onečišćuje se okoliš te se unose strane invazivne vrste (Fanuko, 2005.).

Poljoprivreda se smatra jednim od uzročnika povećane emisije stakleničkih plinova (Šeremešić i sur., 2017.). Njihovim djelovanjem dolazi do dodatnog zagrijavanja Zemljine površine, time i do globalnog zatopljenja. Otapa se led na polovima, povećava se razina mora, povisuju se temperature (Fanuko, 2005.). Smatra se, ako se povećaju temperature za nekoliko stupnjeva, za posljedicu bi došlo do propadanja agrosfere, velikih suša, erozije tla te pojave termofilnih štetnika (Fanuko, 2005.). Ozon, koji se nalazi 20 do 30 km iznad Zemljine površine, apsorbira najveći dio Sunčeva zračenja. Bez njega život na Zemlji ne bi bio moguć. Zbog raznih spojeva, kao što su freoni, haloni, dušikovi oksidi, razara se ozon i stvaraju se takozvane „ozonske rupe“ (Fanuko, 2005.).

## 2.2. Biološka aktivnost kinazolinona

Fitopatogeni organizmi uzrokuju velike štete u poljoprivrednoj proizvodnji. Upotreba zaštitnih sredstava dovela je do otpornosti uzročnika bolesti na pesticide te je nastala potreba za novim učinkovitim sredstvima koja nemaju toksičan učinak na okoliš. Zbog svojih bioloških aktivnosti, kinazolinoni se ističu kao potencijalno sredstvo za zaštitu biljaka.

Kinazolin je spoj sastavljen od 2 spojena šesteročlana aromatična prstena, benzenskog i pirimidinskog prstena (Mahato i sur., 2011.). Kinazolinoni su oksidirani oblici kinazolina te tako pripadaju kinazolinskim alkaloidima (Mahato i sur., 2011.). Prirodni i sintetizirani kinazolini i kinazolinoni privlače pozornost zbog širokog spektra farmakoloških aktivnosti (Mahato i sur., 2011.). Ovisno o položaju keto ili okso skupina, ovi spojevi se mogu klasificirati u 3 skupine: 2(1*H*)-kinazolinoni, 4(3*H*)-kinazolinoni i 2,4(1*H*,3*H*)-kinazolinoni (Asif, 2014., Mahato i sur., 2011.).

Heterociklični spojevi, koji sadrže kinazoline i kinazolinone, imaju važnu ulogu i području medicine (Asif, 2014.). Mnogi supstituirani derivati kinazolina i kinazolinona posjeduju brojne bioaktivnosti, kao što su: antimalarijska, antikancerogena, antimikrobna, antifungalna, antivirusna, protuupalna, diuretička, antituberkulozna, antidepresivna, herbicidna, akaricidna djelovanja (Asif, 2014., Karan i sur., 2021.).

Kinazolin i njegovi brojni derivati se mogu ekstrahirati iz biljaka kao što su *Adhatoda vasica*, *Polygonum tinctorium*, *Strobilanthes cusia*, *Isatis tinctoria*, *Peganum harmala* (He i sur., 2017., Karan i sur., 2021.). Prirodni kinazolinoni, koji imaju široku upotrebu u tradicionalnoj medicini, izolirani su iz biljaka i mikroorganizama, dok je većina derivata kinazolinona dobivena procesom sinteze kroz određene kemijske reakcije (Radwan i Alanazi, 2020.).

Zbog brojnih mogućnosti djelovanja, kinazolini i kinazolinoni se koriste u proizvodnji brojnih lijekova (Asif, 2014.).

Nekoliko 4-hidroksikinolin alkaloida, izoliranih iz *Pseudomonas aeruginosa* BCC76810, pokazali su antimalarijska svojstva (Shang i sur., 2018.). Među njima su: 2-*n*-oktil-4-hidroksikinolin, 2-*n*-nonil-4-hidroksikinolin, 2-*n*-undecil-4-hidroksikinolin, 2-(*E*)-non-1'-enil-4-hidroksikinolin, *n*-heptil-4-hidroksikinolin-*N*-oksid, 2-nonil-4-hidroksikinolin-*N*-oksid, 2-((*Z*)-undec-4'-enil)-4-hidroksikinolin, 2-(3'-(2'-heksilciklopropil)propil)-4-hidroksikinolin, 2-*n*-oktil-4-hidroksikinolin-*N*-oksid, 2-((*Z*)-undec-4'-enil)-4-



hidroksikinolin-*N*-oksid, 3-*n*-heptil-3-hidroksikinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (Shang i sur., 2018.).

Ghorab i sur. (2000.) su ispitali antifungalna djelovanja fluoriranih derivata hidrokinaolina na gljivama *Aspergillus ochraceus* Wilhelm AUCC-230), *Penicillium chrysogenum* Thom (AUCC-530), *Aspergillus flavus* Link (AUCC-164) i *Candida albicans* (Robin) Berkho (AUCC-1720) koristeći metodu difuzije na agaru, a za usporedbu je korišten fungicid Trosyd (tiokonazol). Rezultati su pokazali najaktivnije djelovanje 4-amino-11-(4'-fluorofenil)-7,8,9,10,11-pentahidropirimidino[4',5':4,5]-tiazolo[2,3-*b*]-kinazolin-10-on, 11-(4'-fluorofenil)-3,4,7,8,9,10,11-heptahidropirimidino[4',5':4,5] tiazolo[2,3-*b*]-kinazolin-4,10-dion, 4-amino-3-fenil-2-tiokso-11-(4'-fluorofenil)-2,3,7,8,9,10,11-heptahidropirimidino[4',5':4,5]-tiazolo[2,3-*b*]kinazolin-10-on i 2-metil-11-(4'-fluorofenil)-3,4,7,8,9,10,11-heptahidropirimidino[4',5':4,5]tiazolo[2,3-*b*]-kinazolin-4,10-dion protiv *A. ochraceus*, *P. chrysogenum* i *A. flavus* s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 40 µg mL<sup>-1</sup> (Ghorab i sur., 2000.). U usporedbi sa fungicidom, protiv *C. albicans* su se dobrim pokazali 3-fenil-5-(4-fluorofenil)-5,6,7,8,9-pentahidrotiazolo[2,3-*b*]kinazolin-6-on i 3-amino-2-cijano-5-(4'-fluorofenil)-5,6,7,8,9-pentahidrotiazolo[2,3-*b*]-kinazolin-6-on s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 40 µg mL<sup>-1</sup> (Ghorab i sur., 2000.).

Kinazolini i kinazolinoni su česti u medicinskoj upotrebi. Zbog svojih brojnih djelovanja koriste se kao analgetici, antipsihotici, antiaritmici, protuupalna sredstva, antimalarijska sredstva i drugo (Asif, 2014., Karan i sur., 2021.).

Ovi spojevi djeluju protiv virusa, ubijaju ih ili smanjuju stopu njihova rasta, bez negativnih ili toksičnih posljedica za domaćina (Karan i sur., 2021.). Zahvaljujući strukturno-djelotvornom odnosu, supstituirani kinazolinoni i njegovi sintetizirani derivati se koriste kao antitumorska i antikancerogena sredstva (Karan i sur., 2021.).

Kinolin indol alkaloid kamptotecin (CPT) pokazao je inhibitorno djelovanje na stanice tumora pri čemu dolazi do zaustavljanja staničnog ciklusa u S-fazi ili se nastavlja s akumulacijom oštećene DNA, što u konačnici rezultira sa smrću stanica (Shang i sur., 2018.).

Patel i Patel (2011.) su ispitali djelovanje derivata kinazolinona *in vitro* metodom cilindara prema Gram pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram negativnim bakterijama *P. aeruginosa* ATCC 9027 i *Escherichia coli* ATCC 25922 te gljivi *C. albicans* ATCC 10231 mjerenjem zone inhibicije u

koncentracijama 100 i 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Rezultati su pokazali dobro djelovanje (50.88 – 52.88 %) derivata 6-bromo-3-(2-klorobenzilidenamino)-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-kinazolin-4(3*H*)-on, 6-bromo-3-(4-klorobenzilidenamino)-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-kinazolin-4(3*H*)-on, 6-bromo-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-3-(4-metoksibenzilidenamino)-kinazolin-4(3*H*)-on, 6-bromo-3-[3-kloro-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-1-il]-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-kinazolin-4(3*H*)-on i 6-bromo-3-[3-kloro-4-(3,4,5-trimetoksifenil)-2-oksoazetidin-1-il]-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-kinazolin-4(3*H*)-on protiv *S. aureus* (Patel i Patel, 2011.). Derivati 6-bromo-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-3-(4-metoksibenzilidenamino)-kinazolin-4(3*H*)-on i 6-bromo-3-[3-kloro-4-(4-metoksifenil)-2-oksoazetidin-1-il]-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-kinazolin-4(3*H*)-on su također imali dobro djelovanje (60 %) u suzbijanju *B. subtilis* i *E. coli* (56,66 i 64,29 %) (Patel i Patel, 2011.). Protiv *C. albicans* dobru aktivnost je imao derivat 6-bromo-3-[3-kloro-4-(4-klorofenil)-2-oksoazetidin-1-il]-2-[2-(2,6-diklorofenil)amino]benzil-kinazolin-4(3*H*)-on (56,03 %) (Patel i Patel, 2011.).

Derivati 3-aril-6,8-dikloro-2*H*-1,3-benzoksazin-2,4(3*H*)-dioni i 3-arilkinzolin-2,4(1*H*,3*H*)-dioni su prijavljeni kao kemoterapeutska sredstva u liječenju tuberkuloze, uzrokovana *Mycobacterium tuberculosis* (Mahato i sur, 2011.).

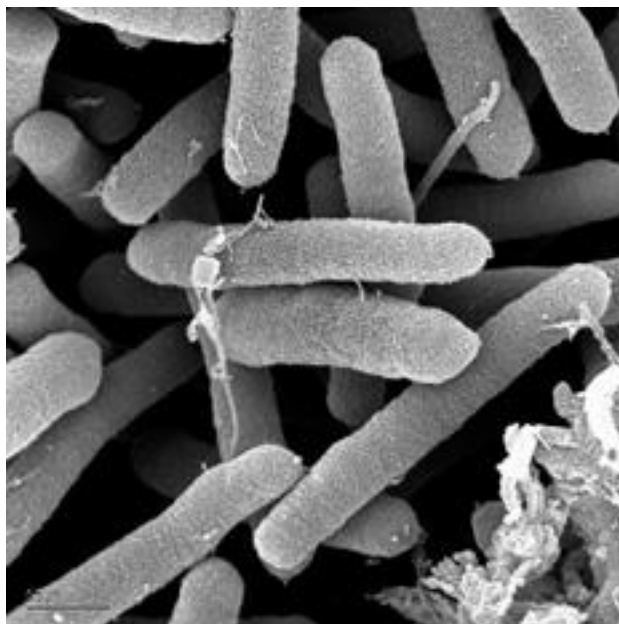
Osim u humanoj upotrebi, ovi spojevi imaju i potencijalnu ulogu kao pesticid u poljoprivrednoj proizvodnji zbog prikazanih bioloških aktivnosti.

### 2.3. Osobine fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae*

Bakterije su jedan od uzročnika biljnih bolesti (Kumar i sur., 2017.). Posjeduju širok spektar domaćina (Thind, 2019.). Zbog njihova djelovanja, velike količine poljoprivrednih usjeva i hrane se svakodnevno uništava (Kumar i sur., 2017.).

*P. syringae* je aerobna Gram-negativna bakterija (Slika 1.) (Kumar i sur., 2017.). Uzrokuje bolesti na različitim kulturama, kao što su krumpir, rajčica, duhan, trešnja, višnja, marelica, jasen, hrast i biljke iz porodice *Cucurbitaceae* (Young, 1991.). Optimalan raspon temperatura za rast iznosi od 18 do 24 °C (Križanac i Plavec, 2016.) te visoka vlažnost (Ivić, 2019.). Preživljavaju nepovoljne uvjete na površini sjemena, ostacima biljnog tkiva

(Križanac i Plavec, 2016.). Šire se pomoću korištene mehanizacije i alata te pomoću sustava za navodnjavanje, a širenje zaraze je brže u zaštićenim prostorima, nego na otvorenom polju (Križanac i Plavec, 2016.).



Slika 1. Mikroskopski prikaz bakterije *P. syringae*

IZVOR: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas\\_syringae:\\_The\\_Pathogen\\_and\\_Epiphyte](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_syringae:_The_Pathogen_and_Epiphyte)

*P. syringae* se opisuje kao lokalno infektivni patogen, a inficira uglavnom nadzemne dijelove biljaka, kao što su listovi, stabljike i plodovi (Xin i He, 2013.). Često se infekcija zadržava unutar nekoliko milimetara od početnog mjesta infekcije i ne širi se na druge dijelove biljaka (Xin i He, 2013.). Životni ciklus ovog patogena se odvija u 2 ciklusa koji su međusobno vremenski i prostorno povezani: početna epifitska faza nakon dolaska na površinu zdrave biljke domaćina te ulazak u biljku kroz prirodne otvore ili rane (Xin i He, 2013.). Pri povoljnim okolišnim uvjetima (npr. kiša, visoka vlažnost, umjerena temperatura) se vrlo agresivno razmnožava u osjetljivom domaćinu (Xin i He, 2013). Simptomi infekcije se pojavljuju na listovima u obliku nekrotičnih pjega (Young, 1991.). Smatra se da je infekcija izvršena kroz puči te se dalje širi u peteljke i stabljike (Young, 1991.). Uzročnik je bakterijske pjegavosti, uvenulosti zeljastih biljaka te rak-rana i bakterijskog oboljenja voćaka (Trkulja i sur., 2009.).

Rajčica predstavlja jednu od važnijih kultura koje se uzgajaju na području Republike Hrvatske (Križanac i Plavec, 2016.). Razni abiotski i biotski čimbenici utječu na prinos

rajčice. Gospodarski najvažnije bakterioze uzrokuju *P. syringae* pv. *tomato*, uzročnik bakterijske pjegavosti rajčice, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* koja uzrokuje krastavost ploda rajčice te *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, uzročnik bakterijskog venuća (Križanac i Plavec, 2016.). Simptomi su često prisutni u nasadima, a razvoj bolesti i stupanj zaraze ovisi o abiotičkim čimbenicima te razini primarnog inokuluma (Križanac i Plavec, 2016.). Simptomi bakterijske pjegavosti se uočavaju u obliku crnih pjega, promjera oko 2 mm (Križanac i Plavec, 2016.), okružene klorotičnim prstenom (Ivić, 2019.). Pjege su smještene uz rub listova, a mogu uzrokovati i deformaciju lisne plojke (Križanac i Plavec, 2016.). Pjege se mogu pojaviti kasnije na plodovima i stapkama (Križanac i Plavec, 2016.).

*P. syringae* je uzročnik i bakterijske paleži graška (Fondevilla i sur., 2012., cit. Lawyer i Chun, 2001.) te može uzrokovati gubitak prinosa i do 70 % (Fondevilla i sur., 2012., cit. Richardson i Hollaway, 2011.). Hladni i vlažni vremenski uvjeti pospješuju razvoj bolesti i njezinom širenju. Patogen prodire u domaćina kroz ozljede koje mogu biti uzrokovane mrazom. Kultivari koji su otporniji na mraz su manje podložni napadu patogena te razvoju ove bolesti (Fondevilla i sur., 2012.). Simptomi bakterijske paleži na grašku se najčešće pojavljuju u obliku vodenastih eliptičnih lezija koje kasnije mijenjaju boju u maslinasto-zelenu, a zatim nekrotiziraju. Teška infekcija stabljike može uzrokovati smrt biljke (Fondevilla i sur., 2011.).

*P. syringae* pv. *lachrymans* uzrokuje uglatu pjegavost lista na biljkama iz porodice tikvenjača (*Cucurbitaceae*) – krastavac, dinja, bundeva, tikvica. To je najraširenija bakterioza koja znatno utječe na smanjenje prinosa i kakvoću plodova (Plavec, 2019.). Infekcija se vrši ulaskom fitopatogena kroz prirodne otvore ili rane. Prvi simptomi se uočavaju već na kotiledonima jer se patogen može širiti sjemenom. Kasnije, na listovima se uočavaju prepoznatljive vodenaste pjege koje se s vremenom šire, a omeđene lisnim žilama dobivaju uglast oblik, po čemu je ova bolest i dobila ime (Plavec, 2019.). Pjege nekrotiziraju i ispadaju te list postaje rupičast (Plavec, 2019., cit. Arsenijević, 1997.). Mladi zaraženi plodovi tamne, smežuraju se i otpadnu, a na zrelih se javljaju okrugle male pjege. Patogen je dobio ime po lat. riječi *lacryma* – suza zbog bakterijskog eksudata zaraženih dijelova prljavobijele do svijetložute boje u obliku suze koji kasnije tamni (Plavec, 2019.).

Uzročnik bakterijske paleži ili plamenjače soje je *P. syringae* pv. *glycinea* (Vratarić i Sudarić, 2009.). Najznačajnija je bakterioza ove biljke (Balaž i Aćimović, 2008.).

Rasprostranjena je u područjima s umjerenom klimom, a pri povoljnim uvjetima te na osjetljivim sortama uzrokuje značajne ekonomske gubitke (Balaž i Aćimović, 2008.). Jači napad ove bolesti je u godinama s puno oborina i prohladnim vremenom (Vratarić i Sudarić, 2009.). Pojavljuje se u svim fazama rasta i razvoja biljke (Vratarić i Sudarić, 2009.). Na početku vegetacijske sezone može uzrokovati velike probleme, kao što je gubitak klijavosti sjemenja, smanjenje energije klijanja te sušenje klijanaca (Balaž i Aćimović, 2008.). Simptomi se uočavaju na nadzemnim dijelovima biljke, listovima, peteljka, stabljici, mahunama i sjemenu u obliku vodenastih pjega koje nekrotiziraju (Vratarić i Sudarić, 2009.). Suzbijanje se vrši preventivno – agrotehničke mjere i kurativno – primjena baktericida (Balaž i Aćimović, 2008.).

Trkulja i sur. (2009.) uočili su oboljele biljke kruške. Analizom izolata utvrđena je prisutnost uzročnika infekcije *P. syringae* pv. *syringae* van Hal (Trkulja i sur., 2009.). Rasprostranjena je diljem svijeta, a smatra se najštetnijim patogenom kruške (Trkulja i sur., 2009.). Simptomi su u vrijeme cvjetanja uočeni u obliku sušenja cvjetova i grančica (Trkulja i sur., 2009.). U početnim fazama, cvjetovi poprimaju smeđu boju, a razvojem bolesti, cvjetovi, grančice i listovi postaju crne boje te se suše i odumiru (Slika 2.) (Trkulja i sur., 2009.). Kod jače infekcije dolazi do pucanja i odumiranja kore i sušenja jače inficiranih grana (Trkulja i sur., 2009.).



Slika 2. Simptomi napada *P. syringae* pv. *syringae* na granama kruške

**IZVOR:** Trkulja i sur. (2009.) Etiološka proučavanja pojave nekroze cvjetova i mladica kruške u sjeverozapadnom dijelu Bosne i Hercegovine

*P. syringae* pv. *morsprunorum* uzrokuje bakterijski rak na trešnji, a javlja se i na višnji, šljivi, a rjeđe breskvi i marelici (Šubić, 2016.). Javljaju se promjene na kori primarnih i sekundarnih grana te pjegavost plodova (Šubić, 2016.).

*P. syringae* pv. *savastanoi* pojavljuje se na deblu i granama masline, ozlijeđenih tučom, vjetrom, rezidbom ili kukcima, uzrokujući rak masline (Fanuko, 2005.). Za razliku od starijih, mlade sadnice teško preživljavaju napad ove bakterije pri čemu se na mladim granama prvo uočavaju tamne izrasline raka, a potom se grane suše (Fanuko, 2005.).

#### **2.4. Zaštita usjeva od bakterioza**

Biljne bolesti predstavljaju velik rizik tijekom poljoprivredne proizvodnje zbog mogućnosti nastanka velikih šteta i gubitka (Ivić, 2014.). Visoki i kvalitetni prinosi se postižu kontrolom bolesti ili njezina uzročnika mjerama koje su učinkovite, ekonomski isplative, stabilne, ali i društveno prihvatljive (Ivić, 2014.). Smanjenje negativnog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliša, provode se integrirane mjere zaštite bilja (Ivić, 2014.). U njih ubrajamo agrotehničke, mehaničke, fizikalne, biotehničke ili biološke mjere (Ivić, 2014.). Integrirane mjere zaštite bilja predstavljaju preventivne mjere kojima se osigurava optimalno zdravstveno stanje biljaka te se smanjuje mogućnost nastanka stresa (Trkulja i sur., 2009.). Zaštitna sredstva se upotrebljavaju kada preventivne mjere nisu dovoljne (Bažok i sur., 2020.). Iako posjeduju brojne prednosti, kao što je visoka učinkovitost i brzo djelovanje, njihova upotreba može imati i negativne posljedice. Primjena pesticida može dovesti do pojave fitotoksičnosti i rezistentnosti organizama na aktivne tvari (Mešić i sur., 2018.), perzistentnosti, bioakumulacije, neselektivnog djelovanja, ostataka pesticida, poremećaja prirodne ravnoteže koja dovodi do nastanka novih štetnih organizama (Bažok i sur., 2020.). Kako bi se navedeno izbjeglo, potrebno je utvrditi potrebu za primjenom zaštitnih sredstava, optimalan rok za korištenje, pravilan odabir učinkovitog sredstva i optimalnu primjenu, ovisno o vrsti kulture, razvoju bolesti, vremenskim prilikama i drugo (Mešić i sur., 2018.).

Obzirom na posljedice upotrebe zaštitnih sredstava, istraživači ispituju mogućnost i učinkovitost drugih sredstava, koja nisu štetna za zdravlje ljudi i stanje okoliša.

Sulfonski derivati su važna klasa bioaktivnih spojeva koji imaju širok spektar djelovanja, kao što je insekticidno, antifungalno, antibakterijsko, herbicidno djelovanje (Xu i sur.,

2012.). Xu i sur. (2012.) su istraživali učinkovitost sulfonskih derivata pri suzbijanju bakterijskog venuća duhana, uzrokovanog fitopatogenom bakterijom *Ralstonia solanacearum*. Sintetiziran je niz derivata, no najboljim se pokazao 2-(etilsulfonyl)-5-(4-fluorofenyl)-1,3,4-oksadiazol (Xu i sur., 2012.). Pokus je proveden *in vitro* turbidimetrijskom metodom i *in vivo* u stakleničkim i poljskim uvjetima (Xu i sur., 2012.). Rezultati su pokazali kako je navedeni derivat pokazao inhibiciju rasta bakterije od 50 % u koncentraciji od 32,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  *in vitro*, u stakleničkim uvjetima učinkovitost je bila 85,5 % pri koncentraciji 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a na polju pri dozi od 405 g aktivne tvari  $\text{ha}^{-1}$  učinkovitost je bila 65,3 %, 68,8 % i 71,9 % nakon 7., 14. i 21. dana od tretiranja.

Tang i sur. (2013.) su sintetizirali i ispitivali antibakterijsku aktivnost novih derivata amida koji sadrže triazolni dio protiv fitopatogene bakterije *R. solanacearum*. Pri koncentraciji od 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dobrim su se pokazali spojevi *N*-(4-(3-(2,4-diklorofenyl)-3-okso-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)prop-1-en-1-yl)fenyl)-5-kloro-2-hidroksibenzamid, *N*-(4-(3-(2,4-diklorofenyl)-3-okso-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)prop-1-en-1-yl)fenyl)-3,5-dimetilbenzamid i *N*-(4-(3-(2,4-diklorofenyl)-3-okso-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)prop-1-en-1-yl)fenyl)-2-fluorbenzamid postižući inhibicijsku stopu od 55 %, 71 % i 65 % (Tang i sur., 2013.).

Li i sur. (2015.) su ispitivali antibakterijsko djelovanje derivata 2-merkaptio-5-supstituiranog 1,3,4-oksadiazola/tiadiazola protiv fitopatogenih bakterija *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* i *R. solanacearum* koje uzrokuju bakterijsku palež riže i bakterijsko venuće rajčice. Pokus je proveden *in vitro* korištenjem turbidimetrijske metode te *in vivo* u stakleničkim uvjetima, odnosno u poljskom pokusu (Li i sur., 2015.). U oba ispitivanja, najboljim se pokazao 2-merkaptio-5-fenyl-1,3,4-tiadiazol. U istom istraživanju *in vitro* pokusu utvrđeno je baktericidno djelovanje prema ispitanim bakterijama u koncentraciji od 14.69 i 15.14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a u poljskom pokusu je pokazao učinkovitost od 47,15 % pri koncentraciji od 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema *X. oryzae* nakon 15 dana od prvoga tretiranja te 79,07 % učinkovitosti 13 dana nakon drugog tretiranja protiv *R. solanacearum* u koncentraciji od 150 g aktivne tvari  $\text{ha}^{-1}$ .

Jiang i sur. (2020.) su dizajnirali, sintetizirali i ispitivali derivate miricetina koji sadrže sulfonamidni dio kao antibakterijsko sredstvo protiv *X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* i *R. solanacearum*. Istraživanje je provedeno *in vitro* turbidimetrijskom metodom i *in vivo* (Jiang i sur., 2020.). *In vitro* pokus je proveden u koncentracijama 50 i 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a najboljim su se pokazali 3-(4-((1-((3-fluorofenyl)sulfonyl)piperidin-4-yl)(metil)amino)butoksi)-5,7-dimetoksi-2-(3,4,5-trimetoksifenil)-4*H*-kromen-4-on sa 4,7  $\mu\text{g}$

$\text{mL}^{-1}$  protiv *X. oryzae* pv. *oryzae* i 3-(3-((1-((3-fluorofenil)sulfonil)piperidin-4-il)(metil)amino)propoksi)-5,7-dimetoksi-2-(3,4,5-trimetoksifenil)-4*H*-kromen-4-on sa 1,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  protiv *X. axonopodis* pv. *citri* (Jiang i sur., 2020.). *In vivo* rezultati su pokazali najbolje djelovanje spoja 3-(4-((1-((3-fluorofenil)sulfonil)piperidin-4-il)(metil)amino)butoksi)-5,7-dimetoksi-2-(3,4,5-trimetoksifenil)-4*H*-kromen-4-on pri koncentraciji od 200 i 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  s učinkovitosti od 63,3 % i 58,2 % protiv *X. oryzae* pv. *oryzae* (Jiang i sur., 2020.).

Flavonoidi i izoflavoni predstavljaju važne prirodne produkte jestivih biljaka (Chen i sur., 2020.). Kalkon predstavlja građevnu jedinicu flavonoida i izoflavona te posjeduje niz bioloških aktivnosti kao što je antibakterijsko, antifungalno, insekticidno, protuupalno, antiviralno djelovanje (Chen i sur., 2020.). Isti autori su ispitivali *in vitro* antibakterijsko djelovanje derivata kalkona s tioeter triazolom u inhibiciji rasta fitopatogenih bakterija *X. oryzae* pv. *oryzae*, *R. solanacearum* i *X. axonopodis* pv. *citri*. Protiv *X. oryzae* pv. *oryzae* najboljim su se pokazali spojevi (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-bromofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2,4-diklorofenil)prop-2-en-1-on i (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-on pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gdje je inhibicija rasta iznosila 64,1 %, 85,9 %, 56,5 % i 56,3 %, što je pokazalo bolje rezultate od komercijalnog sredstva Bismertiazola (47 %) (Chen i sur., 2020.). Protiv iste bakterije, pri koncentraciji od 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dobri su se pokazali spojevi (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-bromofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2,4-diklorofenil)prop-2-en-1-on i (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-on s inhibicijom rasta od 54,9 %, 76,4 %, 51,4 % i 47,6 %, što je također bolje od kontrolnog komercijalnog sredstva Bismertiazola (39,6 %).

Protiv fitopatogene bakterije *R. solanacearum* pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  najbolje rezultate su pokazali spojevi (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on i (*E*)-1-(2-(2-



((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2,4-diklorofenil)prop-2-en-1-on s inhibicijom rasta bakterije od 69,5 %, 64,0 %, 65,6 % i 66,9 %, a pri istoj koncentraciji Bismertiazol je imao stopu inhibicije od 61,1 % (Chen i sur., 2020.). Pri koncentraciji od 50 µg mL<sup>-1</sup> bolje rezultate od Bismertiazola (49,5 %) su imali spojevi (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(3-nitrofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2-metoksifenil)prop-2-en-1-on i (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-bromofenil)prop-2-en-1-on gdje je inhibicija rasta bakterije iznosila 59,3 %, 51,7 % i 54,5 % (Chen i sur., 2020.).

Pri koncentraciji od 100 µg mL<sup>-1</sup>, protiv *X. axonopodis* pv. *citri* bolje rezultate od Bismertiazola (59,5 %) su pokazali spojevi (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2,4-diklorofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-on i (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2-klorofenil)prop-2-en-1-on s inhibicijom rasta od 77,1 %, 71,3 %, 84,1 % i 76,8 % (Chen i sur., 2020.). Pri koncentraciji od 50 µg mL<sup>-1</sup> protiv iste bakterije su najbolji bili spojevi (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-fluorofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(2-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(2,4-diklorofenil)prop-2-en-1-on, (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-on i (*E*)-1-(4-(2-((4-amino-5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)tio)etoksi)fenil)-3-(4-klorofenil)prop-2-en-1-on s inhibicijom rasta bakterije od 63,3 %, 66,0 %, 68,1 % i 72,9 %, a Bismertiazol je pri istoj koncentraciji imao stopu inhibicije 49,4 % (Chen i sur., 2020.).

Fan i sur. (2019.). su ispitali antimikrobnu aktivnost derivata 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-fenilacetamida protiv fitopatogenih bakterija *X. oryzae* pv. *oryzae*, *R. solanacearum* i *X. axonopodis* pv. *citri*. *In vitro* pokus turbidimetrijskom metodom je pokazao kako su spojevi 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2,4-diklorofenil)acetamid i 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(3-fluorofenil)acetamid imali najveću inhibicijsku stopu rasta (84,6 % i 83,4 %) prema *X. oryzae* pv. *oryzae* pri koncentraciji od 100 µg mL<sup>-1</sup> (Fan i sur., 2019.). Spojevi 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(4-(trifluorometil)fenil)acetamid,

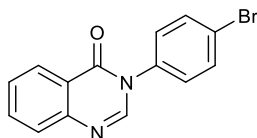
2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2-nitrofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(3-nitrofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(4-metoksifenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2,4-difluorofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2,4-diklorofenil)acetamid su pokazali inhibicijsku stopu rasta od 41.9 %, 39.2 %, 47.6 %, 32.6 %, 32.0 % i 32.8 % pri koncentraciji 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema *X. axonopodis* pv. *citri* (Fan i sur., 2019.).  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti spojeva 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-fenilacetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(3-fluorofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(4-fluorofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2,4-diklorofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2-nitrofenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(4-metoksifenil)acetamid, 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2,4-difluorofenil)acetamid i 2-((2-(4-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)kinazolin-4-il)oksi)-*N*-(2,4-diklorofenil)acetamid je iznosila 55.6, 35.0, 53.2, 36.5, 72.0, 54.4, 79.6 i 32.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema *X. oryzae* pv. *oryzae* što je znatno bolji rezultat od kontrolnog sredstva Bismertiazola čija  $\text{EC}_{50}$  vrijednosti iznosi 89,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fan i sur., 2019.).

Osim navedenih tvari, istraživači ispituju i djelotvornost derivata kinazolinona kao potencijalnih novih sredstava za zaštitu usjeva od bakterioza (Khodarahmi i sur., 2012., Lv i sur., 2018., Yan i sur., 2016., Zhang i sur., 2018., ). Njihova djelotvornost će detaljnije biti opisana u slijedećim poglavljima.

Cilj istraživanja je bio utvrditi djelotvornost osam derivata kinazolinona na rast fitopatogene bakterije *P. syringae* *in vitro*.

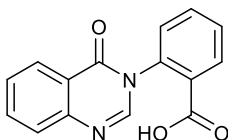
### 3. MATERIJAL I METODE

U svrhu istraživanja korištena je fitopatogena bakterija *Pseudomonas syringae* DSM 50256. Čista kultura ispitivane bakterije umnožena je tijekom 48 sati na temperaturi od 27 °C na hranjivom agaru (Liofilchem, Italija). Derivati kinazolinona su sintetizirani na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek (Komar i sur., 2019.). Ispitani su: 3-(4-bromfenil)kinazolin-4(3*H*)-on (K1), 2-(4-oksokinazolin-3(4*H*)-il)benzojeva kiselina (K2), 3-(2,5-dimetoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-on (K3), 3-fenilkinazolin-4(3*H*)-on (K4), 3-(4-metoksifenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K5), 2-(7-hidroksi-2-oksokroman-4-il)-*N*-(2-metil-4-oksokinazolin-3(4*H*)-il)acetamid (K6), 3-(4-klorofenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K7), 3-(4-bromfenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K8). U nastavku se nalazi prikaz struktura navedenih derivata kinazolinona (Slika 3 do 10).



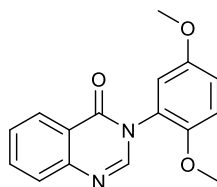
Slika 3. Struktura 3-(4-bromfenil)kinazolin-4(3*H*)-on (K1)

IZVOR: Komar i sur., 2019.



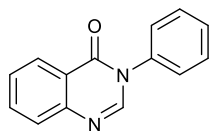
Slika 4. Struktura 2-(4-oksokinazolin-3(4*H*)-il)benzojeva kiselina (K2)

IZVOR: Komar i sur., 2019.



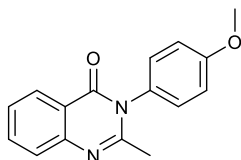
Slika 5. Struktura 3-(2,5-dimetoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-on (K3)

IZVOR: Komar i sur., 2019.



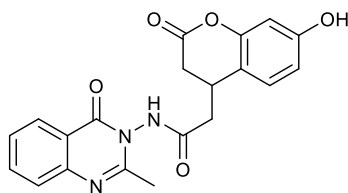
Slika 6. Struktura 3-fenilkinazolin-4(3*H*)-on (K4)

Izvor: Komar i sur., 2019.



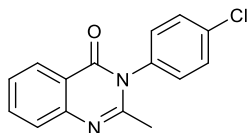
Slika 7. Struktura 3-(4-metoksifenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K5)

Izvor: Komar i sur., 2019.



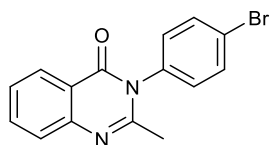
Slika 8. Struktura 2-(7-hidroksi-2-oksokroman-4-il)-*N*-(2-metil-4-oksokinazolin-3(4*H*)-il)acetamid (K6)

Izvor: Komar i sur., 2019.



Slika 9. Struktura 3-(4-klorofenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K7)

Izvor: Komar i sur., 2019.



Slika 10. Struktura 3-(4-bromfenil)-2-metilkinazolin-4(3H)-on (K8)

Izvor: Komar i sur., 2019.

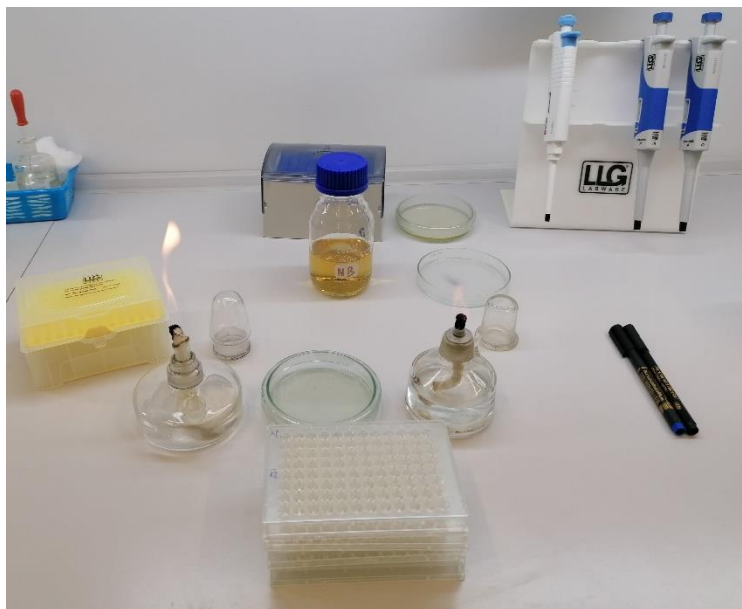
Učinkovitost derivata kinazolinona utvrđena je dilucijskom metodom određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije na ispitanu testnu bakteriju. Istraživanje je provedeno kroz sterilne mikrotitarske ploče (Slika 11.).



Slika 11. Postavljanje pokusa

Izvor: Autor

Najveća ispitana koncentracija iznosila je  $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Razrijeđena je kroz jažice do  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Svaka jažica inokulirana je s testnom bakterijom u koncentraciji koja odgovara  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ . Rezultati su očitani nakon 48 sati inkubacije. Pokus je postavljen u četiri ponavljanja, a svi postupci i materijali provedeni su poštujući pravila sterilnosti (Slika 12.).



Slika 12. Poštivanje pravila sterilnosti

Izvor: Autor

## 4. REZULTATI

Tablica 1. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K1) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 2. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K2) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 3. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K3) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 4. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K4) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 5. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K5) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 6. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K6) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast



Tablica 7. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K7) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 8. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K8) na testnu bakteriju *P. syringae*

| Koncentracija<br>[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] | 512 | 256 | 128 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | Kontrola |   |
|--|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|----------|---|
|  |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | +        | - |
| Porast                                     | +   | +   | +   | +  | +  | +  | + | + | + | + | +        | - |

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

U istraživanju nije dokazana inhibicija rasta testne bakterije *P. syringae* djelovanjem derivata kinazolinona (Tablica 1. do 8.).

## 5. RASPRAVA

Brojni istraživači su ispitivali potencijal antibakterijskog i antifungalnog djelovanja derivata kinazolinona u zaštiti bilja.

Brojni fitopatogeni su stvorili probleme u globalnoj trgovini hranom i gospodarskim usjevima (Liu i sur., 2021.). Kinazolinoni čine najpovlašteniju klasu biološki aktivnih heterocikličkih spojeva (Radwan i Alanazi, 2020.). Zbog svog širokog spektra bioloških aktivnosti, kinazolioni, prirodnog ili sintetskog podrijetla, potiču kemičare na razvoj visoko selektivnih spojeva sa snažnim farmakološkim djelovanjem (Radwan i Alanazi, 2020.).

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali inhibicijsko djelovanje ispitivanih derivata kinazolinona u koncentracijama od 1 do 512  $\mu\text{g mL}^{-1}$  na rast fitopatogene bakterije *P. syringae*.

Bakterije *X. axonopodis* pv. *citri*, *P. syringae* pv. *actinidiae*, *X. oryzae* pv. *oryzae* te virus mozaika duhana su zbog dugotrajne i široke primjene, postali otporni na sredstva za zaštitu, kao što su bismertiazol, tiadiazol-bakar, ningnanmicin, a njihova niska stopa razgradnje predstavlja opterećenje za okoliš (Liu i sur., 2021., cit. Tang i sur., 2013.). Zbog toga je nastala potreba za učinkovitim antibakterijskim i antivirusnim sredstvima s niskom toksičnošću i ekološki prihvatljivim (Liu i sur., 2021.). Liu i sur. (2021.) su dizajnirali i sintetizirali niz derivata miricetina koji sadrže kinazolinonski dio. Rezultati su pokazali uspješno antibakterijsko i antivirusno djelovanje protiv navedenih patogena. Došlo je do inhibicije rasta stanica te utjecaja na njihovu morfologiju. Pri koncentraciji 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , na površini stanice su nastala oštećenja, a pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  stanica je bila uništena (Liu i sur., 2021.).

Yan i sur. (2016.) sintetizirali su derivate kinazolinona koji su sadržavali 1,2,4-triazoliltioeterski dio te pokusom *in vitro* su dokazali antimikrobnu aktivnost protiv fitopatogenih bakterija *X. axonopodis* pv. *citri* i *X. oryzae* pv. *oryzae* s vrijednostima  $EC_{50}$  47,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  odnosno 22,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Rezultati derivata kinazolinona su bili bolji u odnosu na komercijalni baktericid, Bismertiazol (Yan i sur., 2016.).

Na temelju farmakofornog hibridnog pristupa, sintetizirani su derivati kinazolina koji imaju 1,2,4-triazolni tioeterski dio (Karan i sur., 2021., cit. Fan i sur., 2019.). Fan i sur. (2019.) su ispitivali *in vitro* njihova antibakterijska i antifungalna djelovanja (Karan i sur., 2021.).

Sintetizirani spojevi su pokazali snažan inhibicijski učinak protiv Gram-negativnih bakterija, kao što su *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *R. solanacearum*. Sintetizirani spojevi etil 2-(5-amino1-(kinazolin-4-il)-1*H*-1,2,4-triazol-3-iltio)acetat i njihovi derivati, pokazali su istaknutu inhibicijsku aktivnost protiv fitopatogenih bakterija. Ovi spojevi su pokazali vrijednost EC<sub>50</sub> od 46,9, 47,8 i 43,2 µg mL<sup>-1</sup>, dok su prema bakteriji *X. axonopodis* pv. *citri* bili učinkovitiji nego tržišno agrobaktericidno sredstvo Bismethiazol (56,9 µg mL<sup>-1</sup>) (Karan i sur., 2021., cit. Fan i sur., 2019.).

Ispitana je inhibicijska učinkovitost 2-supstituiranih-(3-piridil)-kinazolinona prema bakterijama *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *citri* i *R. solanacearum* *in vitro* korištenjem turbidimetrijske metode (Zhang i sur., 2018.). Ispitano je trinaest spojeva, a rezultati su pokazali veću antibakterijsku aktivnost prema *X. axonopodis* pv. *citri* i *R. solanacearum*, nego *X. oryzae* pv. *oryzae* (Zhang i sur., 2018.). U inhibiciji rasta *X. axonopodis* pv. *citri* dobrim su se pokazali spojevi 6-kloro-3,8-dimetil-2-(2-(4-metilpiperazin-1-il)piridin-3-il)kinazolin-4(3*H*)-on i 2-(2-(butilamino)piridin-3-il)-6-kloro-3,8-dimetilkinazolin-4(3*H*)-on pri koncentraciji od 200 µg mL<sup>-1</sup> sa stopom inhibicije od 74,1 % i 73,5 % što je usporedivo s kontrolnim sredstvom Bismethiazolom koji je pokazao stopu inhibicije 72,0 % (Zhang i sur., 2018.). Protiv iste bakterije, najboljim su se pokazali spojevi 2-(2-((2-aminoetil)amino)piridin-3-il)-6-kloro-3,8-dimetilkinazolin-4(3*H*)-on i 2-(2-(benzilamino)piridin-3-il)-6-kloro-3,8-dimetilkinazolin-4(3*H*)-on (Zhang i sur., 2018.). Pri koncentraciji od 200 µg mL<sup>-1</sup> su pokazali stopu inhibicije od 94,0 % i 90,0 %, a znatno veću inhibiciju (75,4 % i 68,9 %) od Bismethiazola (52,1 %) pri koncentraciji od 100 µg mL<sup>-1</sup> (Zhang i sur., 2018.). Protiv *R. solanacearum* najboljim su se pokazali spojevi 2-(2-(benzilamino)piridin-3-il)-6-kloro-3,8-dimetilkinazolin-4(3*H*)-on i 6-kloro-2-(2-(cikloheksilamino)piridin-3-il)-3,8-dimetilkinazolin-4(3*H*)-on pri koncentraciji od 200 µg mL<sup>-1</sup> sa stopom inhibicije rasta od 86,5 % i 79,7 %, što je bolje od kontrole Bismethiazola čija je inhibicija iznosila 72,1 % (Zhang i sur., 2018.).

Lv i sur. (2018.) su proveli sintezu i *in vitro* istraživanje turbidimetrijskom metodom antimikrobnog djelovanja derivata kinazolin-4(3*H*)-ona koji sadrže 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazolni dio u suzbijanju bakterija *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. axonopodis* pv. *citri* i *R. solanacearum*. Za kontrolu tretmana korišteni su komercijalni baktericidni pripravci Bismethiazol i Thiodiazol bakar (Lv i sur., 2018.). Spojevi 3-((6-(2,4-diklorofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on, 3-((6-(2-nitrofenil)-[1,2,4] triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on, 3-((6-(3-nitrofenil)-

[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on i 3-((6-(2-aminofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on su pokazali inhibicijsku stopu rasta preko 90 % pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema *X. oryzae* pv. *oryzae* što je značajno uspješnije od kontrole Bismertiazola (52,8 %) (Lv i sur., 2018.). Inhibitorno djelovanje (89,2 % i 99,4 %) prema *X. axonopodis* pv. *citri* su pokazali spojevi 3-((6-fenil-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il) metil) kinazolin-4(3*H*)-on i 3-((6-(2-fluorofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil) kinazolin-4(3*H*)-on pri koncentraciji od 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , dok je inhibicija kontrole iznosila 68,5 % (Lv i sur., 2018.). Dilucijskom metodom je utvrđen  $\text{EC}_{50}$  spojeva 3-((6-(2,4-diklorofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on, 3-((6-(2-nitrofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on, 3-((6-(3-nitrofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on i 3-((6-(2-aminofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on koji iznosi 28,2, 34,8, 41,5 i 42,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema *X. oryzae* pv. *oryzae*, dok je  $\text{EC}_{50}$  spojeva 3-((6-fenil-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on i 3-((6-(2-fluorofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on iznosio 29,5 i 20,7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  prema *X. axonopodis* pv. *citri*, dok je kontrola Bismertiazolom iznosila 53,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Lv i sur., 2018.).

Khodarahmi i sur. (2012.) sintetizirali su derivate kinazolinona te su ispitivali njihovu učinkovitost u suzbijanju bakterija *S. aureus* PTCC 1337, *B. subtilis* PTCC 1023, *Listeria monocytogenes* PTCC 1165, *E. coli* PTCC 1338, *P. aeruginosa* PTCC 1074, *Salmonella enteritidis* PTCC 1091 te gljiva *C. albicans* PTCC 5027, *Aspergillus niger* PTCC 5021 i *A. flavus* PTCC 5003. Spojevi 1,2,3,4-tetrahidropiridazino[6,1b]kinazolin-10-on, 2,3-dihidropirol[2,1-b]-kinazolin-9(1*H*)-on (deoksivasicinon) i 3-dihidropirazolo[5,1-b]kinazolin-9(1*H*)-on su pokazali najveću aktivnost protiv *B. subtilis* pri koncentracijama 32 i 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Khodarahmi i sur., 2012.). Spojevi 2-(4-kloro-butanamido)-benzojeva kiselina i 2-(3-kloropropanamido)benzojeva kiselina, sa slobodnom karboksilnom kiselinom i atomom klora na kraju bočnog lanca, su pokazali dobru aktivnost protiv *P. aeruginosa* pri koncentraciji od 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Khodarahmi i sur., 2012.). Svi spojevi su imali bolje bakteriostatično nego baktericidno djelovanje (Khodarahmi i sur., 2012.). Svi ispitani spojevi su imali dobru aktivnost protiv *C. albicans* i *A. niger*, no među njima se ističu spojevi 1,2,3,4-tetrahidropiridazino[6,1b]kinazolin-10-on i 3-amino-2-(3-etoksi-etil)kinazolin-4(3*H*)-on koji su imali bolje djelovanje pri koncentraciji od 32 i 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Khodarahmi i

sur., 2012.). Također, svi ispitani spojevi su pokazali bolje fungistatično nego fungicidno djelovanje (Khodarahmi i sur., 2012.).

Nangare i sur. (2021.) su zbog biološke aktivnosti sintetizirali derivat 4-(substituiranog anilina)kinazolin. Sintetizirani spoj *N*-4-(4-bromo-2-nitrofenilamino)kinazolin-6-il)acetamid je pokazao snažno antifungalno djelovanje protiv *Fusarium moniliforme* u usporedbi sa standardnim fungicidom grizeofulvinom (Karan i sur., 2021., cit. Nangare i sur., 2021.).

Du i sur. (2021.) istraživali su fungicidno djelovanje petnaest derivata kinazolin-4(3*H*)-ona koji sadrže 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirimidin. Dizajnirani su, sintetizirani i ocijenjeni kao antimikrobna sredstva u poljoprivredi (Du i sur., 2021.). Navedeni spojevi su ispitivani protiv fitopatogenih gljiva *Gibberella zea*, *Verticillium dahliae* i *Sclerotinia sclerotiorum* prateći njihov micelarni porast. Spojevi su pokazali izrazitu antifungalnu aktivnost u koncentracijama 100 i 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Du i sur., 2021.). Spojevi 3-(2-((7-((2,4-difluorofenil)amino)-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-il)tio)etil)kinazolin-4(3*H*)-on i 3-(2-((7-((2,5-dimetoksifenil)amino)-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-il)tio)etil)kinazolin-4(3*H*)-on su pokazali stopu inhibicije od 34,0 % i 23,4 % protiv *V. dahliae* (Du i sur., 2021.). Molekularna struktura spoja 3-(2-((7-((4-fluorofenil)amino)-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-il)tio)etil)kinazolin-4(3*H*)-on je jasno potvrđena analizom difrakcije rendgenskih zraka na kristalu (Du i sur., 2021.). Spojevi 3-(2-((7-((2,4-difluorofenil)amino)-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-il)tio)etil)kinazolin-4(3*H*)-on i 3-(2-((7-((2,5-dimetoksifenil)amino)-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pirimidin-2-il)tio)etil)kinazolin-4(3*H*)-on su pokazali *in vitro* metodom, bolju antibakterijsku aktivnost protiv *X. oryzae* od kontrolnog sredstva bismertiazola (Du i sur., 2021.). Ovim istraživanjem je dokazan potencijal kinazolin-4-ona koji sadrže 1,2,4-triazolo[1,5-*a*]pirimidin kao obećavajuće spojeve za razvoj učinkovitih sredstava u zaštiti bilja (Du i sur., 2021.).

Lv i sur. (2018.) su istraživali potencijalni antifungalni učinak niza derivata kinazolin-4(3*H*)-ona koji sadrže 1,2,4-triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazolni dio. Ispitivanje je provedeno na šest fitopatogenih gljiva: *Botrytis cinerea* Pers., *Phytophthora infestans*, *V. dahliae*, *Cytospora mandshurica*, *G. zea* i *Gloeosporium fructigenum* metodom mjerenja micelnog rasta (Lv i sur., 2018.). Od sintetiziranih 25 derivata, samo su spojevi 3-((6-(3-nitrofenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on, 3-((6-(3-(trifluorometil)fenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3*H*)-on,

3-((6-(4-(trifluorometil)fenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3H)-on, 3-((6-(2-hidroksifenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3H)-on i 3-((6-(3-hidroksifenil)-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]tiadiazol-3-il)metil)kinazolin-4(3H)-on pokazali fungicidno djelovanje sa >78 % pri koncentraciji od 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Lv i sur., 2018.).

Uz antibakterijsku i antifungalnu djelotvornost, ispitana je i insekticidna djelotvornost četrnaest spojeva kinazolinonil- $\beta$ -laktami/kinazolinoni i bis(kinazolinonil- $\beta$ -laktami) (Reddy i sur., 2010.). Ispitana je antifungalna učinkovitost protiv *Fusarium oxysporum* i *Macrophomina sorghina*, antibakterijsko djelovanje protiv Gram-negativne bakterije *E. coli* i Gram-pozitivne bakterije *S. aureus*, te insekticidno djelovanje prema štetniku *Achaea janata*. Kao i u ovom istraživanju, Reddy i sur. (2010.) nisu utvrdili antibakterijsko djelovanje ispitivanih spojeva. Spoj 2-klorometil-3-metil-4(3H)-kinazolinon je pokazao 83 % antifungalno djelovanje protiv obje gljive u koncentraciji 50  $\mu\text{g/disk}$ , a spoj 3'-acetamido-6'-kloro-3-metil-2,2'-bis-4(3H)-kinazolinon 70,25 % protiv gljive *M. sorghina* u koncentraciji od 25  $\mu\text{g/disk}$  (Reddy i sur., 2010.). Svi ispitani spojevi su pokazali umjereno do dobro djelovanje u sprječavanju hranjenja štetnika u koncentraciji 200 do 6,25  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , dok se snažnim sredstvom smatra spoj 3,3'-dimetil-4,4'-[N,N'-dikloroacetil-N,N'-bis((3-metil-4(3H)-kinazolinon-2-il)metil)]diaminobifenil sa 66,25 % učinkovitosti u koncentraciji 6,25  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (Reddy i sur., 2010.).

## 6. ZAKLJUČAK

Tijekom uzgoja, biljke su podložne djelovanju abiotskih i biotskih čimbenika koji nepovoljno utječu na njihov rast i razvoj. Kako bi ih zaštitili, poljoprivredni proizvođači koriste velike količine mineralnih gnojiva i sredstava za zaštitu bilja. U posljednje vrijeme, sve je više istraživanja vezano za utjecaj agrokemikalija na okoliš pri čemu je ustanovljen utjecaj na onečišćenje tla, zraka i vode. Potrebno je pronaći nova sredstva i aktivne tvari koje ne ostavljaju negativne posljedice za okoliš, a učinkovito suzbijaju patogene organizme. U medicini su vršena brojna istraživanja o utjecaju kinolina i kinazolinona. Dokazana su njihova brojna djelovanja, kao što je antibakterijsko, antifungalno, antiviralno, antikancerogeno, protuupalno, antimalarijsko, antiritmičko djelovanje. To je potaknulo istraživanja o potencijalnom djelovanju kinazolinona u suzbijanju fitopatogenih organizama. Provedena su uspješna istraživanja u kojima derivati kinazolinona uspješno sudjeluju u zaštiti bilja protiv brojnih bakterija i gljiva. U ovom istraživanju ispitani derivati kinazolinona nisu pokazali inhibitorno djelovanje na rast fitopatogene bakterije *P. syringae*. Potrebna su daljnja istraživanja novih učinkovitijih derivata kinazolinona koja bi uspješnije inhibirala rast uzročnika bakterijskih biljnih bolesti.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Asif, M. (2014): Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives. *International journal of medicinal chemistry*, 2014: 1-27.
2. Balaž, J., Aćimović, S. (2008): Bakterioze soje. *Biljni lekar*, 34(3), 226-235.
3. Bažok, R., Cvjetković, B., Ostojić, Z., Barić, K. (2020): Revolucija i evolucija kemijske metode zaštite bilja. *Glasilo biljne zaštite*, 20(3), 346-353.
4. Chen, Y., Li, P., Chen, M., He, J., Su, S., He, M., Wang, H., Xue, W. (2020): Synthesis and antibacterial activity of chalcone derivatives containing thioether triazole. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 57(3), 983-990.
5. Du, H., Ding, M., Luo, N., Shi, J., Huang, J., Bao, X. (2021): Design, synthesis, crystal structure and *in vitro* antimicrobial activity of novel 1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidine-containing quinazolinone derivatives. *Molecular Diversity*, 25(2), 711-722.
6. Fan, Z., Shi, J., Luo, N., Bao, X. (2019): Synthesis, crystal structure and antimicrobial activity of 2-((2-(4-(1*H*-1, 2, 4-triazol-1-yl) phenyl) quinazolin-4-yl) oxy)-*N*-phenylacetamide derivatives against phytopathogens. *Molecular diversity*, 23(3), 615-624.
7. Fanuko, N. (2005): *Ekologija: udžbenik za stručne studije vinarstva i mediteranske poljoprivrede*. Veleučilište u Rijeci, Rijeka-Poreč. 180.
8. Fondevilla, S., Martín-Sanz, A., Satovic, Z., Fernández-Romero, M. D., Rubiales, D., Caminero, C. (2012): Identification of quantitative trait loci involved in resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, 186(3), 805-812.
9. Ghorab, M. M., Abdel-Gawad, S. M., El-Gaby, M. S. A. (2000): Synthesis and evaluation of some new fluorinated hydroquinazoline derivatives as antifungal agents. *Il Farmaco*, 55(4), 249-255.
10. He, D., Wang, M., Zhao, S., Shu, Y., Zeng, H., Xiao, C., Lu, C., Liu, Y. (2017): Pharmaceutical prospects of naturally occurring quinazolinone and its derivatives. *Fitoterapia*, 119, 136-149.
11. Ivić, D. (2014): Agrotehničke, mehaničke i fizikalne mjere u zaštiti bilja od bolesti. *Glasilo biljne zaštite*, 14(5), 391-399.



12. Ivić, D. (2019): Bakterijske i virusne bolesti rajčice i paprike u Hrvatskoj. Glasnik Zaštite Bilja, 42(3), 36-42.
13. Jiang, S., Tang, X., Chen, M., He, J., Su, S., Liu, L., He, M., Xue, W. (2020): Design, synthesis and antibacterial activities against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* and *Ralstonia solanacearum* of novel myricetin derivatives containing sulfonamide moiety. Pest Management Science, 76(3), 853-860.
14. Karan, R., Agarwal, P., Sinha, M., Mahato, N. (2021): Recent Advances on Quinazoline Derivatives: A Potential Bioactive Scaffold in Medicinal Chemistry. ChemEngineering, 5(4), 73.
15. Khodarahmi, G., Jafari, E., Hakimelahi, G., Abedi, D., Khajouei, M. R., Hassanzadeh, F. (2012): Synthesis of some new quinazolinone derivatives and evaluation of their antimicrobial activities. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 11(3), 789.
16. Komar, M., Molnar, M., Konjarević, A. (2019): Screening of Natural Deep Eutectic Solvents for Green Synthesis of 2-methyl-3-substituted Quinazolinones and Microwave-Assisted Synthesis of 3-aryl Quinazolinones in Ethanol. Croatica Chemica Acta, 92(4), 511-518.
17. Kovačević, D., Lazić, B., Milić, V. (2011): Uticaj poljoprivrede na životnu sredinu. Međunarodi naučni skup agronoma „Jahorina“. 34-47.
18. Križanac, I., Plavec, J. (2016): Bakterioze rajčice. Glasilo biljne zaštite, 16(5), 516-520.
19. Kumar, A., Verma, H., Singh, V. K., Singh, P. P., Singh, S. K., Ansari, W. A., Yadav, A., Singh, P. K., Pandey, K. D. (2017): Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. Agriculturally important microbes for sustainable agriculture. 195-215.
20. Li, P., Shi, L., Gao, M. N., Yang, X., Xue, W., Jin, L. H., Hu, D. Y., Song, B. A. (2015): Antibacterial activities against rice bacterial leaf blight and tomato bacterial wilt of 2-mercapto-5-substituted-1, 3, 4-oxadiazole/thiadiazole derivatives. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 25(3), 481-484.
21. Liu, T., Peng, F., Cao, X., Liu, F., Wang, Q., Liu, L., Xue, W. (2021): Design, Synthesis, Antibacterial Activity, Antiviral Activity, and Mechanism of Myricetin Derivatives Containing a Quinazolinone Moiety. ACS omega, 6(45), 30826-30833.
22. Lv, X., Yang, L., Fan, Z., Bao, X. (2018): Synthesis and antimicrobial activities of novel quinazolin-4(3*H*)-one derivatives containing a 1, 2, 4-triazolo [3, 4-*b*][1, 3, 4] thiadiazole moiety. Journal of Saudi Chemical Society, 22(1), 101-109.

23. Mahato, A. K., Srivastava, B., Nithya, S. (2011): Chemistry, structure activity relationship and biological activity of quinazoline-4 (3*H*)-one derivatives. *Inventi Rapid Med Chem*, 2(1), 13-19.
24. Mešić, A., Juran, I., Pajač Živković, I. (2018): Važnost doze pesticida u dostizanju ciljeva moderne poljoprivrede, osobito zdravstvenu ispravnost hrane. *Glasilo biljne zaštite*, 18(5), 427-433.
25. Patel, N. B., Patel, J. C. (2011): Synthesis and antimicrobial activity of Schiff bases and 2-azetidionones derived from quinazolin-4 (3*H*)-one. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(4), 403-411.
26. Plavec, J. (2019): Bakterijske bolesti tikvenjača. *Glasilo biljne zaštite*, 19(3), 378-384.
27. Radwan, A. A., Alanazi, F. K. (2020): Biological activity of quinazolinones. U: *Quinazolinone and Quinazoline Derivatives*. Al-kaf, A. G. (ur.), Intechopen limited, London, 11-40.
28. Reddy, P. S. N., Mittapelli, V., Reddy, V. D. (2010): Antibacterial, antifungal and antifeedant activity of quinazolinonyl- $\beta$ -lactams/quinazolinones and bis (quinazolinonyl- $\beta$ -lactams). *Rasayan J. Chem*, 3, 635-640.
29. Shang, X. F., Morris-Natschke, S. L., Yang, G. Z., Liu, Y. Q., Guo, X., Xu, X. S., Goto, M., Li, J. C., Zhang, J. Y., Lee, K. H. (2018): Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part II. *Medicinal research reviews*, 38(5), 1614-1660.
30. Srpak, M., Zeman, S. (2018): Održiva ekološka poljoprivreda. *Zbornik radova Međimorskog veleučilišta u Čakovcu*, 9(2), 68-75.
31. Šeremešić, S., Vojnov, B., Manojlović, M., Milošev, D., Ugrenović, V., Filipović, V., Babec, B. (2017): Organska poljoprivreda u službi biodiverziteta i zdravlja. *Letopis naučnih radova*, 41(2), 51-60.
32. Šubić, M. (2016): Mogućnosti i ograničenja suzbijanja štetnih organizama u suvremenim nasadima trešanja prema integriranim načelima. *Glasilo biljne zaštite*, 16(4), 365-377.
33. Tang, R., Jin, L., Mou, C., Yin, J., Bai, S., Hu, D., Wu, J., Yang, S., Song, B. (2013): Synthesis, antifungal and antibacterial activity for novel amide derivatives containing a triazole moiety. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-7.
34. Thind, B. S. (2019): *Phytopathogenic bacteria and plant diseases*. CRC Press, Boca Raton, 398.

35. Trkulja, V., Brkljač, G., Zavišić, N., Misimović, M., Vukojević, D., Mihić, J., Koščica, M. (2009): Etiološka proučavanja pojave nekroze cvjetova i mladica kruške u sjeverozapadnom dijelu Bosne i Hercegovine. *Glasnik Zaštite Bilja*, 32(3), 86-93.
36. Xin, X. F., He, S. Y. (2013): *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual review of phytopathology*, 51, 473-498.
37. Xu, W. M., Han, F. F., He, M., Hu, D. Y., He, J., Yang, S., Song, B. A. (2012): Inhibition of tobacco bacterial wilt with sulfone derivatives containing an 1, 3, 4-oxadiazole moiety. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(4), 1036-1041.
38. Yan, B. R., Lv, X. Y., Du, H., Gao, M. N., Huang, J., Bao, X. P. (2016): Synthesis and biological activities of novel quinazolinone derivatives containing a 1, 2, 4-triazolylthioether moiety. *Chemical Papers*, 70(7), 983-993.
39. Young, J. M. (1991): Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of applied biology*, 118(2), 283-298.
40. Zhang, L., Chen, Q., Li, X. Q., Wu, S. Q., Wan, J. L., Ouyang, G. P. (2018): Synthesis and Antibacterial Activity of 2-substitued-(3-pyridyl)-quinazolinone Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 55(3), 743-749.

## 8. SAŽETAK

Fitopatogene bakterije uzrokuju velike štete u poljoprivrednoj proizvodnji. Rezistentnost uzročnika bolesti na zaštitna sredstva te toksičan učinak istih, ukazuje na potrebu za novim učinkovitijim sredstvima bez utjecaja na okoliš. Derivati kinazolinona imaju niz bioloških aktivnih djelovanja poput antibakterijskog, antiviralnog, antifungalnog kao i drugih farmakoloških djelovanja. Cilj istraživanja je bio utvrditi djelotvornost osam derivata kinazolinona na rast fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae*. Rezultati istraživanja nisu pokazali inhibitorno djelovanje ispitanih derivata u *in vitro* uvjetima. Potrebna su daljnja istraživanja u pronalasku učinkovitijih derivata kinazolinona antibakterijskog djelovanja kao potencijalnih novih sredstava za zaštitu bilja.

Ključne riječi: biopesticidi, antibakterijska djelotvornost, biološka aktivnost, zaštita okoliša

## 9. SUMMARY

Phytopathogenic bacteria cause great damage in agricultural production. Resistance of pathogens to protective agents and their toxic effect indicates the need for new and more effective means without affecting the environment. Quinazolinone derivatives have a number of biologically active effects such as antibacterial, antiviral, antifungal and other pharmacological effects. The aim of the study was to determine the efficacy of eight quinazolinone derivatives on the growth of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae*. The results of the study did not show the inhibitory effect of the tested derivatives *in vitro*. Further research is needed to find more effective quinazolinone derivatives with antibacterial activity as potential new plant protection products.

Key words: biopesticides, antibacterial efficacy, biological activity, environmental protection

## 10. POPIS SLIKA

Slika 1. Mikroskopski prikaz bakterije *P. syringae*, str. 7.

Slika 2. Simptomi napada *P. syringae* pv. *syringae* na granama kruške, str. 9.

Slika 3. Struktura 3-(4-bromfenil)kinazolin-4(3*H*)-on (K1), str. 15.

Slika 4. Struktura 2-(4-oksokinazolin-3(4*H*)-il)benzojeva kiselina (K2), str. 15.

Slika 5. Struktura 3-(2,5-dimetoksifenil)kinazolin-4(3*H*)-on (K3), str. 15.

Slika 6. Struktura 3-fenilkinazolin-4(3*H*)-on (K4), str. 16.

Slika 7. Struktura 3-(4-metoksifenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K5), str. 16.

Slika 8. Struktura 2-(7-hidroksi-2-oksokroman-4-il)-*N*-(2-metil-4-oksokinazolin-3(4*H*)-il)acetamid (K6), str. 16.

Slika 9. Struktura 3-(4-klorofenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K7), str. 16.

Slika 10. Struktura 3-(4-bromfenil)-2-metilkinazolin-4(3*H*)-on (K8), str. 17.

Slika 11. Postavljanje pokusa, str. 17.

Slika 12. Poštivanje pravila sterilnosti, str. 18.

## 11. POPIS TABLICA

Tablica 1. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K1) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 19.

Tablica 2. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K2) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 19.

Tablica 3. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K3) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 19.

Tablica 4. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K4) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 20.

Tablica 5. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K5) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 20.

Tablica 6. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K6) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 20.

Tablica 7. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K7) na testnu bakteriju *P. syringae*, str. 21.

Tablica 8. Rezultati istraživanja učinkovitosti djelovanja derivata kinazolinona (K8) na testnu bakteriju *P. syringae*, str., 21.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Inhibicija rasta fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae* djelovanjem kinazolinona

Marija Martić

**Sažetak** Fitopatogene bakterije uzrokuju velike štete u poljoprivrednoj proizvodnji. Rezistentnost uzročnika bolesti na zaštitna sredstva te toksičan učinak istih, ukazuje na potrebu za novim učinkovitijim sredstvima bez utjecaja na okoliš. Derivati kinazolinona imaju niz bioloških aktivnih djelovanja poput antibakterijskog, antiviralnog, antifungalnog kao i drugih farmakoloških djelovanja. Cilj istraživanja je bio utvrditi djelotvornost osam derivata kinazolinona na rast fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae*. Rezultati istraživanja nisu pokazali inhibitorno djelovanje ispitanih derivata u *in vitro* uvjetima. Potrebna su daljnja istraživanja u pronalasku učinkovitijih derivata kinazolinona antibakterijskog djelovanja kao potencijalnih novih sredstava za zaštitu bilja.

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić

**Broj stranica:** 31

**Broj grafikona i slika:** 12

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 40

**Broj priloga:** 0

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** biopesticidi, antibakterijska djelotvornost, biološka aktivnost, zaštita okoliša

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Vesna Rastija, predsjednik
2. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. doc. dr. sc. Dejan Agić, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayer u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1.



## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**

**Graduate thesis**

**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**

**University Graduate Studies, Organic agriculture**

Inhibition of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* growth by quinazolinone action

Marija Martić

**Abstract** Phytopathogenic bacteria cause great damage in agricultural production. Resistance of pathogens to protective agents and their toxic effect indicates the need for new and more effective means without affecting the environment. Quinazolinone derivatives have a number of biologically active effects such as antibacterial, antiviral, antifungal and other pharmacological effects. The aim of the study was to determine the efficacy of eight quinazolinone derivatives on the growth of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae*. The results of the study did not show the inhibitory effect of the tested derivatives *in vitro*. Further research is needed to find more effective quinazolinone derivatives with antibacterial activity as potential new plant protection products.

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić

**Number of pages:** 31

**Number of figures:** 12

**Number of tables:** 8

**Number of references:** 40

**Number of appendices:** 0

**Original in:** Croatian

**Key words:** biopesticides, antibacterial efficacy, biological activity, environmental protection

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. prof. dr. sc. Vesna Rastija, president of the Commission
2. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. asst. prof. dr. sc. Dejan Agić, member of the Commission

**Thesis deposit at:** Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Vladimira Preloga 1.