

Usporedba volatilnog i kontaktnog djelovanja eteričnih ulja na porast gljive *Fusarium culmorum*

Švitek, Mia

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:151:136376>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



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
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Mia Švitek

Diplomski studij Povrčarstvo i cvjećarstvo

**USPOREDBA VOLATILNOG I KONTAKTNOG DJELOVANJA ETERIČNIH
ULJA NA PORAST GLJIVE FUSARIUM CULMORUM**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Mia Švitek

Diplomski studij Povrčarstvo i cvjećarstvo

**USPOREDBA VOLATILNOG I KONTAKTNOG DJELOVANJA ETERIČNIH
ULJA NA PORAST GLJIVE FUSARIUM CULMORUM**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2022.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji koja mi je pružila potrebnu podršku tijekom mog cjeloživotnog i fakultetskog obrazovanja, prijateljima i kolegama koji su cijelo iskustvo učili ljepšim i lakšim. Također, hvala mentorici prof. dr. sc. Čosić na ukazanoj prilici, savjetima i vodstvu tijekom pisanja rada.

SADRŽAJ

| | | |
|------|--|----|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 2. | PREGLED LITERATURE..... | 3 |
| 3. | MATERIJAL I METODE..... | 9 |
| 3.1. | Pripreme za provođenje pokusa..... | 9 |
| 3.2. | Postavljanje pokusa..... | 11 |
| 4. | REZULTATI..... | 14 |
| 4.1. | Inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na gljivu <i>F. culmorum</i> nakon 48 sati..... | 14 |
| 4.2. | Inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na gljivu <i>F. culmorum</i> nakon 120 sati..... | 17 |
| 4.3. | Inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na gljivu <i>F. culmorum</i> nakon 168 sati..... | 20 |
| 5. | RASPRAVA..... | 24 |
| 6. | ZAKLJUČAK..... | 26 |
| 7. | POPIS LITERATURE..... | 27 |
| 8. | SAŽETAK..... | 31 |
| 9. | SUMMARY..... | 32 |
| 10. | POPIS TABLICA..... | 33 |
| 11. | POPIS SLIKA..... | 34 |
| | TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA..... | |
| | BASIC DOCUMENTATION CARD..... | |

1. UVOD

Nekoliko vrsta roda *Fusarium* poznati su kao uzročnici težih oblika biljnih bolesti odgovornih za značajne ekonomske gubitke usjeva širom svijeta svake godine. Uzročnici su gljivičnih infekcija koje rezultiraju pojavom truleži korijena, korijenovog vrata, stabljike u razini tla, lisne pjegavosti, truleži gomolja, lukovica, klipova i klasova te venuća. Simptomi koji se pojavljuju na domaćinu ovisit će o samome domaćinu, atmosferskim uvjetima, razvojnom stadiju kulture te agresivnosti i patogenosti izolata. *Fusarium* vrste također uzrokuju traheofuzarioze (traheomikoze), biljne bolesti tijekom kojih patogen prodire kroz korijenov sustav te pronalazi stanište u provodnom tkivu. Nakon pronalaska staništa inficira biljku što rezultira prekidom dotoka vode, progresivno uzrokujući venuće biljnih dijelova iza mjesta začepjenja provodnih snopova različitih biljnih kultura. *Fusarium culmorum* uzrokuje palež klasova, trulež korijena i palež klijanaca Najčešće stradavaju kukuruz, pšenica, ječam i sirak iako se zaraza pojavljuje na velikom broju domaćina zbog polifagnosti patogena (Brown i Proctor, 2013.).

Biološke mjere važan su segment u borbi protiv biljnih patogena, što čini eterična ulja kao sekundarne metabolite s mogućnošću antifungalnog, antibakterijskog, antivirusnog te insekticidnog djelovanja idealne za korištenje u suzbijanju istih. U svrhu manjeg unosa štetnih tvari u okoliš te očuvanja ljudskog zdravlja potrebna su daljnja istraživanja bioloških metoda suzbijanja biljnih patogena kako bi u potpunosti zamijenila sintetičke fungicide. Pri sprječavanju infekcija te pojave bolesti u sustavu ekološke proizvodnje važnu ulogu potencijalno bi, u zamjeni sintetičkih fungicida, mogla imati eterična ulja koja sadrže biološki aktivne spojeve. Palfi i sur. (2019.) u istraživanju navode da eterična ulja imaju veći broj sastojaka među kojima u količini odudaraju dva ili tri glavna sastojka dok se ostali nalaze u tragovima. Postoji mogućnost da su sastojci koji se nalaze u tragovima (15% spojeva eteričnog ulja) zaslužni za antimikrobna svojstva eteričnih ulja. Učinkovitost borbe protiv biljnih patogena ovisi o raznim čimbenicima kao što su temperatura, količina vlage, vrijeme primjene, način aplikacije, vrsta eteričnog ulja te koncentraciji istog (Palfi i sur., 2019.).

Trenutno je nepoznat točan broj biofungicida u svijetu. Miličević (2020.) navodi kako je prema podacima u Sjedinjenim Američkim državama poznato oko 30 biofungicida. Tematika biofungicida slabo je poznata zbog nedostatka znanstvenih i stručnih radova o njihovoj primjeni (Miličević, 2020.). Eterična ulja mogu se koristiti u svrhu biološke borbe

protiv štetnika, na način da zamjene kemijskih insekticida, zbog njihove ekološke prihvatljivosti i mogućnosti biološke razgradnje (Zygodlo i Grosso, 1995.). Primjena eteričnih ulja uzrokuje značajne morfološke degradacije hifa gljiva poput citoplazmatske koagulacije te curenja protoplasta (Soylu i sur., 2010.) Eterična ulja narušavaju funkciju stanične membrane gljiva i uništavaju njezinu strukturu što dovodi do odumiranja gljive. Onemogućuju izgradnju membrane, rast micelija i klijanje spora (Harris, 2002.). Lee i sur. (2007.) navode da tretiranje fitopatogenih gljiva eteričnim uljima inhibira porast micelija.

Cilj ovog rada je utvrditi razlike u antifungalnom djelovanju eteričnih ulja na gljivu *Fusarium culmorum* pri volatilnom i kontaktnom djelovanju.

2. PREGLED LITERATURE

Fusarium culmorum i *Fusarium graminearum* proizvode mikotoksine, spojeve male molekularne mase koje u većem broju žitarica uzrokuju smanjenju kvalitetu zrna. Radi se dominantno o mikotoksina zearalenon (ZEA) i deoksinivalenol (DON) i njihovim derivatima (Perczak i sur., 2019.). Jedan od važnijih izvora zaraze *Fusarium* vrstama su inficirana zrna pšenice koja su izbačena iz klasa prilikom žetve te ostavljena u tlu (Ćosić, 2001.). Neki izolati gljive *Fusarium verticillioides* proizvode mikotoksine u velikim količinama te toksin fumonizin. Fumonizini imaju izrazito toksično djelovanje kod ljudi i životinja uzrokujući niz bolesti, također fitotoksični su, ali njihova točna funkcija u uzrokovanju biljnih bolesti nije jasno definirana.

Fusarium sp., *Fusarium proliferatum* i *Fusarium verticillioides* smatraju se glavnim patogenima tropskih i suptropskih područja. Karakterizira ih visoka varijabilnost morfoloških, fizioloških i genetskih svojstava. Razlike se također javljaju u intenzitetu patogenosti gljive i odabiru domaćina na kojem će vršiti zarazu (Kumar i sur., 2016.). Biljka zahvaćena infekcijom gubi klorofil te postaje slamnatog ili ružičasto crvenog izgleda zbog prekomjernog rasta micelija (Kumar i sur., 2016.). Nosrati i sur. (2011.) navode da *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* izaziva venuće biljaka koje je posljedica začepljenja provodnih snopova.

Jedan od razornih uzročnika gljivičnih bolesti rajčice je *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Prenosi se putem tla i uzrokuje venuće provodnih snopova te uzrokuje velike ekonomske probleme diljem svijeta (Sanap i sur., 2020.).

Fusarium graminearum najvažniji je uzročnik paleži klasa pšenice u našoj zemlji. Tvari betain i kolin koje proizvode prašnici stimuliraju bujan razvoja micelija ove gljive (Ćosić i sur., 2013.).

Osim kod biljaka *Fusarium* ssp. mogu biti štetne u podložnih ljudi i životinja. Leslie i Summerell (2006.) utvrdili su da fitopatogena gljiva *Fusarium verticillioides* kod osoba oslabljenog imuniteta uslijed raka i HIV-a može uzrokovati alergijske reakcije i infekcije. Također, uzrokuje kožne lezije te infekcije već postojećih rana.

Primjerna sintetičkih fungicida trenutno je najučinkovitija mjera borbe protiv biljnih bolesti. Posljedica primjene istih ima štetan utjecaj na zdravlje i okoliš, a prekomjerna upotreba sintetičkih fungicida dovodi do rezistentnosti patogena. Biološki spojevi koji se nalaze u

biljkama mogli bi biti prikladno rješenje za razvoj biofungicida jer nemaju štetne utjecaje na ljude i okoliš (Palfi i sur., 2019.).

Ako proizvodi biljke mogu smanjiti populaciju biljnih patogena i kontrolirati razvoj bolesti trebaju postati ekološki prihvatljiva alternativa u borbi protiv biljnih bolesti (Bowers i Locke, 2000.). Eterična ulja kao sekundarni biljni metaboliti antimikrobnih svojstva imaju značajnu ulogu u produljenju roka trajanja hrane te smanjenju gubitaka uzrokovanih skladištenjem poljoprivrednih proizvoda. Ona sadrže monotrepene i seskvitrepane te njihove oksigenirane derivate poput alkohola, ketona, kiselina, fenola i ostalih (Palfi i sur., 2019.).

Biološka aktivnost eteričnih ulja ovisi o vrsti i staništu biljke, kemijskom sastavu, koncentraciji korištenih ulja, načinu aplikacije ulja te okolišnim uvjetima. Antifungalno djelovanje u *in vitro* uvjetima ovisi o uzročniku biljne bolesti te ono može biti iskazano jačim ili slabijim postotkom. Mnoga eterična ulja pokazuju negativan utjecaj na rast micelija fitopatogenih gljiva, dok znanstveno dokazano neka ulja imaju stimulativno djelovanje na porast micelija pojedinih fitopatogenih gljiva (Ćosić i sur., 2014.). Jedna od važnih karakteristika eteričnih ulja je njihova sposobnost usporavanja biosinteze ergosterola, specifičnog sterola gljiva (Ćosić i sur., 2010.).

Eterična ulja uobičajeno su tekućeg agregatnog stanja na sobnoj temperaturi, ali mogu se pojaviti u smolastom i čvrstom stanju. Boja ulja varira od bijelo žute do smeđe. Topiva su u mastima i organskim otapalima (Raveau i sur., 2020.).

U istraživanju Kalemba i Kunich (2003.) razmatraju antimikrobno djelovanje eteričnog ulja u *in vitro* uvjetima te mehanizme djelovanja eteričnih ulja na mikroorganizme. Navode da su eterična ulja timijana, origana, mente, salvije, cimeta i klinčića ulja s najvećim intenzitetom antimikrobnog djelovanja.

Eterično ulje anisa koje sadrži kemijski spoj anetol prema istraživanju Huang i sur. (2010.) ima antifungalno djelovanje na rast micelija gljiva *Fusarium graminearum* i *Fusarium oxysporum*.

Palfi i sur. (2019.) testirali su eterična ulja čajevca, anisa, limuna, metvice, komorača, bosiljka, eukaliptusa, ružmarina, lavande, timijana, klinčića i kadulje protiv fitopatogenih gljiva *Fusarium oxysporum* i *Bortytis cinerea*. Najučinkovitijim se pokazalo ulje timijana koje je potpuno inhibiralo porast micelija, nakon čega slijede ulje klinčića, komorača,

metvice i anisa dok eterična ulja ružmarina, limuna i eukaliptusa nisu potpuno inhibirali rast micelija niti pri najvećem korištenom volumenu eteričnog ulja.

U radu Soyulu i sur. (2007.) istraživana je antifungalni učinak eteričnih ulja komorača i origana na gljivu *Sclerotinia sclerotiorum* pri čemu je eterično ulje komorača pokazalo je jači antifungalni učinak.

Pérez-Sánchez i sur. (2007.) ispitivali su djelovanje eteričnog ulja timijana na pet fitopatogenih gljiva *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. eterično ulje timijana inhibiralo je razvoj micelija svih ispitivanih gljiva. Također, ulja timijana te cimeta i anisa pokazuju najbolji antifungalni učinak na gljivu *Botrytis cinerea*, dok ulje naranče ima najslabije antifungalno djelovanje (Tanović i sur., 2005.).

Eterično ulje limuna pokazalo je dobro antifungalno djelovanje na pet fitopatogenih gljiva *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, *Pyricularia grisea* i *Rhizoctonia solani* (Sharma i Tripathi, 2006.).

Antifungalni učinak eteričnih ulja osim o vrsti i ispitivanom patogenu ovisi o primijenjenoj količini ulja (Park i sur., 2017.).

Komorač, timijan, klinčić i kadulja četiri su eterična ulja korištena u *in vitro* uvjetima protiv gljive *Penicillium digitatum*. Utjecaj ulja na porast gljive ispitivan je metodom kontaktnog i volatilnog učinka. Pri koncentracijama eteričnog ulja od 600 ppm-a ulja timijana i klinčića u potpunosti su inhibirala rast micelija gljive u obje metode ispitivanja. Ulje kadulje i komorača nije imalo inhibirajuće djelovanje na micelij navedene gljive (Yahyazadeh i sur., 2008.).

U istraživanju El-Mohamedy i sur. (2013.) ispitivali su učinak eteričnih ulja na fitopatogene gljive *Fusarium oxysporum radices – lycopersici*, *Fusarium solani*, *Fusarium lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsi*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium sp.* i *Phytophthora sp.* te su utvrdili da se povećavanjem koncentracije eteričnih ulja smanjuje rast micelija. Minimalan rast micelija zapažen je pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji. Pri koncentracijama svih eteričnih ulja od 1,5% uočena je potpuna inhibicija rasta micelija gljiva.

Wang i sur. (2019.) ispitivali su djelovanje eteričnih ulja klinčića, mente, cimeta, limunske trave, timijana, limuna i lovora protiv fitopatogene gljive *Colletotrichum gloeosporioides*.

Učinak eteričnih ulja ovisio je o načinu primjene gdje su eterično ulje klinčića i cimeta pokazali visoki antifungalni učinak u kontaktnom i volatilnom djelovanju. Potpuna inhibicija micelija gljive utvrđena je pri primjeni 100 $\mu\text{L/L}$ ulja pri volatilnom djelovanju, odnosno 1000 $\mu\text{L/L}$ u kontaktnom djelovanju.

Vitoratos i sur. (2013.) utvrdili su, ispitujući antifungalnu aktivnost eteričnih ulja origana, timijana i limuna na rast gljiva *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* i *Penicillium digitatum*, da je porast micelija gljiva *P. italicum* i *P. digitatum* u potpunosti inhibiralo eterično ulje timijana pri koncentraciji 0,5 $\mu\text{L/ml}$. Također, nije došlo do klijanja spora gljive *Botrytis cinerea* tretirane eteričnim uljima limuna i origana u koncentracijama od 22 $\mu\text{L/ml}$, odnosno 0,02 $\mu\text{l/ml}$.

Amvam Zollo i sur. (1998.) navode da eterična ulja eukaliptusa i naranče slatke čak i kod primjene u najvećim količinama nemaju inhibitorno djelovanje na porast micelija gljiva, dok ulje timijana i u minimalnim količinama od 5 μL ima izrazito inhibitorno djelovanje na rast micelija gljiva *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride*, *Auerobasidium pullulans* te *Microsporum gypseum*.

Eterično ulje komorača imalo je inhibitorni učinak na porast micelija gljiva *Fusarium graminearum* i *Fusarium verticillioides* (Singh i sur., 2006.). Također, Farshbaf Moghadam i sur. (2004.) utvrdili su da eterično ulje metvice ima antifungalnu sposobnost te sprječava porast micelija gljive *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceria*.

Lee i suradnici (2007.) navode da ulje timijana ima značajan inhibitorni učinak na rast micelija gljive *Rhizoctonia solani* i *Colletotrichum gloeosporioides*. U radu je ispitano i djelovanje ulja naranče slatke koje nije imalo inhibitorni učinak na razvoj gljive *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* i *Rhizoctonia solani*.

Al – Reza i sur. (2010.) utvrdili su da eterično ulje noćnog jasmina inhibira porast micelija fitopatogenih gljiva *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* i do 80%.

Soylu i sur. (2010.) istraživali su kontaktno i volatilno djelovanje eteričnih ulja origana, lavande i ružmarina protiv fitopatogene gljive *Botrytis cinerea* te je utvrđeno da inhibirano djelovanje eteričnog ulja u kontaktnom i volatilnom učinku ovisi o primjenjenoj količini ili koncentraciji. Pri volatilnom učinku opažena je potpuna inhibicija micelija gljive pri

koncentraciji od 0,2 µg/ml eteričnog ulja origana te pri primijenjenoj količini od 1,6 µg/ml eteričnog ulja lavande i ružmarina. Tijekom kontaktnog učinka potrebne koncentracije za potpunu inhibiciju rasta micelija iznosile su 12,8 µg/ml eteričnog ulja origana, odnosno 25,6 µg/ml eteričnog ulja lavande i ružmarina.

Tijekom ispitivanja antifungalnih svojstva različitih koncentracija eteričnih ulja origana i klinčića u uvjetima kontaktnog i volatilnog djelovanja utvrđeno je da oba eterična ulja imaju inhibitorno djelovanje na porast gljive *S. sclerotiorum* (Soylu i sur., 2007.).

Nadalje, u istraživanju antifungalnih svojstva eteričnih ulja na porast fitopatogenih gljiva Ćosić i sur. (2010.) navode da ulje običnog timijana pokazuje najbolji antifungalni učinak, a nakon njega slijede ulja lista cimeta, klinčića i anisa.

Antifungalni učinak pojedinih eteričnih ulja osim o vrsti i koncentraciji ovisi o vremenu inkubacije (Palfi i sur., 2019.). U radu Moghaddama i sur. (2013.) tijekom ispitivanja antifungalne sposobnosti ulja metvice dolazi do djelomične inhibicije rasta micelija gljive *Drechela spicifera* nakon 7 dana primjene eteričnog ulja u količinama od 800 i 1600 ppm. Potpuna inhibicija micelija gljive *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* opažena je pri koncentraciji eteričnog ulja mente od 1600 ppm.

Fusarium culmorum, *Fusarium solani* i *Fusarium poae* su vrste gljiva iz roda *Fusarium* spomenute u istraživanju antifungalnog djelovanja eteričnog ulja *Pinus ponderosa*, *Pinus resinosa* te *Pinus strobus* od strane Krauze–Baranowska i sur. (2002.). Eterična ulja pokazala su različito antifungalno djelovanje. Ulje *P. ponderosa* imalo je najbolje djelovanje na sve tri navedene gljive čak i pri najnižoj koncentraciji od 2%. Nadalje, eterična ulja *P. resinosa* i *P. strobus* inhibirala su porast micelija gljiva roda *Fusarium*, ali nešto slabije. Do razlika u djelovanju eteričnih ulja u ovom slučaju dolazi zbog njihovog kemijskog sastava. Eterično ulje *P. resinosa* i *P. strobus* sadrže velike količine spoja β – pinen (45,7 %) dok ulje *P. ponderosa* sadrži 7,9% navedenog spoja. Spojevi koji prevladavaju u eteričnom ulju *P. ponderosa* su ε - pinen (17,7%) i germakren D (12,2%). Shodno tome ulje *Pinus strobus* iskazalo je najslabije antifungalno djelovanje.

Tijekom ispitivanja utjecaja eteričnog ulja čajevca na fitopatogene gljive *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Pyrenophora graminea* i *Blumeria graminis* Terzi i sur. (2007.) su utvrdili da eterično ulje čajevca ima pojedine komponente koje imaju mogućnost inhibirati porast micelija. Kao jednu od komponenti zaslužnih za potpunu inhibiciju

micelija gljiva *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Pyrenophora graminea* i *Blumeria graminis* autori navode terpinen-4-ol.

U istraživanju koje su proveli Krzysko–Lupicka i Walkowiak (2014.) korišteno je sedam eteričnih ulja različitih biljnih vrsta. Autori navode da je eterično ulje timijana u svim ispitivanim koncentracijama u rasponu od 0,025 – 2,0 % u potpunosti inhibiralo rast micelija fitopatogene gljive *Fusarium culmorum*, dok su druga eterična ulja poput čajevca, limunske trave i verbene uzrokovale potpunu inhibiciju rasta micelija navedene gljive pri koncentracijama od 0,5 do 2,0 %.

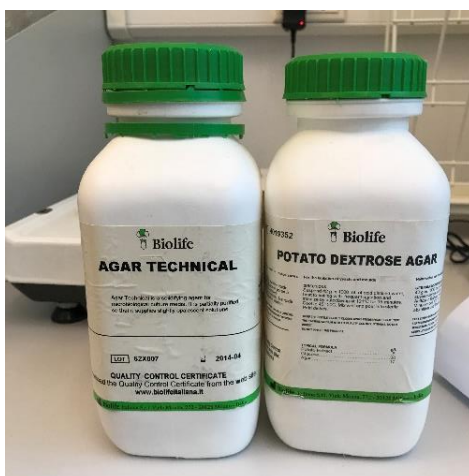
Ujedno, tijekom aplikacije eteričnog ulja timijana na zrno pšenice doći će do reduciranja količine mikotoksina koje produciraju *Fusarium* vrste (Sumalan i sur., 2013.). Utjecaj eteričnih ulja lovorovog lista, origana, klinčića i cimeta na gljivu *Fusarium culmorum* i *Fusarium verticillioides* istraživali su Rosello i sur. (2015.). Eterična ulja cimeta, klinčića i origana smanjila su brzinu rasta micelija gljive za 87 %, dok je ulje origana u potpunosti inhibiralo porast micelija gljive *Fusarium culmorum*.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje kontaktnog i volatilnog učinka šest eteričnih ulja na porast micelija fitopatogene gljive *Fusarium culmorum* provedeno je u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek u 2022. godini.

3.1. Pripreme za provođenje pokusa

Prije postavljanja pokusa Petrijeve zdjelice su sterilizirane kako ne bi došlo do kontaminacije koja bi prouzročile anomalije u daljnjem istraživanju. Petrijeve zdjelice sterilizirane su u autoklavu. Autoklav je uređaj za sterilizaciju koji radi na principu pare, kako bi sterilizacija bila učinkovita potrebno je pratiti upute za rad. Razina sterilizirane vode mora biti unutar plave oznake na spremniku uređaja. Pripremljene Petrijeve zdjelice (ukupno 114) u aluminijskim stalcima postavljaju se u autoklav oko otvora u sredini koji mora ostati otvoren. Temperatura na kojoj se steriliziraju Petrijeve zdjelice iznosi 120 ° C u trajanju od 20 minuta. Petrijeve zdjelice se ne smiju otvarati nakon procesa sterilizacije sve do ulijevanja pripremljene hranjive podloge. Nadalje, potrebno je pripremiti sastojke za kuhanje hranjive podloge. U Erlenmeyerovu tikvicu dodan je 21 g krumpir dekstroznog agara te 1,40 g tehničkog agara (Slika 1.) izvaganih prije samog dodavanja kako ne bi došlo do nepravilnosti. U odmjernoj tikvici pripremi se 500 ml destilirane vode koja se zatim doda ostalom sadržaju Erlenmeyerove tikvice. Sadržaj tikvice potrebno je ručno izmiješati kako bi se stvorila homogena tekuća smjesa. Na vrh tikvice polaže se aluminijska folija te je tikvica s agarom spremna za autoklaviranje.



Slika 1. Tehnički i krumpir dekstrozni agar.

Švitek, M. 2022.

Nakon sterilizacije tikvicu treba ostaviti da se ohladi te potom provjeriti pH vrijednost koja bi trebala iznositi između 6 i 6,5. Temperatura Erlenmeyerove tikvice s hranjivom podlogom treba iznositi 60 °C prije nego se doda 0,25 g antibiotika. Sterilne Petrijeve zdjelice koje se nalaze u laminaru ispunjavaju se pripremljenom hranjivom podlogom jedna po jedna te se potom zatvaraju (Slika 2.).



Slika 2. Hranjiva podloga spremna za uporabu.

Švitek, M. 2022.

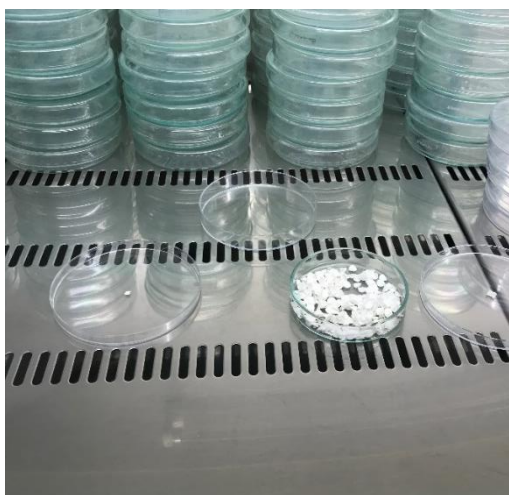
Pokus se dalje provodi u laminaru kako ne bi došlo do neželjenih kontaminacija. Prije samog postavljanja pokusa nužno je označiti Petrijeve zdjelice, shodno tome potrebno je napisati datum, naziv gljive koja je korištena, naziv eteričnog ulja i njegovu primijenjenu količinu te broj ponavljanja.

Tijekom ovog pokusa korištena eterična ulja su: limun (*Citrus limon* L.), naranča slatka (*Aurantium dulcis* L.), bor planinski (*Pinus pumilio* L.), ružmarin (*Rosmarinus* L.), timijan (*Thymus vulgaris* L.) i anis zvjezdasti (*Ilicum verum* L.). Spomenuta eterična ulja aplicirana su u količinama od 10, 30 i 50 μ L te je pokus postavljen u tri ponavljanja za svako eterično ulje i primijenjenu količinu.

3.2. Postavljanje pokusa

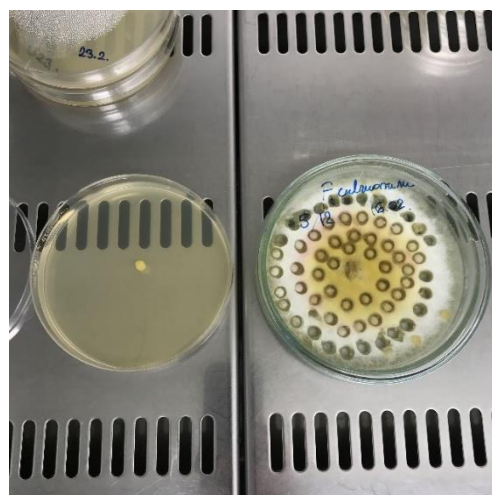
Petrijeve zdjelice koje se nalaze u laminaru nakon što se hranjiva podloga ohladila do 60 °C spremne su za postavljanje čiste kulture gljive *Fusarium culmorum*. Laminar je detaljno dezinficiran etanolom kao i sav pribor koji će se koristiti.

Ulja su aplicirana na dva načina: volatilno i kontaktno. Prije postavljanja čiste kulture gljive, tijekom metode volatilnog učinka neophodno je u središte poklopca Petrijeve zdjelice postaviti okrugli sterilni filter papir (Slika 3.) i zalijepiti ga pomoću dvostrane ljepljive trake. Za postavljanje unaprijed pripremljene čiste kulture gljive *Fusarium culmorum* koja se nalazila u drugoj Petrijevoj zdjelici korišten je metalni kružni rezač koji je prije upotrebe dezinficiran na plameniku. Uz rub zdjelice se buši gljiva dok se ne dopre do sredine Petrijeve zdjelice. Nadalje se pomoću prethodno dezinficirane laboratorijske igle preuzima kružni isječak gljive te se stavlja u centar Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom (Slika 4.). Nakon postavljanja navedenog, pomoću mikropipete dozira se određena količina eteričnog ulja na sredinu filter papira koji se nalazi na poklopcu Petrijeve zdjelice (Slika 5.) te se Petrijeva zdjelica potom zatvara kako bi se spriječila moguća kontaminacija. Ranije navedenih šest eteričnih ulja se koriste u tri različite količine (10, 30 i 50 μ L) te se za svaku od navedenih količina ovaj postupak ponavlja u tri Petrijeve zdjelice. Na taj način dobijemo 54 Petrijeve zdjelice. Na isti način su kao kontrolna skupina pripremljene tri zdjelice u kojima je umjesto eteričnog ulja korištena destilirana voda.



Slika 3. Postavljanje okruglog sterilnog filter papira u Petrijeve zdjelice u laminaru.

Švitek, M. 2022.

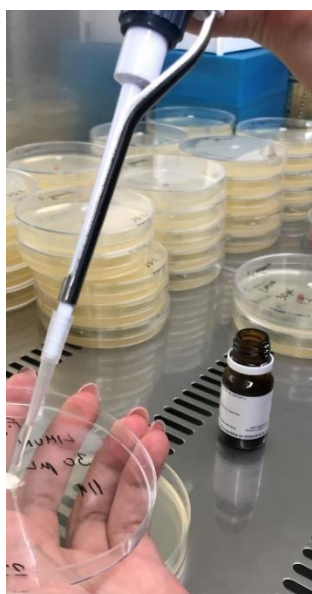


Slika 4. Kružni isječak čiste kulture gljive *Fusarium culmorum*.

Švitek, M. 2022.

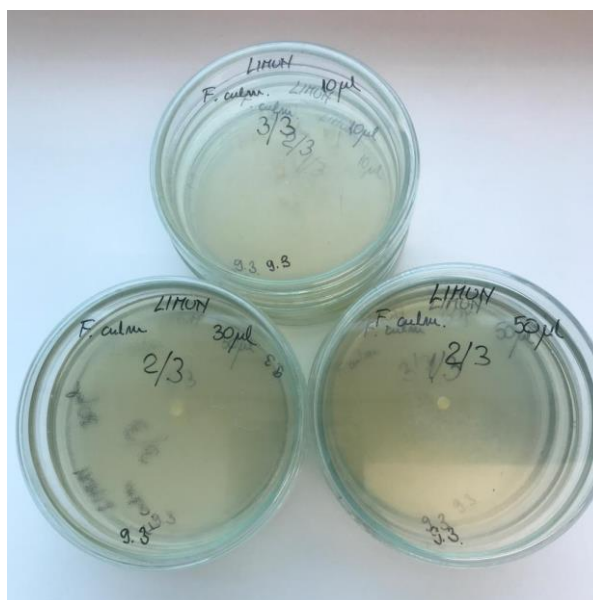
Kod istraživanja kontaktnog djelovanja eteričnih ulja na istraživanu gljivu podloga je pripremljena na isti način kao kod ispitivanja volatilnog djelovanja te ju je, također, potrebno ohladiti na 60 °C, dodati antibiotik i potom izliti u Petrijeve zdjelice koje su prethodno sterilizirane u autoklavu.

Nakon što su na taj način Petrijeve zdjelice pripremljene za korištenje u podlogu je potrebno dodati pokusom predviđene količine (Slika 5.) eteričnog ulja (na primjer: 10 μ L eteričnog ulja limuna u podlogu za jednu Petrijevu zdjelicu). Pokus je i u ovom slučaju postavljen u 3 ponavljanja. Nakon što su Petrijeve zdjelice pripremljene kružni isječak čiste kulture gljive *Fusarium culmorum* postavlja se na sredinu podloge pomoću dezinficirane laboratorijske igle te se ona zatvara (Slika 6.). Postupak se ponavlja za sve tri količine i svih šest vrsta eteričnih ulja, a u dodatne tri Petrijeve zdjelice s gljivom umjesto eteričnog ulja dodajemo destiliranu vodu što predstavlja kontrolnu skupinu. Naposljetku imamo 57 Petrijevih zdjelica u kojima ispitujemo volatilni učinak eteričnih ulja i 57 Petrijevih zdjelica u kojim ispitujemo kontaktni učinak eteričnih ulja različitih koncentracija što ukupno iznosi 114 Petrijevih zdjelica.



Slika 5. Doziranje određene količine eteričnog ulja pomoću ručne pipete na filter papir.

Švitek, M. 2022.

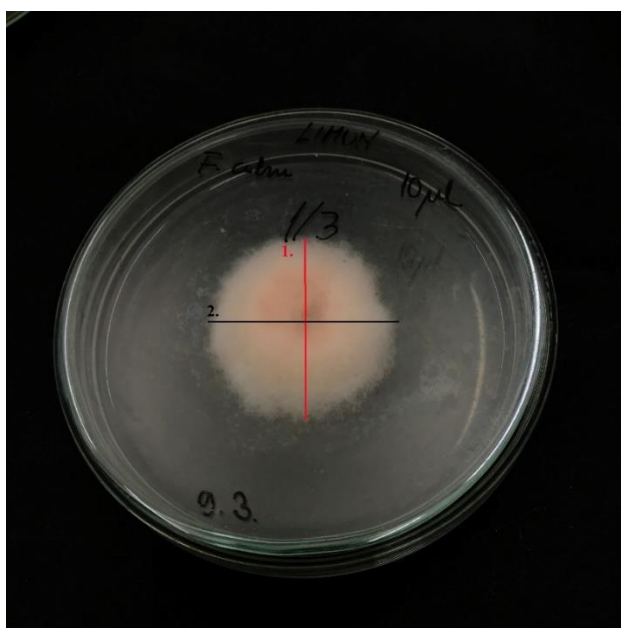


Slika 6. Čista kultura gljive u Petrijevoj zdjelici spremna za korištenje u istraživanja.

Švitek, M. 2022.

Sve Petrijeve zdjelice stavljaju se u Aralab klima komoru na inkubaciju. Funkcije komore podešene su prema potrebama pokusa, odnosno temperatura iznosi 22 °C dok je relativna vlažnost zraka podešena na 70 %. Nakon 48, 120 i 168 sati izvršena su mjerenja rasta micelija istraživane gljive, a mjerenje je obavljeno pomoću ravnala vertikalno i horizontalno prema krajevima gljive (Slika 7.) na crnoj podlozi kako bi vrijednosti bile što preciznije. Mjerenja su učinjena na svih 114 Petrijevih zdjelica.

Iz dobivenih podataka o rastu micelija izračunat će se postotak inhibicije rasta. Pri statističkoj obradi podataka koristit će se program SAS 9.2 (SAS Inst., SAD).



Slika 7. Prikaz mjerenja micelija gljive
Fusarium culmorum.

Švitek, M. 2022.

4. REZULTATI

Rezultati istraživanja dobiveni su u *in vitro* uvjetima, a istraženo je kontaktno i volatilno djelovanje šest eteričnih ulja primijenjenih u tri količine nakon 48, 120 i 168 sati na fitopatogenu gljivu *Fusarium culmorum*.

4.1. Inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na gljivu *F. culmorum* nakon 48 sati

U tablici 1 prikazan je postotak inhibicije rasta micelija *F. culmorum* nakon 48 sati od nacjepljivanja za sva ulja i primijenjene količine.

Tablica 1. Inhibitorno djelovanje šest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* nakon 48 sati od nacjepljivanja gljive.

| Ulje | Kontaktni učinak | | | Volatilni učinak | | | LSD 0,05 |
|---------------------|------------------|------------------|---------------|-------------------|-------------------|---------------|-------------|
| | 10 µL | 30 µL | 50 µL | 10 µL | 30 µL | 50 µL | |
| Limun | 41,22 ± 24,39 | 60,93 ± 8,64 | 71,68 ± 8,21 | 3,58 ± 4,11 | 2,69 ± 12,32 | 6,27 ± 6,21 | 22,32 |
| Naranča | -12,54 ± 6,77 | -6,27 ± 5,60 | 13,44 ± 19,38 | -37,63 ± 10,75 | -15,23 ± 13,53 | 4,48 ± 3,10 | 20,04 |
| Bor | -10,75 ± 4,66 | 33,15 ± 15,75 | 35,84 ± 29,61 | -6,27 ± 8,21 | 5,38 ± 4,66 | 17,03 ± 8,64 | 26,29 |
| Ružmarin | -7,17 ± 3,10 | 46,59 ± 26,93 | 65,41 ± 19,81 | -1,79 ± 3,10 | 32,26 ± 11,72 | 25,09 ± 11,19 | 27,17 |
| Timijan | 80,65 ± 0,00 | 80,65 ± 0,00 | 80,65 ± 0,00 | 80,65 ± 0,00 | 80,65 ± 0,00 | 80,65 ± 0,00 | 0,00 |
| Anis | 19,71 ± 53,38 | 80,65 ± 0,00 | 80,65 ± 0,00 | 53,76 ± 2,69 | 76,16 ± 4,11 | 80,65 ± 0,00 | 38,93 |
| Kontrola | 0,00 ± 2,69 | 0,00 ± 2,69 | 0,00 ± 2,69 | 0,00 ± 2,69 | 0,00 ± 2,69 | 0,00 ± 2,69 | |
| LSD 0,05 | 39,42 | 21,82 | 27,45 | 9,91 | 15,06 | 10,58 | |

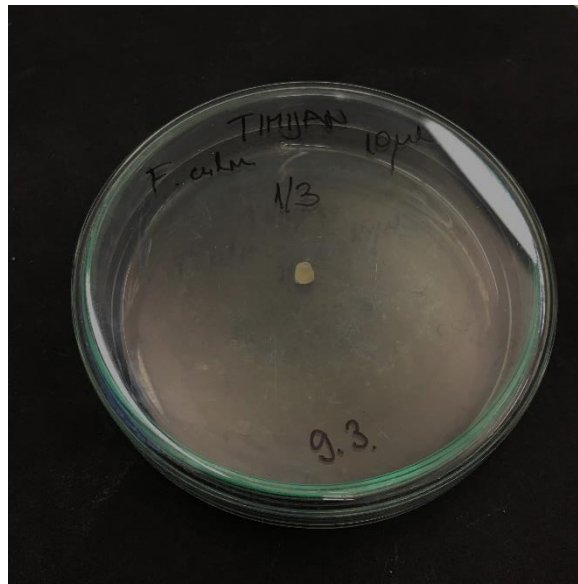
Na slici 8 prikazano je djelovanje ulja naranče, a na slici 9 djelovanje ulja timijana primijenjenih kontaktno i u količini 10 µL na rast gljive *F. culmorum* nakon 48 sati inkubacije. Pri primjeni 10 µL ulja, a nakon 48 sati inkubacije jedino su ulja limuna i timijana statistički značajno inhibirala rast micelija u odnosu na kontrolu. Između ostalih gljiva i kontrole nisu utvrđene statistički značajne razlike. Pri uporabi 30 µL ulja utvrđene su

značajne razlike između kontrole i ulja limuna, bora, timijana i anisa, a pri primjeni 50 μ L između kontrole i ulja limuna, bora, ružmarina, timijana i anisa. Ulje timijana je potpuno inhibiralo rast gljive pri svim primijenjenim količinama.



Slika 8. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* pri primijeni kontaktnog učinka eteričnog ulja naranče (10 μ L).

Švitek, M. 2022.



Slika 9. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* pri primijeni kontaktnog učinka eteričnog ulja timijana (10 μ L).

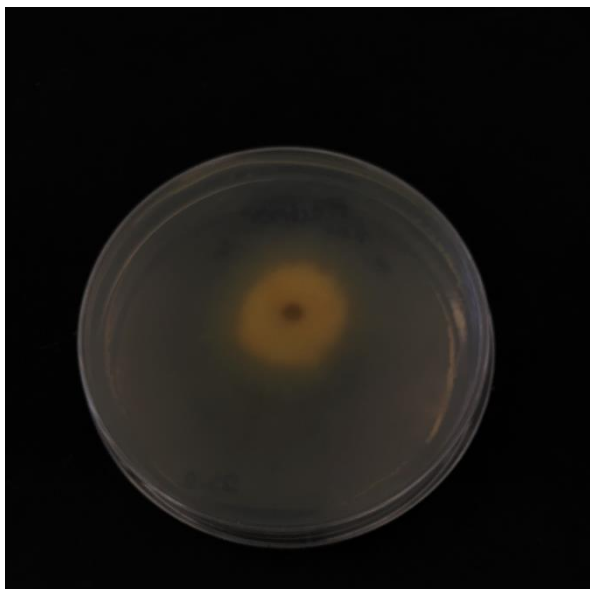
Švitek, M. 2022.

Na slici 10. prikazan je porast micelija *F. culmorum* pri volatilnoj primjeni 10 μ L ulja ružmarina, a na slici 11 porast micelija u kontrolnoj varijanti. Pri primjeni 10 μ L ulja, a nakon 48 sati inkubacije ulja anisa i timijana statistički značajno inhibirala rast micelija u odnosu na kontrolu, a ulje naranče je značajno stimuliralo rast gljive. Pri primjeni 30 μ L ulja anisa, ružmarina i timijana su značajno inhibirala rast gljive, a ulje naranče je značajno stimuliralo njezin porast u odnosu na kontrolu. Pri primjeni 50 μ L ulja bora, ružmarina, anisa i timijana su značajno inhibirala rast *F. culmorum*.

Pri kontaktnoj primjeni 50 μ L ulja timijana, limuna i anisa imala su značajno jači antifungalni učinak u odnosu na ulja naranče i bora, dok su pri volatilnoj primjeni ulja timijana i anisa značajno jače inhibirala rast *F. culmorum* u odnosu na sva ostala ulja. Pri

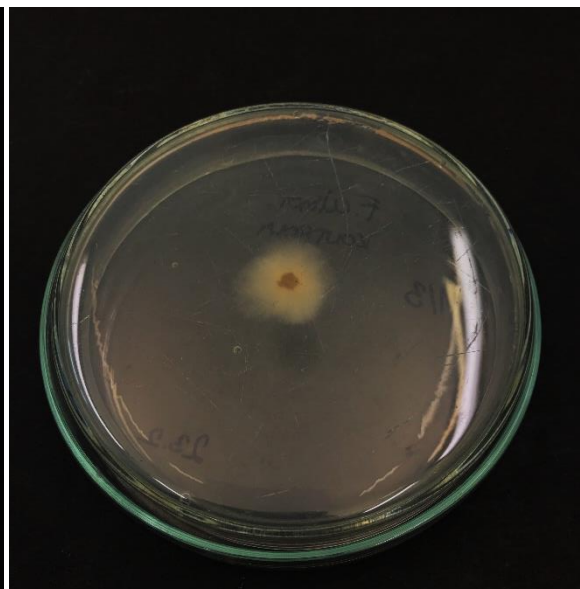
volatilnoj primjeni ulja bora i ružmarina su značajno jače inhibirala rast gljive u odnosu na ulja limuna i naranče.

Ulje limuna je statistički značajno bolje inhibiralo rast gljive pri kontaktnoj primjeni.



Slika 10. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* pri primijeni volatilnog učinka eteričnog ulja ružmarina (10 µL).

Švitek, M. 2022.



Slika 11. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* u kontrolnoj skupini (destilirana voda).

Švitek, M. 2022.

4.2. Inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na gljivu *F. culmorum* nakon 120 sati

U tablici 2 prikazan je postotak inhibicije rasta micelija *F. culmorum* nakon 120 sati od nacjepljivanja za sva ulja i primijenjene količine.

Tablica 2. Inhibitorno djelovanje šest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* nakon 120 sati od nacjepljivanja gljive.

| Ulje | Kontaktni učinak | | | Volatilni učinak | | | LSD 0,05 |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| | 10 μ L | 30 μ L | 50 μ L | 10 μ L | 30 μ L | 50 μ L | |
| Limun | 42,74 \pm 6,57 | 54,60 \pm 9,11 | 62,88 \pm 18,60 | 4,96 \pm 4,08 | 4,13 \pm 3,91 | 5,23 \pm 14,85 | 19,55 |
| Naranča | -6,62 \pm 3,34 | 3,30 \pm 2,08 | 11,03 \pm 4,70 | -13,24 \pm 6,69 | -3,87 \pm 9,11 | 1,10 \pm 2,66 | 9,54 |
| Bor | -1,11 \pm 2,48 | 29,51 \pm 11,67 | 31,71 \pm 7,04 | 5,51 \pm 3,79 | 8,54 \pm 8,33 | 13,78 \pm 7,58 | 13,26 |
| Ružmarin | 0,82 \pm 5,06 | 33,92 \pm 24,83 | 52,40 \pm 20,71 | 3,30 \pm 3,91 | 19,58 \pm 7,21 | 18,75 \pm 7,17 | 25,05 |
| Timijan | 92,39 \pm 2,87 | 94,04 \pm 0,00 | 94,04 \pm 0,00 | 94,04 \pm 0,00 | 94,04 \pm 0,00 | 94,04 \pm 0,00 | 2,08 |
| Anis | -5,25 \pm 28,71 | 74,19 \pm 34,39 | 94,04 \pm 0,00 | 37,23 \pm 7,51 | 64,26 \pm 13,13 | 84,67 \pm 6,94 | 34,71 |
| Kontrola | -0,01 \pm 1,26 | -0,01 \pm 1,26 | -0,01 \pm 1,26 | -0,01 \pm 1,26 | -0,01 \pm 1,26 | -0,01 \pm 1,26 | |
| LSD 0,05 | 20,08 | 29,78 | 19,28 | 10,98 | 15,09 | 14,98 | |

Pri kontaktnoj primjeni ulja u količini 10 μ L ulja limuna i timijana značajno su inhibirala rast gljive u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na sva ostala istraživana ulja. Značajno antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu i ulje naranče pri primjeni 30 μ L imala su ulja limuna, ružmarina, timijana i anisa, a ulja timijana i anisa značajno su jače inhibirala rast micelija i u odnosu na ulja bora i ružmarina. Pri primjeni 50 μ L ulja limuna, bora, ružmarina timijana i anisa značajno su inhibirala rast gljive u odnosu na kontrolu i ulje naranče. Ulja timijana i anisa su značajno bolje djelovala i u odnosu na ulja ružmarina, bora i limuna.

Na slici 12. prikazan je učinak eteričnih ulja naranče i timijana nakon 120 sati od postavljanja pokusa.



Slika 12. Antifungalni učinak eteričnog ulja naranče i timijana nakon 120 sati od postavljanja pokusa.

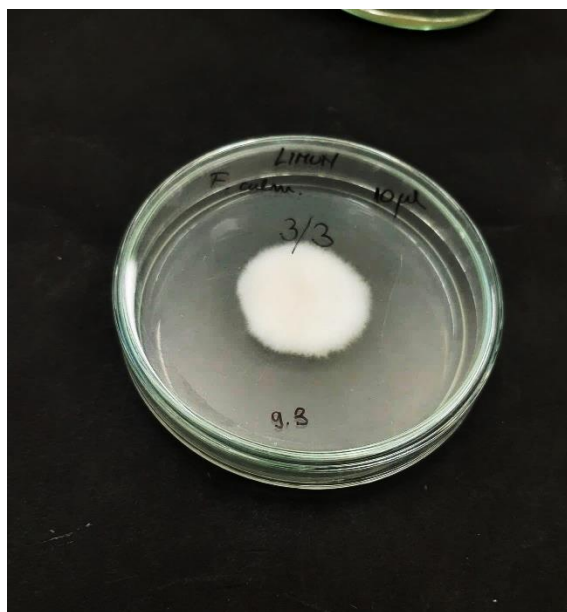
Švitek, M. 2022.

Na slikama 13 i 14 prikazan je rast micelija gljive *F. graminearum* pri primjeni ulja limuna u količini 10 μ L pri kontaknoj i volatilnoj primjeni.

Pri volatilnoj primjeni eteričnih ulja u količini 10 μ L ulje timijana imalo je značajno bolje antifungalno djelovanje u odnosu na kontrolu i sva ostala ulja. Ulje anisa također je značajno jače smanjilo rast gljive u odnosu na kontrolu, ali i u odnosu na sva ostala ulja izuzev timijana.

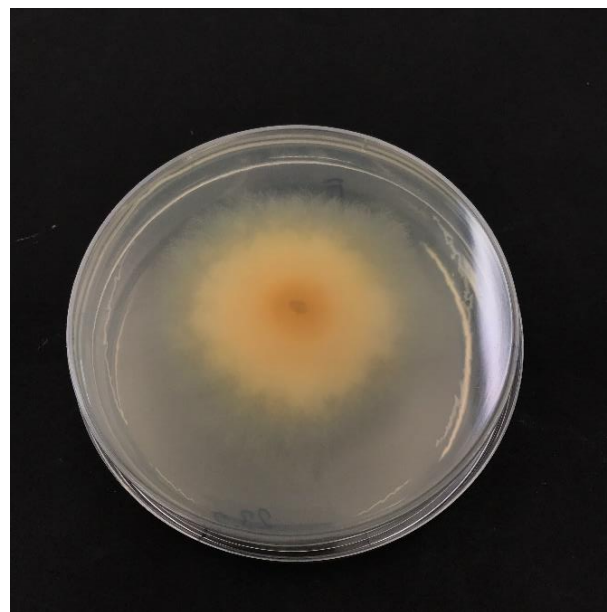
Ulje timijana je i pri primjeni 30 μ L imalo značajno jače negativno djelovanje na rast micelija u odnosu na kontrolu i sva ostala ulja. Značajno bolje djelovanje u odnosu na kontrolu imala su i ulja anisa i ružmarina. Ulje anisa je značajno jače inhibiralo rast gljive i u odnosu na eterično ulje ružmarina.

Pri primjeni ulja u količini 50 μ L ulja timijana, ružmarina i anisa značajno jače su smanjila rast *F. culmorum* u odnosu na kontrolu. Djelovanje ulja timijana i anisa bilo je značajno bolje u odnosu na djelovanje ulje ružmarina.



Slika 13. Utjecaj eteričnog ulja limuna nakon 120 sati od postavljanja pokusa, kontaktni učinak.

Švitek, M.



Slika 14. Utjecaj eteričnog ulja limuna nakon 120 sati od postavljanja pokusa, volatilni učinak.

Švitek, M.

I nakon 120 sati od naciepljivanja ulje limuna je u svim primijenjenim količinama značajno jače inhibiralo rast gljive pri kontaktnoj primjeni.

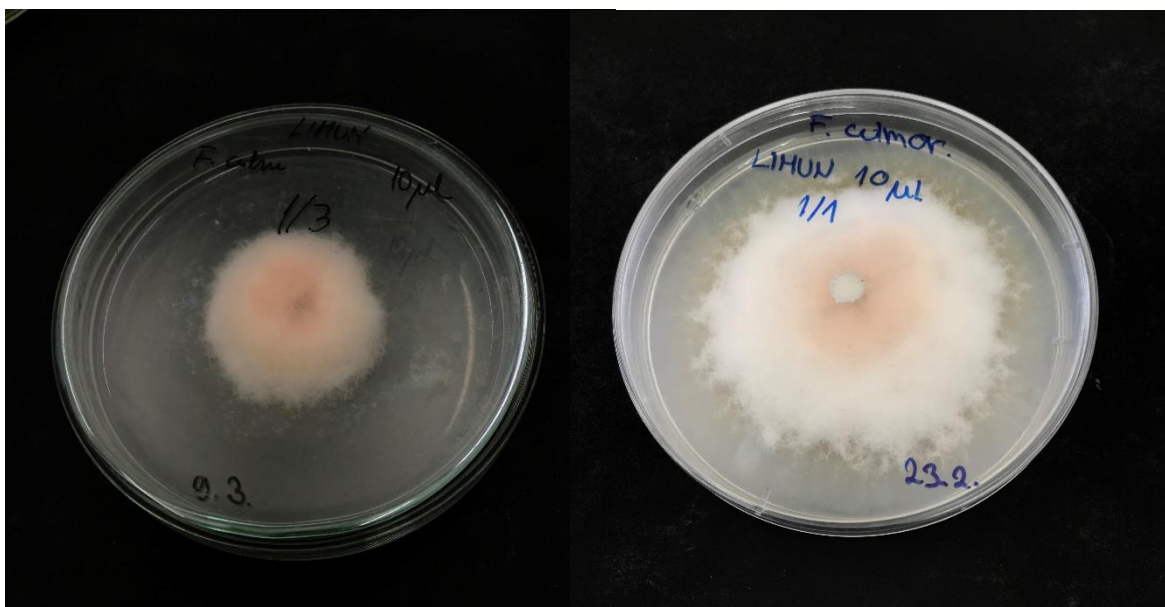
4.3. Inhibitorno djelovanje eteričnih ulja na gljivu *F. culmorum* nakon 168 sati

U tablici 3 prikazan je postotak inhibicije rasta micelija *F. culmorum* nakon 168 sati od nacjepljivanja za sva ulja i sve primijenjene količine.

Tablica 3. Inhibitorno djelovanje šest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* nakon 168 sati od nacjepljivanja gljive.

| Ulje | Kontaktni učinak | | | Volatilni učinak | | | LSD 0,05 |
|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| | 10 μ L | 30 μ L | 50 μ L | 10 μ L | 30 μ L | 50 μ L | |
| Limun | 40,74 \pm 3,43 | 51,44 \pm 1,69 | 58,20 \pm 10,43 | 4,69 \pm 0,00 | 4,69 \pm 0,00 | 8,07 \pm 5,85 | 9,12 |
| Naranča | 2,25 \pm 3,75 | 7,88 \pm 2,54 | 12,95 \pm 3,44 | 4,69 \pm 0,00 | 4,69 \pm 0,00 | 4,69 \pm 0,00 | 4,13 |
| Bor | 0,93 \pm 2,35 | 22,34 \pm 13,24 | 29,66 \pm 6,77 | 5,81 \pm 1,49 | 5,44 \pm 1,30 | 4,69 \pm 0,00 | 11,03 |
| Ružmarin | 0,93 \pm 0,65 | 24,22 \pm 16,90 | 44,49 \pm 16,34 | 4,69 \pm 0,00 | 16,14 \pm 5,05 | 14,08 \pm 7,67 | 18,34 |
| Timijan | 92,94 \pm 5,20 | 95,94 \pm 0,00 | 95,94 \pm 0,00 | 95,94 \pm 0,00 | 95,94 \pm 0,00 | 95,94 \pm 0,00 | 3,78 |
| Anis | 3,56 \pm 7,81 | 69,84 \pm 45,21 | 95,94 \pm 0,00 | 23,65 \pm 6,72 | 53,51 \pm 20,88 | 81,30 \pm 8,12 | 37,40 |
| Kontrola | -0,01 \pm 1,63 | -0,01 \pm 1,63 | -0,01 \pm 1,63 | -0,01 \pm 1,63 | -0,01 \pm 1,63 | -0,01 \pm 1,63 | |
| LSD 0,05 | 7,32 | 33,21 | 13,82 | 4,68 | 14,29 | 8,42 | |

Na slici 15 prikazan je učinak eteričnog ulja limuna primijenjenog kontaktno i volatilno u količini 10 μ L nakon 168 sati od postavljanja pokusa.



Slika 15. Utjecaj eteričnog ulja limuna nakon 168 sati od postavljanja pokusa, kontaktni (lijevo) i volatilni (desno) učinak.

Švitek, M.

Pri kontaktnoj primjeni 10 μ L eterično ulje timijana značajno je jače inhibiralo porast micelija u odnosu na kontrolu i sva ostala eterična ulja. Ulje limuna je imalo značajno bolji učinak u odnosu i sva ostala ulja izuzev timijana u odnosu na koje je djelovalo značajno slabije. Između kontrole i ulja anisa, bora, naranče i ružmarina kao niti između navedenih ulja međusobno nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Pri kontaktnoj primjeni 30 μ L ulja timijana, limuna i anisa rast gljive je bio značajno slabiji u odnosu na kontrolu kao i u odnosu na ulje naranče. Ulje timijana je značajno jače negativno djelovalo na rast gljive u odnosu na sva ulja izuzev anisa. Statistički značajnih razlika u djelovanju nije bilo između ulja ružmarina, bora i naranče kao i između anisa i limuna.

Pri kontaktnoj primjeni 50 μ L ulja timijana i anisa utvrđen je značajno slabiji rast micelija gljive u odnosu na kontrolu i rast gljive pri primjeni ulja limuna, naranče, bora i ružmarina. Ulja ružmarina i limuna su značajno jače negativno djelovala na rast gljive u odnosu na ulja naranče i bora.

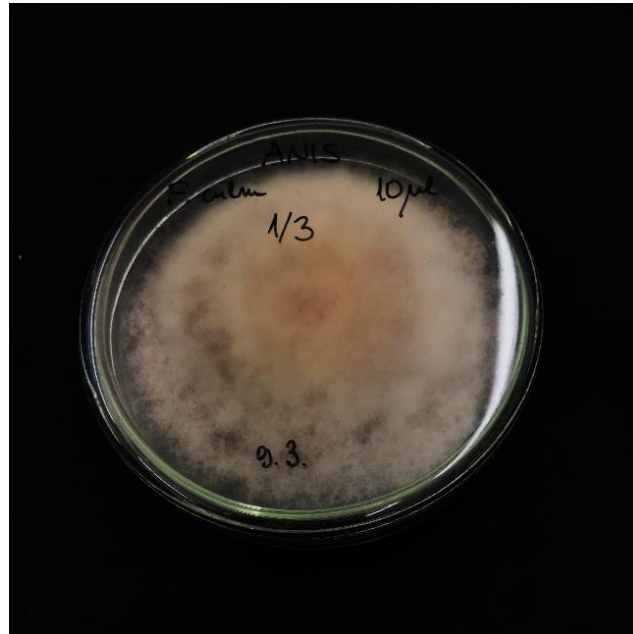
Pri volatilnoj primjeni ulja u količini 10 μ L utvrđeno je da ulje timijana ima značajno jače antifungalno djelovanje u odnosu na sva ostala ulja i kontrolu. Pri primjeni anisa u istoj količini porast micelija bio je značajno slabiji u odnosu na ulja limuna, bora, naranče i ružmarina i kontrolu. Razlike u djelovanju ulja limuna, naranče, bora i ružmarina nisu utvrđene.

Pri volatilnoj primjeni 30 μ L ulje timijana je značajno jače inhibiralo rast gljive u odnosu na sva ostala ulja i kontrolu. Slijedi ulje anisa koje je značajno jače inhibiralo rast micelija u odnosu na sva ulja izuzev timijana.

Pri volatilnoj primjeni 50 μ L ulje timijana je značajno jače inhibiralo rast micelija u odnosu na sva ostala ulja, za njim slijedi ulje anisa koje je djelovalo značajne jače u odnosu na ulja limuna, naranče, ružmarina i bora.

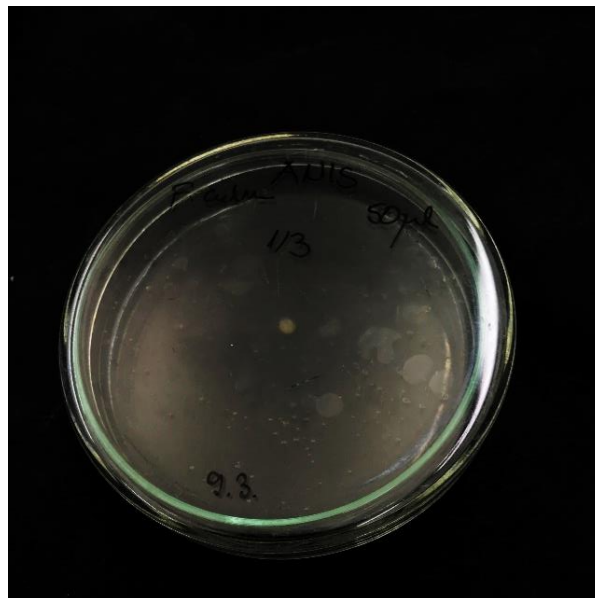
I nakon 168 sati od nacjepljivanja učinak ulja limuna značajno je bolji pri kontaktnoj primjeni u odnosu na volatilnu primjenu.

Na slikama 16 i 17 prikazano je djelovanje ulja anisa na rast fitopatogene gljive *F. culmorum* nakon 168 sati i pri primjeni ulja u količini 10 odnosno 50 μ L.



Slika 16. Utjecaj 10 μ L eteričnog ulja anisa na porast micelija
gljive *Fusarium culmorum*.

Švitek, M.



Slika 17. Utjecaj 50 μ L eteričnog ulja anisa na porast micelija
gljive *Fusarium culmorum*.

Švitek, M.

5. RASPRAVA

Upotreba sintetičkih fungicida djeluje negativno prvenstveno na okoliš i zdravlje ljudi, a također, ne manje važno, kod biljnih patogena razvija se rezistentnost kao posljedica prekomjerne upotrebe fungicida s istim mehanizmom djelovanja (Palfi i sur., 2019.). Adekvatna opcija zaštite od biljnih patogena su biološke mjere borbe, a kao jedan od potencijalno dobrih pristupa je upotreba eteričnih ulja koja posjeduju antifungalna, antivirusna, antibakterijska i insekticidna svojstva prema ispitivanjima koje su proveli Zygodlo i Grosso (1995.) i Palfi i sur. (2019.).

Na temelju istraživanja koje smo proveli u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek utvrdili smo da eterična ulja imaju različito antifungalno djelovanje na porast micelija gljive *Fusarium culmorum*. Učinak ulja prema našem istraživanju može ovisiti o primijenjenoj količini ulja, vrsti eteričnog ulja i dužini inkubacije.

Povećanjem količine primijene eteričnih ulja u pravilu se pojačava i njihovo antifungalno djelovanje, ali do određene količine primijene nakon koje se jačina djelovanja ne povećava (Ćosić i sur., 2010.) Kod neki ulja, kao što je u našem slučaju ulje timijana, nema tendencije jačanja učinka djelovanja ulja s povećanjem primijenjene količine budući da navedeno ulje ima vrlo jako djelovanje i pri najmanjoj količini primjene.

Eterična ulja znanstveno dokazano mogu pokazivati i stimulatивно djelovanje na porast micelija fitopatogenih gljiva (Ćosić i sur., 2014.). U našem radu pri volatilnoj primjeni 10 i 30 μL nakon 48 sati od postavljanja pokusa ulje naranče je značajno stimuliralo rast micelija *F. culmorum* u odnosu na kontrolu. I nakon 120 sati od nacjepljivanja djelovanje ulja pri primjeni 10 μL ulja je bilo stimulatивно. Prema Ćosić i sur. (2010.) ulja kadulje, bora i gorke naranče pri primjeni 5 μL stimulatивно su djelovala na rast micelija *Diaporthe helianthi*, ulje ružmarina je stimulatивно djelovalo na rast *Fusarium subglutinans*, a ulja bora, kadulje, mente i lavande na rast micelija *Bipolaris sorokiniana*.

Tijekom istraživanja provedenih od strane Ćosić i sur. (2014.), Palfi i sur. (2019.), Park i sur. (2017.) i Vitoratos i sur. (2003.) ukazano je da djelovanje eteričnog ulja ovisi i vrsti primjenjivanog ulja. Prema brojnim istraživanjima (Kalemba i Kunich., 2003., Perez – Sanchez i sur., 2007., Wang i sur., 2019., Avam Zollo i sur., 1998., Krzysko – Lupicka i Walkowiak., 2014.) utvrđeno je da eterično ulje timijana i pri najmanjim koncentracijama

primjene ima izrazito jako antifungalno djelovanje na porast micelija fitopatogenih gljiva. Ipak, Ćosić i sur. (2010.) navode da ulje timijana u njihovom istraživanju nije inhibiralo porast micelija patogene gljive *Tanatephorus cucumeris*. U našem istraživanju eterično ulje timijana je pokazalo najjače antifungalno djelovanje na rast micelija gljive *F. culmorum* pri svim ispitivanim količinama (10, 30 i 50 μ L) i načinima primijene (volatilni i kontaktni učinak), a za njim slijedi eterično ulje anisa. Eterično ulje limuna ima značajno jači supresivni učinak na gljivu *F. culmorum* pri kontaktnoj primjeni u odnosu na volatilnu.

Eterično ulje naranče u našem radu nije značajno inhibiralo rast micelija gljive *Fusarium culmorum*. Dobiveni rezultati poklapaju se sa istraživanjima koje su proveli Tanović i sur., 2019., Amuam Zollo i sur., 1998. te Lee i sur., 2007. koji navode da eterično ulje naranče ne pokazuje inhibitorna svojstva ni pri najvećim količinama primjene.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja kontaktnog i volatilnog antifungalnog djelovanja šest eteričnih ulja (limun, naranča slatka, bor planinski, ružmarin, timijan i anis zvjezdasti) na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* dolazimo do sljedećih zaključaka.

1. Eterična ulja posjeduju antifungalna svojstva koja ovise o vrsti ulja, količini primjene ulja te načinu apliciranja odnosno djelovanja ulja.
2. Eterična ulja mogu imati stimulirajuće djelovanje na porast micelija gljive.
3. Najbolji inhibitorni učinak na porast micelija u svim ispitivanim količinama te načinima djelovanja (kontaktno i volatilno) imalo je eterično ulje timijana.
4. Eterično ulje naranče nije inhibitorno djelovalo na rast micelija ispitivane gljive bez obzira na količinu i način primjene.
5. Ulje limuna značajno je bolje inhibiralo porast gljive pri kontaktnom djelovanju u odnosu na volatilno djelovanje.
6. Povećanjem primijenjene količine eteričnog ulja ne mora se nužno povećati i antifungalno djelovanje.

7. POPIS LITERATURE

1. Al-Reza, S. M., Rahman, A., Ahmed, Y. , Kang, S. C. (2010.): Inhibition of Plant Pathogens In Vitro and In Vivo with Essential Oil and Organic Extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96: 86-92.
2. Amvam Zollo, P.H., Biyiti, L., Tchoumboungang, T., Menut, C., Lamaty, G., Bouchet, Ph. (1998.): Aromatic Plants of Tropical Central Africa, Part XXXII, Chemical Composition and Antifungal Activity of Thirteen Essential Oils from Aromatic Plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2): 107-114.
3. Bowers, J.H., Locke, J.C. (2000.): Effect of Botanical Extracts on Population Density of *Fusarium oxysporum* in Soil and Control of Fusarium Wilt in the Greenhouse. *Plant disease*, 84(3): 300-305.
4. Brown, D.W., Proctor, R. (2013.): *Fusarium, Genomics, Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, United Kingdom.
5. Ćosić, J. (2001.): Taksonomija *Fusarium* vrsta izoliranih s kultiviranog bilja, korova njihova patogenost za pšenicu. Doktorski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
6. Ćosić, J., Jurković, D., Vrandečić, K. (2013.): Fuzarijska palež klasova. *Glasnik zaštite bilja*, 4: 64-67.
7. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D. (2014.): The Effect of Essential Oils on the Development of Phytopathogenic Fungi. U: Sharma N. (ur.) „Biological Controls for Preventing Food Deterioration – Strategies for Pre- and Postharvest Management. Wiley Blackwell, UK, 273-292.
8. Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., Ravlić, M. (2010.): In vitro antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda*, 16(2): 25-28.
9. El-Mohamedy, R. S., Abdel-Kader, M. M., Abd-El-Kareem, F., El-Mougy, N. S. (2013.): Essential oils, inorganic acids and potassium salts as control measures against the growth of tomato root rot pathogens in vitro. *Journal of Agricultural Technology*, 9(6): 1507-1520.
10. Farshbaf Moghadam, M., Omid Beygi, R., Pourbaig, M.V.M., Ghaemi, A. (2004.): Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (Suppl. 2): 68-69.
11. Harris, R. (2002.): Progress with superficial mycoses using essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 12: 83-91.

12. Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., Guo, Z., Wang, Q., Jiang, W. (2010.): Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component trans-Anethole. *Molecules*, 15: 7558-7569.
13. Kalembe, D., Kunich, A. (2003.): Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
14. Krauze-Baranowska, M., Mardarowicz, M., Wiwart, M., Pobłocka, L., Dynowska, M. (2002.): Antifungal Activity of the Essential Oils from Some Species of the Genus *Pinus*. *Z. Naturforsch*, 57: 478-482.
15. Krzysko–Lupicka, L., Wakowiak, W. (2014.): Evaluation of susceptibility of phytopathogenic *Fusarium culmorum* strain on selected essential oils. *Ecological Chemistry and Engineering*, 21(3): 355-366.
16. Kumar, P., Mishra, S., Kumar, A., Kumar Sharma, A. (2016.): Antifungal efficacy of plant essential oils against stored grain fungi of *Fusarium* spp. *J Food Sci Technol*, 53(10): 3725-3734.
17. Leslie J. F., Summerell B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory manual*. Blackwell Publishing, Ames, SAD.
18. Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y., Kim, J.C. (2007.): Antifungal Activity of Five Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. *Plant Pathology J*, 23(2): 97-102.
19. Miličević, T. (2020.): Biofungicidi i mogućnosti njihove primijene u suzbijanju fitopatogenih gljiva i pseudogljiva. *Glasnik zaštite bilja*, 43(4): 72-75.
20. Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H. K., Farhadi, N., Hosseini, S. M. A. (2013.): Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(4): 506-512.
21. Nosrati, S., Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Sarpeleh, A., Soflaei-Shahrbabak, M., Soflaei-Shahrbabak, Y. (2011.): Antifungal Activity of Spearmint (*Mentha Spicata* L.) Essential Oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* the Causal Agent of Stem and Crown Rot of Greenhouse Cucumber in Yazd, Iran. IACSIT Press, Singapore.
22. Palfi, M., Vrandečić, K., Popijač, V., Ćosić, J. (2019.): Utjecaj eteričnih ulja na fitopatogene gljive. *Poljoprivreda*, 25(1): 32-40.
23. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., Ćosić, J. (2019.): Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(7): 544-554.

24. Park, J. Y., Kim, S. H., Kim, N. H., Lee, S. W., Jeun, S. C., Hong, J. K. (2017.): Differential Inhibitory Activities of Four Plant Essential Oils on *In Vitro* Growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Causing Fusarium Wilt in Strawberry Plants. *The Plant Pathology Journal*, 33(6): 582-588.
25. Pérez-Sánchez, R., Infante, F., Gálvez, C., Ubera, J.L. (2007.): Fungitoxic Activity Against Phytopathogenic Fungi and the Chemical Composition of *Thymus zygis* Essential Oils. *Food Science and Technology International*, 13(5): 341-347
26. Perczak, A., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K., Juś, K., Gwiazdowski, R., Waśkiewicz, A. (2019.): Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds. *Archives of Microbiology*, 201: 1085-1097.
27. Raveau, R., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020.): Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*, 9, 365.
28. Rosello, J., Sempere, F., Sanz-Berzosa, I., Chiralt, A., Pilar Santamarina, M. (2015.): Antifungal Activity and Potential Use of Essential Oils Against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2): 359-367.
29. Sanap, S.B., Mete, V.B., Jaiswal, K.L., Sanap, S.B., Mulekar, V.G. (2020.): Evaluation of different essential oils against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing wilt in tomato. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(5): 3240-3243.
30. Sharma, N., Tripathi, A. (2006.): Fungitoxicity of the Essential oil *Citrus sinensis* on postharvest pathogens. *World Journal Microbiology Biotechnich* , 22: 587-593.
31. Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.P., Catalan, C. (2006.): Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, 17: 745-752.
32. Soyly, S., Yigitbas, H., Soyly, E. M., Kurt, S. (2007): Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1021-1030.
33. Soyly, E.M., Kurt, S., Soyly, S. (2010.): *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants againts tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3): 183-189.
34. Sumalan, R.M., Alexa, E., Poiana, M.A. (2013.): Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chem. Cent. J.*, 7(1): 32.

35. Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, G., Vale, G., Tacconi, M., Malnati, M. (2007.): In vitro antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44(6): 613- 618.
36. Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E. (2005.): Toksičnost etarskih ulja za *Botrytis cinerea* Pers. in vitro. *Pesticidi i fitomedicina*, 20(2): 109-114.
37. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., Efthimiadou, A. (2013.): Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not Bot Horti Agrobot*, 41(1): 86-92.
38. Wang, D., Zhang, J., Jia, X., Xin, L., Zhai, H. (2019.): Antifungal Effects and Potential Mechanism of Essential Oils on *Colletotrichum gloeosporioides* In Vitro and In Vivo. *Molecules*, 24(18): 3386.
39. Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., Taheri, H. (2008.): Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8):1445-1450.
40. Zygadlo, J. A., Grosso, N. R. (1995): Comparative study on the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(2): 113-118.

8. SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u antifungalnom djelovanju šest eteričnih ulja (limuna, naranče, bora, ružmarina, timijana, anisa) na gljivu *Fusarium culmorum* pri volatilnom i kontaktnom djelovanju. Ulje timijana imalo je najjače antifungalno djelovanje na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* pri svim količinama primjene (10, 30 i 50 μ L) te načinima djelovanja (kontaktno i volatilno). Slijedilo ga je eterično ulje anisa čija je jačina antifungalnog djelovanja značajno rasla s povećanjem količine. Eterično ulje limuna imalo je značajno jače antifungalno djelovanje pri kontaktnom djelovanju. Ulje naranče nije pokazalo inhibitorni učinak na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* neovisno o količini i načinu primjene.

Ključne riječi: *Fusarium culmorum*, eterično ulje, inhibitorno djelovanje, volatilni i kontaktni učinak.

9. SUMMARY

The aim of this study was to determine the differences in the antifungal activity of six essential oils (lemon, orange, pine, rosemary, thyme, anise) on the fungus *Fusarium culmorum* in volatile and contact phase. Thyme oil showed a statistically better inhibitory effect on the growth of *Fusarium culmorum* mycelium at all application amounts (10, 30 and 50 μL) and in contact and volatile phase. It was followed by anise essential oil whose strength of antifungal action increased with increasing amounts of oils. Lemon essential oil had a significantly stronger antifungal effect in the contact phase. Orange oil did not show an inhibitory effect on the growth of *Fusarium culmorum* mycelium regardless of the amount and method of application.

Key words: *Fusarium culmorum*, essential oil, inhibitory action, volatile and contact effect.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Inhibitorno djelovanje šest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* nakon 48 sati od nacjepljivanja gljive.

Tablica 2. Inhibitorno djelovanje šest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* nakon 48 sati od nacjepljivanja gljive.

Tablica 3. Inhibitorno djelovanje šest eteričnih ulja na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* nakon 48 sati od nacjepljivanja gljive.

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Tehnički i krumpir dekstrozni agar (Mia Švitek, 2022.).

Slika 2. Hranjiva podloga spremna za uporabu (Mia Švitek, 2022.).

Slika 3. Postavljanje okruglog sterilnog filter papira u Petrijeve zdjelice u laminaru (Mia Švitek, 2022.).

Slika 4. Kružni isječak čiste kulture gljive *Fusarium culmorum* (Mia Švitek, 2022.).

Slika 5. Doziranje određene količine eteričnog ulja pomoću ručne pipete na filter papir (Mia Švitek, 2022.).

Slika 6. Čista kultura gljive bazirana u Petrijevoj zdjelici spremna za naredna istraživanja (Mia Švitek, 2022.).

Slika 7. Prikaz mjerenja micelija gljive *Fusarium culmorum* (Mia Švitek, 2022.).

Slika 8. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* pri primijeni kontaktnog učinka eteričnog ulja naranče (10 μ L) (Mia Švitek, 2022.).

Slika 9. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* pri primijeni kontaktnog učinka eteričnog ulja timijana (10 μ L) (Mia Švitek, 2022.).

Slika 10. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* pri primijeni volatilnog učinka eteričnog ulja ružmarina (10 μ L) (Mia Švitek, 2022.).

Slika 11. Razvoj micelija gljive *F.culmorum* u kontrolnoj skupini (destilirana voda) (Mia Švitek, 2022.).

Slika 12. Antifungalni učinak eteričnog ulja naranče i timijana nakon 120 sati od postavljanja pokusa (Mia Švitek, 2022.).

Slika 13. Utjecaj eteričnog ulja limuna nakon 120 sati od postavljanja pokusa, kontaktni učinak. (Mia Švitek, 2022.).

Slika 14. Utjecaj eteričnog ulja limuna nakon 120 sati od postavljanja pokusa, volatilni učinak (Mia Švitek, 2022.).

Slika 15. Utjecaj eteričnog ulja limuna nakon 168 sati od postavljanja pokusa, kontaktni (lijevo) i volatilni (desno) učinak (Mia Švitek, 2022.).

Slika 16. Utjecaj 10 μ L eteričnog ulja anisa na porast micelija gljive *Fusarium culmorum*.
(Mia Švitek, 2022.).

Slika 17. Utjecaj 50 μ L eteričnog ulja anisa na porast micelija gljive *Fusarium culmorum*.
(Mia Švitek, 2022.)

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku
Sveučilišni diplomski studiji, Povrćarstvo i cvjećarstvo

Diplomski rad

Usporedba volatilnog i kontaktnog djelovanja eteričnih ulja na porast gljive *Fusarium culmorum*

Mia Švitek

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razlike u antifungalnom djelovanju šest eteričnih ulja (limuna, naranče, bora, ružmarina, timijana, anisa) na gljivu *Fusarium culmorum* pri volatilnom i kontaktnom djelovanju. Ulje timijana imalo je najjače antifungalno djelovanje na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* pri svim količinama primjene (10, 30 i 50 μ L) te načinima djelovanja (kontaktno i volatilno). Slijedilo ga je eterično ulje anisa čija je jačina antifungalnog djelovanja značajno rasla s povećanjem količine. Eterično ulje limuna imalo je značajno jače antifungalno djelovanje pri kontaktnom djelovanju. Ulje naranče nije pokazalo inhibitorni učinak na porast micelija gljive *Fusarium culmorum* neovisno o količini i načinu primjene.

Rad je izrađen: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: Jasenka Ćosić

Broj stranica: 34

Broj slika: 17

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 40

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Fusarium culmorum*, eterično ulje, inhibitorno djelovanje, volatilni i kontaktni učinak.

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Science

University Graduate Studies, Vegetable and flower growing

Comparison of volatile and contact effect of essential oils on growth of *Fusarium culmorum*

Mia Švitek

Abstract: The aim of this study was to determine the differences in the antifungal activity of six essential oils (lemon, orange, pine, rosemary, thyme, anise) on the fungus *Fusarium culmorum* in volatile and contact phase. Thyme oil showed a statistically better inhibitory effect on the growth of *Fusarium culmorum* mycelium at all application amounts (10, 30 and 50 μ L) and in contact and volatile phase. It was followed by anise essential oil whose strength of antifungal action increased with increasing amounts of oils. Lemon essential oil had a significantly stronger antifungal effect in the contact phase. Orange oil did not show an inhibitory effect on the growth of *Fusarium culmorum* mycelium regardless of the amount and method of application.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Science in Osijek

Mentor: Jasenka Ćosić

Number of pages: 34

Number of photos: 17

Number of tables: 3

Number of references: 40

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: *Fusarium culmorum*, essential oil, inhibitory action, volatile and contact effect.

Thesis defended on date:

Reviewers:

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

Thesis deposited at: Library of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petar Svačića 1d.