# Učinak eteričnog ulja ružmarina na gljive Trichoderma viride i Fusarium verticilloides

**Kocijančić, Anja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:502875

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-28**



*Repository / Repozitorij:*

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb








SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

# Učinak eteričnog ulja ružmarina na gljive *Trichoderma viride* i *Fusarium verticillioides*

DIPLOMSKI RAD

**Anja Kocijančić**

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Fitomedicina

# Učinak eteričnog ulja ružmarina na gljive *Trichoderma viride* i *Fusarium verticillioides*

DIPLOMSKI RAD

**Anja Kocijančić**

Mentor: izv. prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Anja Kocijančić**, JMBAG 01780951187 rođena 05.10.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**Učinak eteričnog ulja ružmarina na gljive *Trichoderma viride* i *Fusarium verticillioides***

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

*Potpis studenta / studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice Anje Kocijančić, JMBAG 01780951187, naslova

**Učinak eteričnog ulja ružmarina na gljive *Trichoderma viride* i *Fusarium verticillioides***

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić mentor _____
2. doc. dr. sc. Joško Kaliterna član _____
3. doc. dr. sc. Klaudija Carović-Stanko član _____

**Sažetak**

Diplomskog rada studentice **Anje Kocijančić,** naslova

**Učinak eteričnog ulja ružmarina na gljive *Trichoderma viride* i *Fusarium verticillioides***

Askomicetna gljiva *Fusarium verticillioides* patogen je velikog broja biljnih domaćina kod kojih, osim bolesti na nadzemnom i podzemnom dijelu biljke, uzrokuje trulež sjemena. Veliki problem u ekološkom uzgoju začinskog bilja predstavlja činjenica da nije dopušteno kemijsko tretiranje sjemena, a niti netretirano konvencionalno sjeme. Dopušten je uzgoj samo certificiranog netretiranog sjemena. U novije vrijeme sve se više istražuju biološke mogućnosti zaštite sjemena od fitopatogenih gljiva koje se prenose sjemenom, a koje bi bilo prihvatljivo za ekološku proizvodnju. Uz poznate komercijalizirane bio-fungicide na osnovu *Trichoderma* vrsta sve više se istražuje antimikotska učinkovitost eteričnih biljnih ulja na fitopatogene askomicetne gljive. U provedenom laboratorijskom istraživanju gljive *Fusarium verticillioides* i *Trichoderma viride* su bile testirane na utjecaj eteričnog ulja ružmarina. Za provedbu ovog istraživanja korištena je modificirana metoda dvojnih kultura (metoda dvojnih kultura inače je namijenjena testiranju antagonizma). Rezultati su kvantificirani Indeksom inhibicije te statistički obrađeni analizom varijance. Ovim laboratorijskom pokusom je pokazan slab utjecaj eteričnog ulja ružmarina i na vrstu *F. verticillioides* (17% četvrti dan i 15% sedmi dan) i na vrstu *T. viride* (19% četvrti dan i 15% sedmi dan).

**Ključne riječi**: *Fusarium sp., Trichoderma sp.,* eterično ulje

**Summary**

Of the master's thesis – student **Anja Kocijančić**, entitled

**Influence of rosemary essential oil on *Trichoderma viride* and *Fusarium verticillioides***

The fungi species *Fusarium verticillioides* is a patogen to a large number of plants in which among causing diseases on both above and under ground parts of the plant, also causes decay of seed. The fact that use of conventional seed and chemical treatment of the seed are forbiden in ecological growth of plants presents a big problem in growing spices. Only the certified and chemicaly untreated seed is allowed. Research of options of biological protection against phytopatogens transported by seed is becoming more relevant with time. Among well known and commercialized bio-fungicides based on Trichoderma species, the antimycotic effect of plants essential oils on phytopathogen fungi is becoming a focus of more and more researches. In the laboratory research that was conducted, fungi species *Fusarium verticillioides* and *Trichoderma viride* were tested on the effect of rosemary essential oil. The method of dual cultures (usually used in testing antagonism) was used in the conduction of this research. The results were quantifed with the Index of inhibition and statistically analized with the variance analysis.The results of the research show poor effect of rosemary essential oil on both *F. verticillioides* (17% on day 4 and 15% on day 7) and *T. viride* (19% on day 4 and 15% on day 7).

**Keywords:** *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*, essential oil

**Sadržaj**

1. Uvod…… 1

1.1. Cilj istraživanja…… 2

2. Pregled literature…… 3

2.1. *Trichoderma viride* Pers……...3

2.2. *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg……9

2.3. Eterična ulja……12

3. Materijali i metode……14

4. Rezultati……16

4.1. Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Fusarium verticillioides*……16

4.2. Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Trichoderma viride*……... 18

5. Rasprava…… 21

6. Zaključak……... 23

7. Literatura……24

# 1. Uvod

Uporaba sintetičkih fungicida u borbi protiv fitopatogenih gljiva može doprinijeti povećanju uroda i kvalitete usjeva. Međutim, povećana upotreba fungicida može dovesti do adaptacije gljiva na fungicide što dovodi do rezistentnosti i gubljenja efikasnosti fungicida. Također, povećana upotreba fungicida može dovesti do akumulacije rezidua u hrani iznad dopuštene propisane količine (El-Nahhal 2004). Alternativa sintetičkim fungicidima je primjena različitih spojeva i ekstrakata dobivenih iz biljaka, kao što su eterična ulja i njihove glavne komponente (Ravlić 2011).

Vrste roda *Trichoderma* su filamentozne vrste gljive koje nastanjuju tlo i dio su ekosustava korijena biljaka. Dokazano je da kolonizacija korijena biljke od strane *T. viride* stimulira rast korijena (Chang i sur. 1986; Topolovec-Pintarić 2012, 2011, 2010), ali i povećava usvajanje i uporabu hranjiva (Harman 2000). Neke od *Trichoderma* vrsta sadrže određene biotipove koji se mogu koristiti kao bio-čimbenici u biološkom suzbijanju biljnih patogena. Na svjetskom tržištu bio-pripravaka u klasi bio-fungicida dominiraju pripravci na osnovu raznih *Trichoderma* vrsta, kao i njihovih međusobnih kombinacija. Neki od najvažnijih pripravaka na osnovi *Trichoderma* vrsta jesu: Trichodex i Supresvit (proizvođač Makhteshim, Izrael), Root Pro (proizvođač Mycontrol, Izrael), Promote (proizvođač Borregaard, Danska), Trichopel i Trichoject (proizvođač Agrimm Technologies, Novi Zeland), RootSchield (proizvođač BioWorks, SAD) koji suzbijaju razne vrste gljiva u tlu poput *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. ( Topolovec-Pintarić i sur. 2008).

Rod *Fusarium* jedan je od najpoznatijih fitopatogenih rodova gljiva u svijetu te se vrste ovoga roda smatraju ekonomski najznačajnijima među biljnim patogenima. Pripadnici roda *Fusarium* nalaze se u tlu, biljkama i životinjama širom svijeta. Proizvode veliki broj sekundarnih metabolita tzv. mikotoksina, koji su povezani s biljnim bolestima, kao i s bolestima ljudi i životinja. Obzirom da se radi o stanovniku tla najveće štete čine parazitiranjem korijena i raznih biljnih podzemnih organa uzrokujući njihovu trulež. Također, uzročnici su truleži baze stabljike, sjemena i tek izniklih biljaka u klijalištima.

## 1.1. Cilj istraživanja

Korištenje eteričnih ulja doprinosi razvoju novih sigurnijih oblika biljne zaštite. Iz navedenog razloga je izveden pokus koji istražuje utjecaj eteričnog ulja ružmarina na gljive *Fusarium verticillioides* i *Trichoderma viride* STP. Obzirom da neka novija istraživanja potvrđuju fungistatsko djelovanje ulja ružmarina na *Fusarium* sp. u istraživanje se ulazi s pretpostavkom da će se polučiti slični rezultati i u ovom istraživanju, kako za *F. verticillioides* tako i za *T. viride* STP. Također, izolat *T. viride* STP pokazao se perspektivnim za suzbijanje *Fusarium sp*. te ukoliko STP izolat pokaže otpornost na eterično ulje ružmarina mogao bi se koristiti zajedno s njim za biološko suzbijanje u ekološkoj proizvodnji.

# 2. Pregled literature

## 2.1. *Trichoderma viride* Pers.

Prvi opis gljive naziva *Trichoderma* datira još iz 1794. godine (Persoon 1794), a 1865. godine nastala je prva poveznica sa spolnim stadijem *Hypocrea* vrsta (Tulasne i Tulasne 1865). Prvo spominjanje vrste *Trichoderma viride* datira iz 1796. kada ju Petersoon ubraja u rod *Trichoderma* uz vrste *T. auram, T. nigrescens i T. roseum.* Pripadnost spolnog stadija *Hypcrea rufa* naslućivana je još 1865. godine, ali tek u 20. st. primjena DNA sekvencioniranja omogućila je i potvrdu (Samuels 2004).

Vrsta *T. viride* filamentozna je gljiva, rasprostranjena je diljem svijeta te ju je moguće naći u gotovo svim tipovima tla. Osim slobodna u tlu, prisutna je i u rizosferi i biljnim dijelovima. Korijen koloniziran vrstom *T. viride* ima bolji rast i razvoj te iz tog razloga možemo reći da *T. viride* poboljšava produktivnost usjeva. Vrsta *T. viride* stimulira biljni rast tako što utječe na unos i korištenje hranjivih tvari te jača otpornost na nepovoljne abiotičke čimbenike (Harman 2006). Vrsta *T. viride* stvara bitne promjene u sastavu proteina i metabolizmu biljaka. Zahvaljujući njima, biljke su zaštićene od velikog broja biljnih patogena.

U literaturi *T. viride* moguće je pronaći pod sinonimima : *T. lignorum* (Tode) Hanz, (1871); *Sphaeria rufa* Pers, (1796); *Sphaeria contorta* Schwein, (1832); *Hypocrea contorta* (Schwein) Berk i M.A Curtis, (1875); *Hypocrea rufa* (Pers) Fr., Summa veg. Scand., (1849).

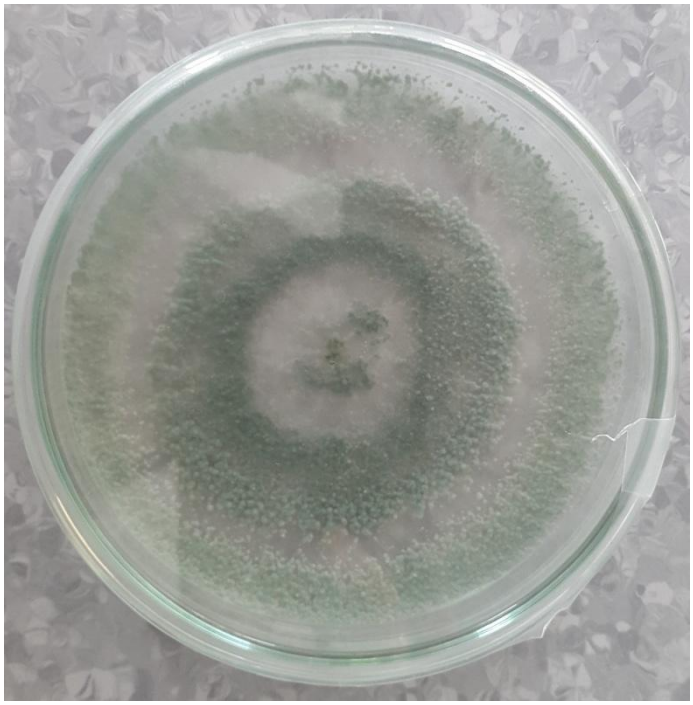
Unutar carstva Gljiva (Fungi) *T. viride* se klasificira prema teleomorfnom peritecijskom stadiju *Hypocrea rufa* (Tablica 1).

**Tablica 1.** Klasifikacija *Trichoderma viride* prema teleomorfu *Hypocrea rufa* (Indeks Fungorum, 2018)

| | | |
|---|---|---|
| CARSTVO | Fungi | Fungi |
| RAZDJEL | Ascomycota | Ascomycota |
| PODRAZDJEL | Pezizomycotina | Pezizomycotina |
| RAZRED | Sordariomycetes | Sordariomycetes |
| RED | Hypocreamycetidae | Hypocreamycetidae |
| PORODICA | Hypocreales | Hypocreales |
| ROD | Hypocreaceae | Hypocreaceae |
| VRSTA | *Trichoderma viride* | *Hypocrea rufa* |

**Izgled micelarne kolonije**

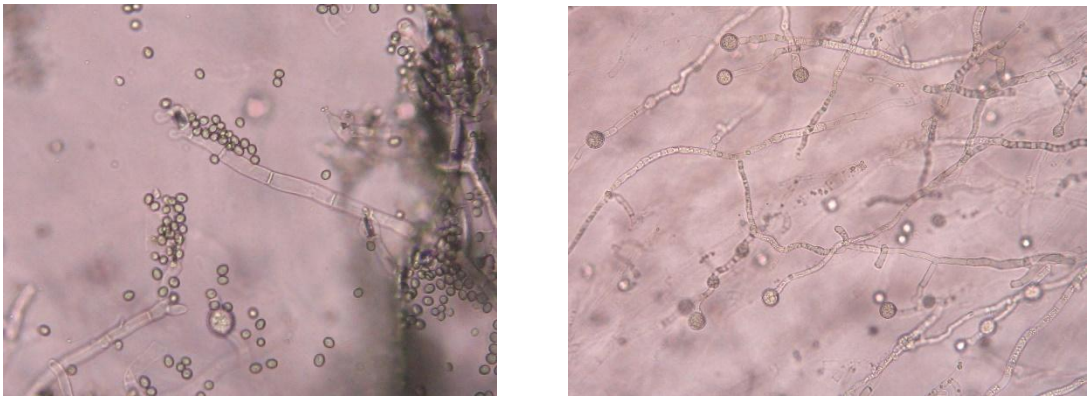
Micelij uzgajan na PDA pri optimalnoj temperaturi rasta od 25 °C ima karakterističnu zelenu boju (Samuels, 2007, Rifai, 1969). Vrsta *T. viride* spada u diuralne vrste jer s režimom izmjene dana i noći (osvjetljenja) u koloniji se formiraju karakteristični koncentrični krugovi zelene i mjestimično žute boje što je znak da je došlo do sporulacije (Slika 1).



**Slika 1.** Micelarna kolonija *Trichoderma viride.*

**Izgled anamorfa – *Trichoderma viride* Pers.**

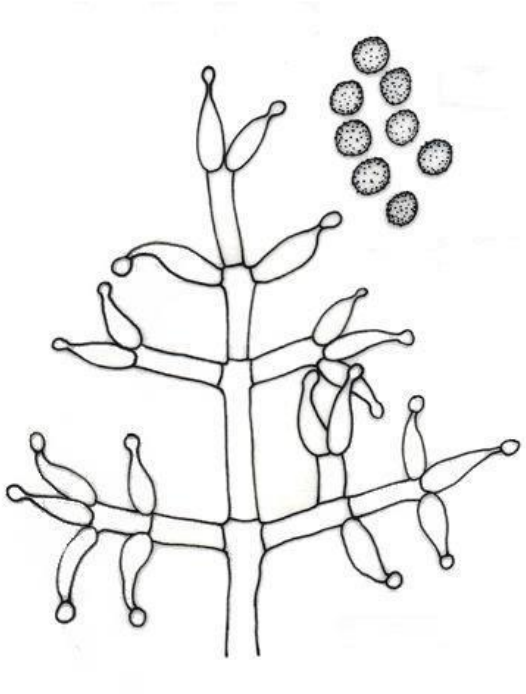
Konidofori su tipični za rod *Trichoderma*, često su u parovima i granaju se nalik na drvo ili piramidu (Bissett, 1990). Imaju do pet ogranaka koji su lagano zakrivljeni i nastaju iz zadebljalih čvorova. Fijalide su 4.0 – 18.2 μm duge, 2 – 3 μm debele stanice, nastaju samostalno ili u skupini od 2 – 3, od oblika nalik boci do cilindričnog oblika, uglavnom su zakrivljene ili vijugave (Jaklitsch, 2006). Konidije su okrugle ili jajolike, ponekad ovalne, maslinasto zelene boje, veličine 2 – 3 μm, a membrana je grubo zrnata (Slika 2). Hlamidospore su najčešće jajolike, prozirne do blijedo žućkaste boje (Slika 2). Rijetko se stvaraju, a ukoliko dođe do njihovog stvaranja, nastanu na vrhovima hifa (rjeđe nastaju unutar hifinih stanica), veličine 5 – 14 μm (Jaklitsch, 2006.).



**Slika 2.** Mikrografija konidofora i konidija *Trichoderma viride* (lijevo)[1]; Mikroskopski prikaz hlamidospora *Trichoderma viride* (desno)[2].

[1] http://ldnissen30269.blogspot.hr/2012/10/lab-6.html

[2] http://ldnissen30269.blogspot.hr/2012/10/lab-6.html

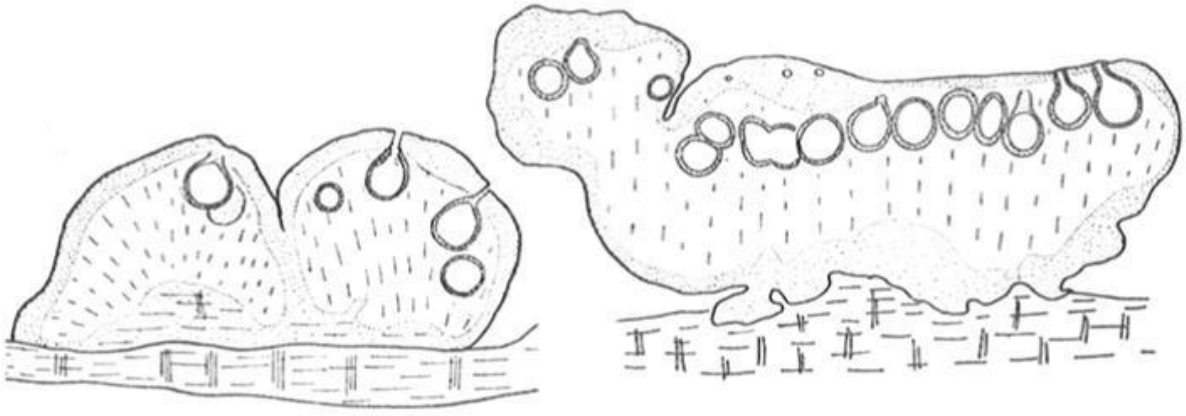


**Slika 3.** Shematski prikaz razgranatog konidiofora i konidija *Trichoderma viride*[3].

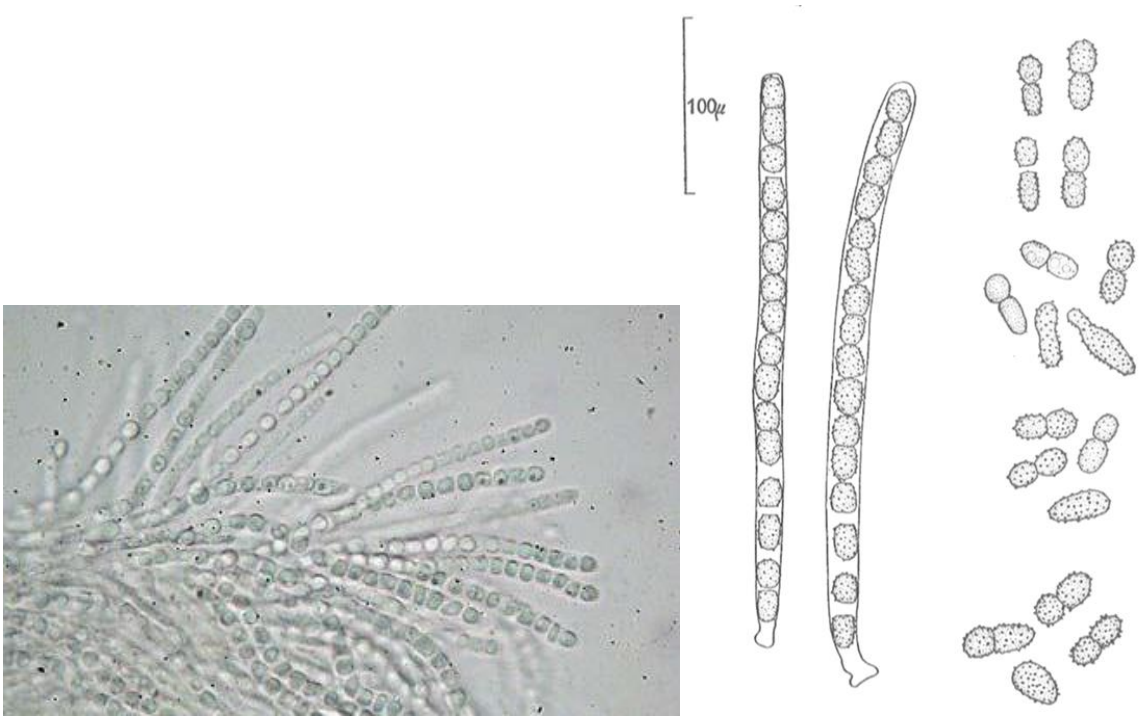
**Izgled teleomorfa – *Hypocrea rufa* (Pers).Fr.**

Stroma je u početku bjelkasta, zatim crveno smeđa i na kraju potamni (Webster, 1964). Poluokruglog je oblika ili oblika jastuka, veličine 5 mm, a ponekad može biti i veća od 1 cm. Unutrašnjost strome ispunjena je hijalnim razgranatim hifama (Slika 4, Slika 6). Plodno tijelo je peritecij koji se nalazi zaštićen u stromi, a njegovi se otvori nalaze na površini strome. Kruškolikog je oblika, 200 µ dugo i 140 – 160 µ široko. Askusi su brojni i cilindrični, veličine 100 – 124 x 6 – 7 µm te imaju vrlo sitnu, neizraženu apikalnu poru za oslobađanje askospora. Askospore su brojne i hijaline te su sastavljene od dvije stanice nejednakih veličina (Slika 5). Gornja stanica je šira i zaobljenija od donje cilindrične stanice (Webster, 1964)

[3]http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/images/plisne/perokresby/Trichoderma_viride_nakres.jpg?lang=en;so=nx



**Slika 4.** Shematski prikaz presjeka stroma *Hypocrea rufa* (Pers.) Fr. (Webster, 1964).




**Slika 5.** Mikrografija askusa *Hypocrea rufa* (Pers.) Fr. (lijevo)[4]; Shematski prikaz askusa i askospora (Webster, 1964) (desno).

[4] http://www.marn.at/pilze-index/rufa_mikro.html



**Slika 6.** Strome teleomorfa *Hypocrea rufa* (Pers.) Fr. (lijevo)[5]; Presjek strome *Hypocrea rufa* (Pers.) Fr. (desno)[6].

[5] http://www.pharmanatur.com/Mycologie/Hypocreaceae/Hypocrea%20rufa.htm

[6] http://www.biolib.cz/en/image/id223290/

## 2.2. *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg

Proučavanje roda *Fusarium* prvi je započeo Link 1809. godine (Snyder i Toussoun, 1965). Vrste iz roda Fusarium mogu biti saprofiti, sekundarni kolonizatori nekrotiziranoga biljnoga tkiva (Leslie i Summerell, 2006) ili endofiti (Yates i sur. 1997), no veliki broj njih su uzročnici biljnih bolesti tzv. fuzarioza. No osim bilja, neke vrste ovoga roda mogu biti patogene za ljude i domaće životinje. Rasprostranjenost, ekologija i značenje velikoga broja *Fusarium* vrsta još uvijek je slabo ili vrlo slabo istražena (Leslie i Summerell 2006) .

Vrsta *Fusarium verticillioides* je rasprostranjena diljem svijeta te napada veliki broj biljnih vrsta, a posebno velike štete nanosi kukuruzu gdje može uzrokovati truljenje stabljike i klica što rezultira značajnim gubitkom prinosa i smanjenjem kakvoće zrna. Na težinu bolesti utječe način i vrijeme infekcije te pravovremeno otkrivanje simptoma bolesti (Leslie i Summerell 2006). Gljiva *F. verticillioides* može ući u biljke kroz sjeme, rane na biljci ili putem infekcije svilaca.

Fitopatogena gljiva *F. verticillioides* može uzrokovati alergije i infekcije kod ljudi oslabljelog imuniteta usljed raka ili HIV-a. Najčešći problemi koje *F. verticillioides* uzrokuje kod ljudi su kožne lezije, infekcije već postojećih rana te je povezan s keratitisom. Gljiva *F. verticillioides* može uzrokovati bolesti kod životinja poput aligatora i slatkovodne ribe (Leslie i Summerell 2006).

Fumonizin najznačajniji je toksin koji proizvodi *F. verticillioides*, a određeni patotipovi gljive mogu proizvesti te mikotoksine u vrlo visokim količinama. Fumonizin B1 je najpoznatiji i najproučavaniji od fumonizina, ali poznati su i drugi derivati. Članovi ove skupine toksina mogu uzrokovati sfingolipidozu kod ljudi i životinja te leukoencefalitis kod konja, pulmonarni edemski sindrom kod svinja, rak jetre te jetrenu i bubrežnu toksičnost kod štakora, neurodegeneraciju miševa i apoptozu u mnogim vrstama stanica. Fumonizini su fitotoksični, ali njihova uloga u biljnim bolestima uzrokovanim *F. verticillioides*, ako uopće postoji, nije jasno definirana (Leslie i Summerell 2006).

**Izgled micelarne kolonije**

Kolonije *F. verticillioides* su brzorastuće s bijelim micelijem koji s vremenom može postati ljubičast. Pigmentacija na PDA varira, može biti bez pigmenta, narančasto sive boje pa sve do sivo ljubičaste, tamno ljubičaste ili gotovo crne boje (Slika 7). Na nekim se izolatima može razviti plavo crni sklerocij koji može biti znak visoke plodnosti (Leslie i Summerell 2006).



**Slika 7.** Micelarna kolonija *Fusarium verticilioides*[7].

**Izgled anamorfa - *Fusarium verticilioides* (Saccardo) Nirenberg**

Vrsta *F. verticillioides* je filamentozna gljiva koje stvara dvije vrste konidija – makrokonidije (31–58 µm × 2.7–3.6 µm) i mikrokonidije (7–10 µm × 2.5–3.2 µm). Gljiva stvara veći broj mikrokonidija, a manji broj makrokonidija (Li i sur. 2006). Makrokonidije stvaraju fialide konidofora koji dolaze skupljeni u nakupinu sporodohija. Sporodohiji su blijedo narančaste boje. Makrokonidije su nježne, tankih stjenka, duge, uske, blago savijene do gotovo ravne i uglavnom paralelne s dorzalnom i ventralnom stranom. Vršna stanica je blago savijena i sužena pri vrhu, dok je bazalna stanica nalik na stopalo ili zarez. Makrokonidije mogu imati

[7] http://www.biomin.net/nl/articles/how-mycotoxins-get-into-aquafeeds-and-why-processing-does-not-prevent-it/

od 3 do 5 septi (Leslie i Summerell 2006). Mikrokonidije se stvaraju u lancima iz vrha monofijalida, specijaliziranih stanica koje stvaraju spore procesom enteroblastične konidiogeneze. Mikrononidije mogu biti ovalnog ili štapićastog oblika te nemaju septe. Vrsta *F. verticillioides* ne proizvodi hlamidospore, ali neki izolati mogu stvarati nabubrene stanice na hifama koje se lako mogu zamijeniti s hlamidosporama ili pseudohlamidosporama (Leslie i Summerell 2006).

**Izgled teleomorfa - *Gibberella moniliformi* Wineland**

Peritecij se u prirodi pojavljuje samo na odumrlom biljnom materijalu. Peritecij je tamnoplave boje, okruglog do stožastog oblika s neravnom površinom (Lević i sur. 2004). Askusi su prozirni, elipsoidnog do štapićastog oblika, s 4 do 8 askospora. Askospore su bezbojne i uglavnom s jednom, a ponekad i s tri septe (Lević i sur. 2004).

## 2.3. Eterična ulja

Eterična ulja su aromatske uljaste hlapljive tekućine, sekundarni metaboliti dobiveni iz biljnog materijala (cvijeća, pupa, sjemena, listova, grana, kore, stabljike, drveta, plodova i korijena) (Burt 2004). Moguće ih je izolirati iz biljke parnom destilacijom, fermentacijom, pritiskom, ekstrakcijom s volatilnim organskim otapalima, itd. Stvaraju se u protoplazmi sekretornih stanica. U biljaka se oslobađaju u obliku kapljica na žljezdanim dlakama ili tubulama ili sekretornim organima. Posebno bogate uljima su biljke iz obitelji *Pinaceae, Zingiberaceae, Lamiaceae, Apiaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Rutaceae* i *Lauraceae* (Zaika 1988).

Zbog toksičnih, kancerogenih, rezidualnih i fitotoksičnih učinaka kemijskih fungicida povećala se potreba za pronalaskom zadovoljavajućih alternativnih sredstva za suzbijanje fitopatogenih gljiva koje nanose štete usjevima namijenjenima ljudskoj prehrani (Gould 1996; Bankole 1997; Skandamis i sur. 2001). Eterična ulja prikladna su zamjena za kemijske fungicide jer se lako dobivaju (ekstrahiraju), ekološki su prihvatljiva, biorazgradiva su, lako se kataboliziraju u okolišu (Zygadlo i Grosso 1995) i ne zaostaju u tlu i vodama (Misra i Pavlostathis 1997; Isman 2006). Eterična ulja posjeduju antibakterijska (Paster i sur. 1990; Hammer i sur. 1999; Elgayyar i sur. 2001; Al-Bayati 2008), antiviralna (Duschatzky i sur. 2005), antifungalna (Moleyar i sur. 1986; Akgül i sur. 1988; Arras i sur., 2001; Elgayyar i sur. 2001; Daferera i sur. 2003), antitoksikogena (Juglal i sur. 2002; Marin i sur. 2003; Selvi i sur. 2003; Velluti i sur. 2003), antiparazitna (Pandey i sur. 2000) i insekticidna svojstva (Konstantopoulou i sur. 1992).

Eterična ulja sastoje se od terpena, fenola, alkohola, ketona, estera, kumarina, laktona i još mnogo različitih spojeva ovisno o kojem se eteričnom ulju radi. Način primjene eteričnog ulja i njegova mogućnost inhibicije patogenog organizma često ovise o spoju koji je najzastupljeniji u njegovu sastavu. Eterična ulja koja sadrže velike fenolne spojeve kao što su timol i eugenol imaju bolji utjecaj na inhibiciju rasta gljiva ako se primjene direktno, dok ulja s hlapljivim spojevima kao što su citral i limonen je bolje primjenjivati na način da se gljiva izloži isparavanju eteričnog ulja. Mnoga istraživanja provode se kako bi se ispitao utjecaj različitih eteričnih ulja na rast i razvoj micelija različitih fitopatogenih gljiva, a sve u cilju pronalaska novih aktivnih tvari koje bi mogle naći primjenu u biljnoj zaštiti (Suhr i Nielsen 2003).

Mehanizam djelovanja eteričnih ulja temelji se pretežno na njihovom utjecaju na staničnu membranu gljiva, odnosno uništavanju njezine strukture što dovodi do smrti stanice, blokiranju izgradnje stanične membrane te inhibiciji klijanja spora, rasta micelija i staničnog disanja (Harris, 2002).

# 3. Materijali i metode

U provedenom laboratorijskom pokusu testiran je utjecaj eteričnog ulja ružmarina na izolat patogene vrste *Fusarium verticillioides* (FV) i na antagonista vrste *Trichoderma viride* (STP). Istraživanje je provedeno 2017. godine u laboratoriju Zavoda za fitopatologiju, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s oba gljivična izolata iz zavodske zbirke. Izolati su čuvani u epruvetama s PDA (Biolife, Italija) odakle se za potrebe istraživanja periodičkim transferom umnažana na PDA u petrijevim zdjelicama promjera 10 cm uz osiguravanje optimalne temperature u klima-komori od 20-21 °C.

Pokus je postavljen po slučajnom bloknom rasporedu s 4 varijante:

1. FV – ulje ružmarina
2. STP - ulje ružmarina
3. Kontrola FV - destilirana voda
4. Kontrola STP - destilirana voda

Svaka varijanta postavljena je u 4 ponavljanja te je korišteno 16 test i 16 kontrolnih petrijevih zdjelica dakle, ukupno su korištene 32 petrijeve zdjelice s PDA supstratom.

Antifungalna sposobnost ulja ružmarina testirana je standardnom „disk-difuzija“ analizom po metodi Saikia i sur. (2001). Korišteno je komercijalno ulje ružmarina proizvođača PTO Ćurin, Hvar.

**Postupak**

U pokusu su korištene četiri dana stare kulture *F. verticillioides* (FV) i *T. viride* (STP) uzgojene na PDA supstratu. Unutar uzgojenih kultura pomoću sterilnog kružnog sjekača izrezani su micelarno – agarski diskovi promjera 5 mm. Diskovi su prenijeti na PDA supstrat u test i kontrolnim petrijevim zdjelicama promjera 10 cm tako da je strana s micelijem postavljena na supstrat i lagano utisnuta. U jednu petrijevku položena su četiri micelarna diska. Micelarni diskovi u svim su varijantama položeni tako da je njihova udaljenost od ruba i sredine petrijevke iznosila 2 cm, a međusobna udaljenost između susjednih micelarnih diskova 3 cm, dok je udaljenost između nasuprotnih iznosila 4,5 cm. U sredinu petrijeve zdjelice postavljen je filtar–disk promjera 5 mm. Eterično ulje ružmarina aplicirano je nerazrijeđeno pomoću mikropipete na filtar–disk u volumenu od 5 µl. U kontrolnim petrijevkama umjesto eteričnog ulja korištena je jednaka količina sterilne destilirane vode. Radi lakše manipulacije nacjepljenim

petrijevkama, tj. sprječavanja kontaminiranja kultura prilikom slučajnog otvaranja, poklopac i zdjelice su omotani parafinskom trakom (Parafilm, Brand GMBH+CO KG, Njemačka). Inkubacija u trajanju od 7 dana odvijala se u klima–komori, pri temperaturi od 21 °C, u mraku.

Očitavanje rezultata vršeno je četvrtog i sedmog, posljednjeg dana inkubacije. Prilikom očitavanja mjeri se minimalni i maksimalni polumjer izraslih micelarnih kolonija, temeljem kojih se izračunava srednja vrijednost rasta gljivičnih izolata u prisutnosti ulja ružmarina, odnosno destilirane vode u kontrolnim petrijevkama. Dobivene srednje vrijednosti porasta micelarnih kolonija omogućavaju izračunavanje Indeksa inhibicije (I) prema sljedećoj formuli (Roys i Ries, 1978):

$$\mathbf{I\ (\%) = (a - b\ /a)\ x\ 100}$$

a – srednja vrijednost radijalnog porasta izolata na kontrolni

b – srednja vrijednost radijalnog porasta izolata u prisutnosti eteričnog ulja

Indeks inhibicije predstavlja rast gljive u prisutnosti eteričnog ulja, odnosno njegova vrijednost predstavlja učinkovitost eteričnog ulja na gljivu. Zadovoljavajući antagonistički utjecaj potvrđuje Indeks inhibicije veći od 50 %.

# 4. Rezultati

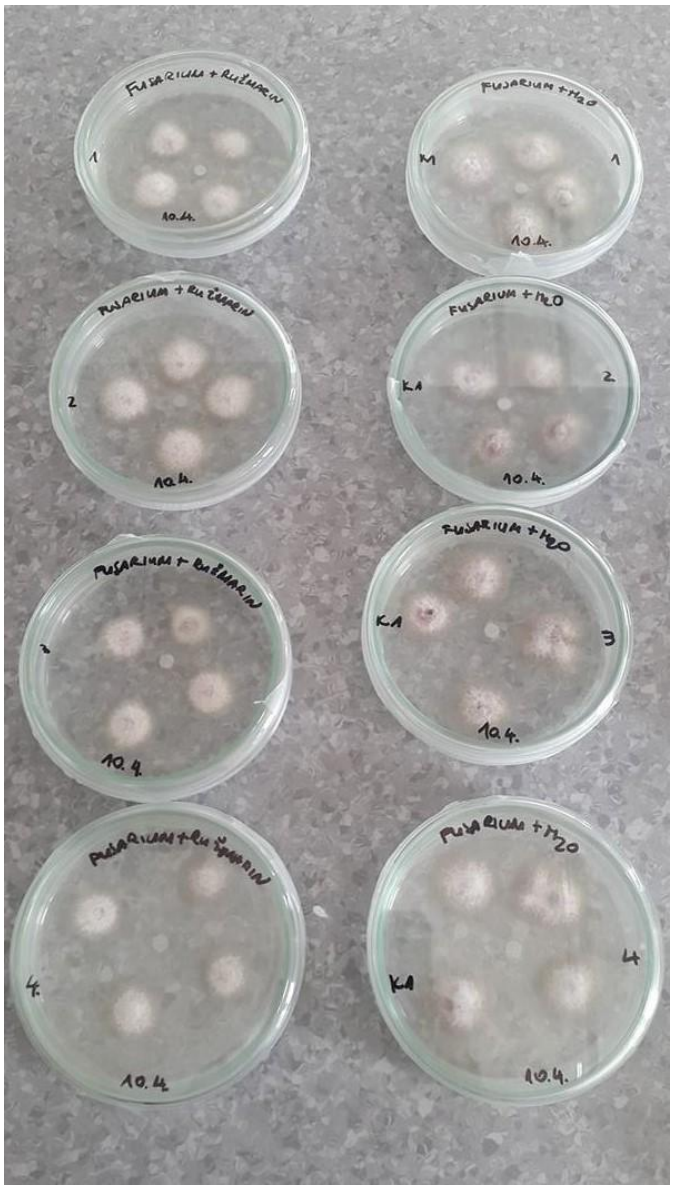
U provedenom laboratorijskom pokusu u kojemu se testirao utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *F. verticillioides* i *T. viride* STP dobiveni su sljedeći rezultati.

## 4.1. Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Fusarium verticillioides*

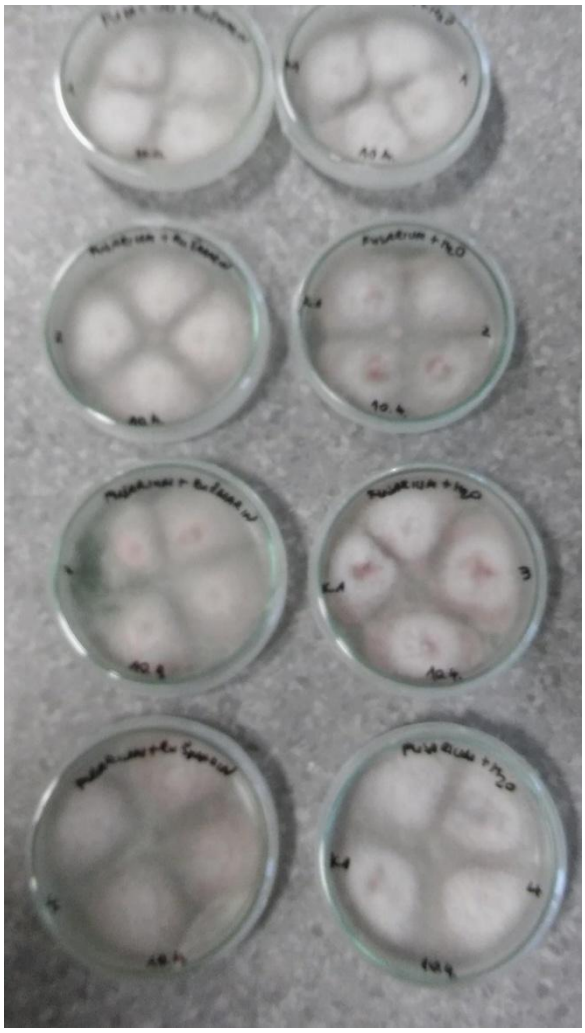
Micelarni porast kolonije *F. verticillioides* u prisutnosti eteričnog ulja ružmarina kretao se u intervalu od 8 mm do 10,13 mm četvrtog dana inkubacije te je srednja vrijednost iznosila 8,65 mm. Sedmog dana micelarni porast kolonije kretao se u intervalu od 8,75 mm do 18,63 mm, a srednja vrijednost je iznosila 15,16 mm (Slika 8). Srednji micelarni porast kolonije *F. verticillioides* u kontrolnoj varijanti kretao se u intervalu od 9,13 mm do 12 mm četvrtog dana očitanja rezultata te je srednja vrijednost iznosila 10,35 mm. Sedmi dan očitanja micelarni porast *F. verticillioides* kretao se u intervalu od 10,38 mm do 20,13 mm, a srednja vrijednost je iznosila 17,75 mm (Slika 9). Temeljem navedenih vrijednosti izračunat je Indeks inhibicije od 17 % za četvrti dan očitanja te 15 % za sedmi dan očitanja (Tablica 2).

**Tablica 2.** Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Fusarium verticillioides.*

| | ***Fusarium verticillioides* – 4. dan** | | ***Fusarium verticillioides* – 7. dan** | |
|---|---|---|---|---|
| **Repeticija** | **Test** | **Kontrola** | **Test** | **Kontrola** |
| **I** | 8,13 | 12 | 15,13 | 20,13 |
| **II** | 10,13 | 9,13 | 18,13 | 19,5 |
| **III** | 8 | 10,13 | 18,63 | 20,38 |
| **IV** | 8,25 | 10,13 | 8,75 | 11 |
| **$\bar{x}$** | 8,63 | 10,35 | 15,16 | 17,75 |
| **I** | **17%$^{ns}$** | | **15%$^{ns}$** | |



**Slika 8.** Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Fusarium verticillioides*, 4. dan inkubacije (lijevo), kontrola (desno).



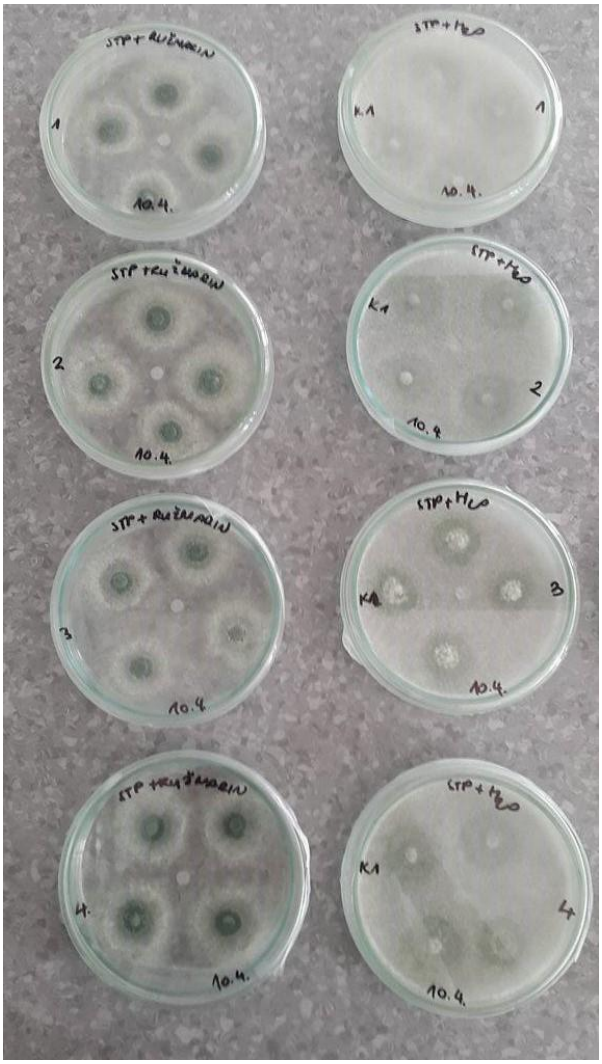
**Slika 9.** Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Fusarium verticillioides,* 7. dan inkubacije (lijevo), kontrola (desno).

## 4.2. Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Trichoderma viride*

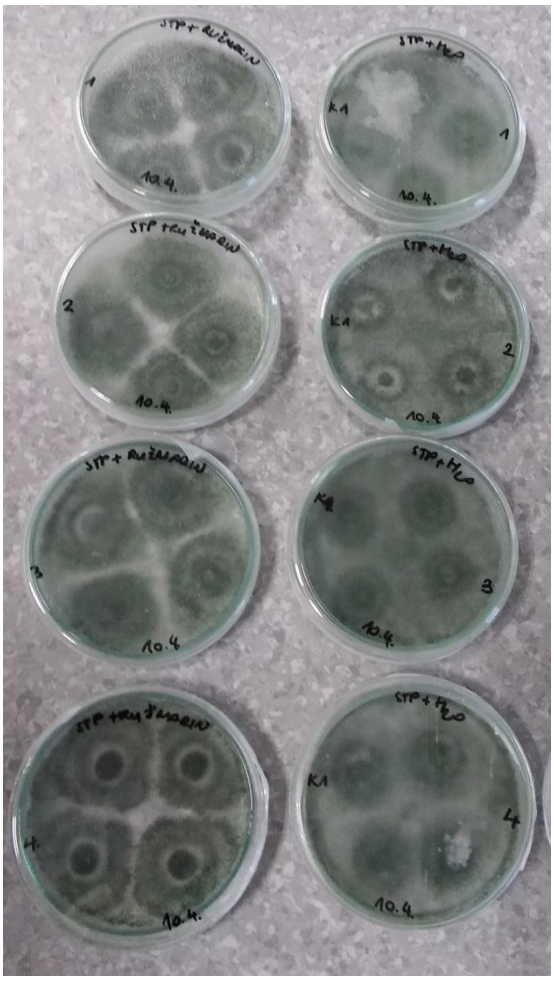
U prisutnosti ulja ružmarina srednji micelarni porast kolonije *T. viride* STP kretao se u intervalu od 13,88 mm do 16,63 mm četvrti dan očitanja, te je srednja vrijednost iznosila 15,76 mm. Sedmi dan očitanja micelarni porast kretao se u intervalu od 19,88 mm do 21,13 mm te je srednja vrijednost iznosila 20,91 mm. U kontrolnoj varijanti srednji micelarni porast kolonije *T. viride* STP kretao se u intervalu od 18 mm do 22,5 mm na četvrti dan inkubacije, te je srednja vrijednost porasta iznosila 19,5 mm. Sedmi dan očitanja micelarni porast iste varijante kretao se u intervalu od 23,13 mm do 27,13 mm te je srednja vrijednost iznosila 24,72 mm. Temeljem navedenih vrijednost je izračunat Indeks inhibicije od 19 % za četvrti dan očitanja te 15 % za sedmi dan očitanja (Tablica 2).

**Tablica 3.** Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Trichoderma viride* STP

| | **STP – 4. dan** | | **STP – 7.dan** | |
|---|---|---|---|---|
| **Repeticija** | **Test** | **Kontrola** | **Test** | **Kontrola** |
| **I** | 13,88 | 18 | 21,13 | 25,5 |
| **II** | 17,38 | 18 | 21,5 | 23,13 |
| **III** | 16,63 | 19,5 | 21,13 | 23,13 |
| **IV** | 15,13 | 22,5 | 19,88 | 27,13 |
| **$\bar{x}$** | 15,76 | 19,5 | 20,91 | 24,72 |
| **I** | **19%$^{ns}$** | | **15%$^{ns}$** | |



**Slika 10.** Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Trichoderma viride*, 4. dan inkubacije (lijevo), kontrola (desno).



**Slika 11.** Utjecaj eteričnog ulja ružmarina na *Trichoderma viride*, 7. dan inkubacije (lijevo), kontrola (desno).

# 5. Rasprava

U suzbijanju fitopatogenih gljiva najviše se koriste sintetički fungicidi, a alternativa su im različiti biljni spojevi i ekstrakti, kao, primjerice, eterična ulja i njihove komponente (Grgić i sur. 2016). Utvrđeno je da više od 1300 biljaka sintetizira spojeve s antimikrobnim djelovanjem (Wilkins i Board 1989). Biljke su izvor velikoga broja biološki aktivnih spojeva, što može biti preduvjet razvoja novih bioloških fungicida (Al-Reza i sur. 2010; Veloz Garcia i sur. 2010). Brojna eterična ulja imaju fungistatični ili čak fungicidni učinak na različite fitopatogene gljive u uvjetima *in vitro*, ali i u *in vivo.* Prednosti korištenja eteričnih ulja očituju se u njihovoj ekološkoj prihvatljivosti i niskoj toksičnosti za konzumente, dok sintetički fungicidi, tj. rezidue istih, mogu biti štetni po okoliš, ali i po zdravlje čovjeka (Grgić i sur. 2016).

Rezultati prikupljeni testiranjem utjecaja eteričnog ulja ružmarina na gljive *F. verticillioides* i *T. viride* STP omogućili su izračun Indeksa inhibicije. Indeks inhibicije četvrtog dana mjerenja za varijantu *F. verticillioides* – ružmarin iznosio je 17%$^{ns}$, a sedmog dana je iznosio 15%$^{ns}$. Iz rezultata je vidljivo kako eterično ulje ružmarina nije pokazalo signifikantan utjecaj na *F. verticillioide* što se podudara s istraživanjem koje su proveli Ćosić i sur. (2010). U navedenom istraživanju testiran je utjecaj jedanaest eteričnih ulja (uključujući ulje ružmarina) na dvanaest fitopatogenih gljiva (uključujući *F. verticillioides*), dokazano je da ulje ružmarina i lavande nemaju nikakav inhibitorna učinak na testirane vrste roda *Fusarium* te da je ulje ružmarina čak stimuliralo rast vrste *Fusarium subglutans*. S druge strane ulje timijana pokazalo je signifikantan inhibitorni učinak na *Fusarium sp.*

U drugoj varijanti pokusa, *T. viride* STP – eterično ulje ružmarina, indeks inhibicije četvrtog dana pokusa iznosio je 19%$^{ns}$ , a sedmog dana pokusa iznosio je 15%$^{ns}$ iz čega je vidljivo da ulje ružmarina opet nije pokazalo značajno djelovanje. Slično istraživanje proveo je Medved (2017) . U tom je istraživanju testiran učinak ulja lavande, kadulje i metvice na vrstu *T. viride* STP u kojemu su sva ulja pokazala fungistatično djelovanje na *T. viride,* s time da je fungistatično djelovanje eteričnih ulja bilo najizraženije četvrtog dana pokusa, dok je sedmog dana pokusa bilo znatno manje izraženo. Smatram da se eterično ulje ružmarina nije pokazalo učinkovitim za ovo istraživanje te mislim da neko drugo ulje pokazalo puno bolju učinkovitost.

S obzirom da je eterično ulje ružmarina pokazalo slab inhibitorni učinak na izolat STP (4. dan 19%$^{ns}$ , 7. dan 15%$^{ns}$ ) postoji mogućnost za daljnja istraživanja. Naime, u novom bi se istraživanju moglo kombinirati ulje ružmarina s izolatom STP i testirati kako njihova kombinacija djeluje na neku drugu vrstu *Fusarium sp*. (s obzirom da ulje ružmarina nije pokazalo inhibitorni učinak na vrstu *F. verticillioides*) Prema već provedenim istraživanjima, izolat STP pokazao se perspektivnim za suzbijanje *Fusarium sp*. tako da bi se u kombinaciji s uljem ružmarina moglo pokazati još efikasnijim.

Također, predlažem da bi se moglo istražiti zašto eterično ulje ružmarina, koje ima fungistatsko djelovanje, nije djelovalo inhibitorno na rast *F. verticillioides*. i *T. viride* STP.

# 6. Zaključak

Na temelju provedenog pokusa doneseni su sljedeći zaključci:

- Ulje ružmarina nije pokazalo zadovoljavajući inhibitorni učinak na vrste *Fusarium verticillioides*
- Ulje ružmarina nije pokazalo zadovoljavajući inhibitorni učinak na vrstu *Trichoderma viride* STP

# 7. Literatura


1. Akgül A., Kıvanç M. (1988). Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne bacteria. International Journal of Food Microbiology 6: 263-268.
2. Arras G., Usai M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of Thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. Journal of Food Protection 64: 1025-1029.
3. Al-Bayati A.F. (2008). Synergistic antibacterial activity between Thymus vulgaris and Pimpinella anisum essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology 116: 403–406.
4. Bankole, S. A. (1997). Effect of essential oils of two Nigerian medical plants (Azadirachta indica and Morinda lucida) on growth and aflatoxin B1 production in maize grain by a toxigenic Aspergillus flavus. Letters in Applied Microbiolgy 24: 190-192.
5. Bissett J., (1991). A revision of the genus Trichoderma, Intrageneric classification Canadian Journal of botany, Vol. 69, 2357-2372
6. Brent K. J., Hollomon D.W. (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph Nr. 2. Brussels: GCPF.
7. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.
8. Chang, Ya- Chun, Chang Yih -Chang, Baker R., Kleifeld O., Cret I., (1986). Increased growth of plants in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease, Vol. 70, 145 – 148
9. Ćavar, L. (2015). Testiranje osjetljivosti *Trichoderma viride* na tebukonazol i TMTD. Završni rad.
10. Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis. Crop Protection 22: 39–44.
11. Duschatzky C.B., Possetto M.L., Talarico L.B., Garcia C.C., Michis F., Almeida N.V., De Lampasona M.P., Schuff C., Damonte E.B. (2005). Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. Antiviral Chemistry & Chemotherapy 16: 247-251.

12. Elgayyar M., Draughon F.A., Golden D.A., Mount J.R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants aginst selected pathogenic and saprophytic microorganisms. Journal of Food Protection 64: 1019-1024.
13. El-Nahhal, Y. (2004) Contamination and Safety Status of Plant Food in Arab Countries. Journal of Applied Science, 4, 411-417.
14. Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobals and inhibitors for food applications. Journal of food protection (supplement): 82-86.
15. Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86: 985–990.
16. Harman, G. E. (2000). Mysths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22, Plant Disease, Vol. 84, 377-393
17. Harman G. E. (2006.) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp., Phytopathology, 96:190 – 194.
18. Harris, R. (2002). Progress with superficial mycoses using essential oils, International Journal of Aromatherapy, 12: 83 – 91.
19. Isman, M. B., Machial, C. M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. U Rai, M., Carpinella, M. C. (Eds.) Naturally occuring bioactive compounds. Advances in phytomedicine, Vol. 3. Elsevier pp. 29-44.
20. Jaklitsch W. M., Samuels G. J., Dodd S. L., Lu B-S. and Druzhinina I. S. (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride:* a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia Studies in mycology 55: 135–177.
21. Juglal S., Govinden R., Odhav B. (2002). Spice oils for the control of co-occuring mycotoxin-producing fungi. Journal of Food Protection 65: 683-687.
22. Konstantopoulou I., Vassilopoulou L., Mavragani-Tsipidou P., Scouras Z.G. (1992). Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on Drosophila auraria. Experientia 48: 616–619.
23. Leslie John F., Summerell Brett A. (2006). The *Fusarium* Laboratory manual
24. Lević J., Trkulja V., Petrović T. (2004). Pojava i kontrola fuzarioza klipa i zrna kukuruza. Glasnik zaštite bilja Vol. 27 No 3
25. Marin S., Velluti A.S., Muñoz A., Ramos A.J., Sanchis V. (2003). Control of fumonisin B1 accumulation in naturally contaminated maize inoculated with Fusarium verticiillioides and Fusarium proliferatum, by cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils. European Food Research and Technology 217: 332-337.

26. Misra, G., Pavlostathis, S. G. (1997). Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil slurry system. Applied Microbiology and Biotechnology 47: 572-277.
27. Moleyar V., Narasimham P. (1986). Antifungal activity of some essentoal oil components. Food Microbiology 3: 331-336
28. Pandey R., Kalra A., Tandon S., Mehrotra N., Singh H.N., Kumar S. (2000). Essential oil compounds as potent source of nematicidal compounds. Journal of Phytopathology 148: 501-502.
29. Paster N, Juven BJ, Shaaya E, Menasherov M, Nitzan R, Weisslowicz H, Ravid U. (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. Letters in Applied Microbiology 11: 33-37.
30. Ravlić M. (2011). Utjecaj eteričnih ulja na porast važnijih fitopatogenih gljiva. Diplomski rad
31. Rifai M.A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers, 116: 1–56
32. Samuels G.J. (2004). *Hypocrea/Trichoderma* species with pachybasium-like conidiophores: teleomorphs for *T. minutisporum* and *T. polysporum*, and their newly discovered relatives. Mycologia 96:310–342
33. Samuels G. J., 2007.: Trichoderma : Systematic, the sexual state and ecology, Phytopathology, Vol. 96, 195 – 206.
34. Selvi A. T., Joseph G.S., Jayaprakasha G. K. (2003). Inhibition of growth and aflatoxin production in Aspergillus flavus by Garcinia indica extract and its antioxidant activity. Food Microbiology 20: 455–460.
35. Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G. J. E. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on E. coli O157: H7. Italian Journal of Food Science 13: 55-65.
36. Snyder W.C., Toussoun T.A (1965). Phytopathology 55: 833-837.
37. Suhr K.I., Nielsen P.V. (2003). Antifungal activity of Essential oils Evaluated by Two Different Application Techniques Against Rye Bread Spoilage Fungi, Journal of Applied Microbiology, 94(4): 665-674
38. Tulasne L-R., Tulasne C. (1865). Selecta fungorum carpologia. Vol. 3. Paris
39. Velluti A., Sanchis V., Ramos A.J., Egido J., Marin S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa essential oils on growth and fumonisin B1 production by Fusarium proliferatum in maize grain. International Journal of Food Microbiology 89: 145-154.

40. Webster J. (1964.) Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* I. Comparison of perfect and imeprfect states of *H. Gelatinosa, H. Rufa* and *Hypocrea sp*.
41. Zaika L.L. (1988). Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety. 9(2):97–118.
42. 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: 113-118.