

Utjecaj ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes

Škof, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:174451>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Marija Škof

7299/BT

Utjecaj ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog projekta: Uspostavni istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc) (voditeljica: doc. dr. sc. Ana Bielen)

Mentor: doc. dr. sc. Ana Bielen

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

Utjecaj ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes

Marija Škof, 0058209517

Sažetak: Patogeni iz skupine Oomycetes napadaju poljoprivredne kulture i uništavaju usjeve, ali i vodene organizme značajne za akvakulturu. Njihovo se suzbijanje vrši uz pomoć pesticida, fungicida i sličnih kemikalija štetnih za čovjeka i okoliš. Cilj ovog rada bio je utvrditi mogu li ekstrakti listova kadulje (*Salvia officinalis*) inhibirati rast micelija oomiceta *Aphanomyces astaci* (patogen riječnih rakova) te *Phytophthora plurivora* i *Phytophthora cactorum* (biljni patogeni). Korišteni su pripravci kadulje ekstrahirani u etanolu, metanolu te istim otapalima razrijeđenima s vodom 1:1. Rast vrsta iz roda *Phytophthora* nije bio značajno inhibiran, vjerojatno jer se uslijed duge koevolucije s biljnim domaćinima kod ovih vrsta razvila otpornost na biljne metabolite. Međutim, vrsta *A. astaci* bila je značajno inhibirana ekstraktima kadulje (rast micelija smanjen za 65 do 70% u odnosu na kontrolu). Rezultati ukazuju na mogućnost primjene ekstrakata kadulje u kontroli patogenih oomiceta u slatkovodnoj akvakulturi.

Ključne riječi: *Aphanomyces*, *Phytophthora*, Oomycetes, kadulja

Rad sadrži: 24 stranica, 8 slika, 1 tablicu, 47 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Ana Bielen

Datum obrane: 16. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biology and Microbial Genetics
Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

The effect of common sage (*Salvia officinalis* L.) on pathogenic Oomycetes

Marija Škof, 0058209517

Abstract: Oomycete pathogens negatively affect agriculture and destroy crops, as well as organisms important in aquaculture. They are controlled by pesticides, fungicides and other chemicals that are harmful for humans and the environment. The object of this study was to determine the effect of sage leaf extracts on the mycelium growth of *Aphanomyces astaci* (freshwater crayfish pathogen), *Phytophthora plurivora* and *Phytophthora cactorum* (plant pathogens). Sage preparations which were used have been extracted in methanol, ethanol and the same solvents diluted with water in 1:1 ratio. The growth of *Phytophthora* species was not significantly inhibited, probably because of the long co-evolution with their hosts which could have made them resistant to host metabolites. On the other hand, *A. astaci* was significantly inhibited with sage extracts: growth was reduced from 65 to 70% in comparison to the control. Results indicate that sage extracts could be used for the control of oomycete pathogens in freshwater aquaculture.

Keywords: *Aphanomyces*, *Phytophthora*, Oomycetes, sage

Thesis contains: 24 pages, 8 figures, 1 table, 47 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Asst. Prof. Ana Bielen, PhD

Defence date: July 16th, 2018

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Oomicete i njihovo štetno djelovanje	2
2.2. Standardne metode kontrole oomicetnih patogena	6
2.3. Razvoj novih metoda kontrole oomicetnih patogena	7
2.4. Ekstrakti ljekovite kadulje (<i>Salvia officinalis</i> L.) kao potencijalno sredstvo kontrole patogenih oomiceta	8
3. Materijali i metode	10
3.1. Ekstrakti listova ljekovite kadulje	10
3.2. Uzgoj mikroorganizama	10
3.2.1 Priprema krute hranjive podloge PDA.....	10
3.2.2 Priprema krute hranjive podloge PG1.....	11
3.3. <i>In vitro</i> testiranje inhibicijskog učinka	11
4. Rezultati	13
5. Rasprava	17
6. Zaključak.....	19
7. Popis literature	20

1. Uvod

Mikroorganizmi iz skupine Oomycetes (vodene plijesni) broje nekoliko stotina vrsta koje nastanjuju vlažna tla ili vodena staništa, živeći saprofitskim ili parazitskim načinom života (Fry i Grünwald, 2010). Biljni i animalni patogeni iz ove skupine uzrokuju velike štete na usjevima, u akvakulturi, ali i u prirodnim populacijama organizama (Leary, 1993). Postojeće metode suzbijanja oomiceta temelje se na upotrebi kemikalija opasnih za okoliš i toksičnih za ljude koji su im izloženi (West, 2006) pa se u posljednje vrijeme sve više istražuju ekološke metode kontrole oomiceta (Dagostin i sur., 2010; Araújo i sur., 2016; Zanzotto i Morroni, 2016; Afzali i Wong, 2017).

Kadulja (*Salvia officinalis* L., porodica Lamiaceae) višegodišnja je samonikla polugrmovita mediteranska biljka koja se od davnina upotrebljava u kulinarstvu i narodnoj medicini. Zbog visokog sadržaja bioaktivnih spojeva ima antitumorsko, protuupalno, antivirusno, antioksidativno, antifungalno i antiseptičko djelovanje (Ghorbani i sur., 2016). Istraživanja antioomicetnog djelovanja kadulje nisu brojna i fokusirana su na biljne patogene, ali pokazuju njezin potencijal u kontroli rasta i širenja oomiceta. Primjerice, Dagostin i suradnici (2010) utvrdili su inhibicijsko djelovanje kadulje na oomicetu *Plasmopara viticola*, uzročnika bolesti peronosporne vinove loze. Schert i suradnici (2010) proučavali su pak utjecaj kadulje na krastavcima inficiranim oomicetom *Pseudoperonospora cubensis* i također pokazali inhibicijski učinak.

Cilj ovog rada bio je po prvi put *in vitro* testom utvrditi mogu li ekstrakti kadulje inhibirati rast micelija odabranih oomiceta *Aphanomyces astaci*, *Phytophthora plurivora* i *Phytophthora cactorum*. Vrsta *A. astaci* patogen je slatkovodnih rakova (Vrålstad i sur., 2011) i u ovom je radu na njoj po prvi put testirano inhibicijsko djelovanje ekstrakata kadulje. Vrste iz roda *Phytophthora* su biljni patogeni sa širokim rasponom domaćina (Jung i sur., 2000). Ranije je utvrđeno inhibitorno djelovanje kadulje na neke vrste iz ovog roda (Bi i sur., 2012; Rodino i sur., 2013; Mazáková i sur., 2017), ali za vrste *P. plurivora* i *P. cactorum* nema ranijih istraživanja.

2. Teorijski dio

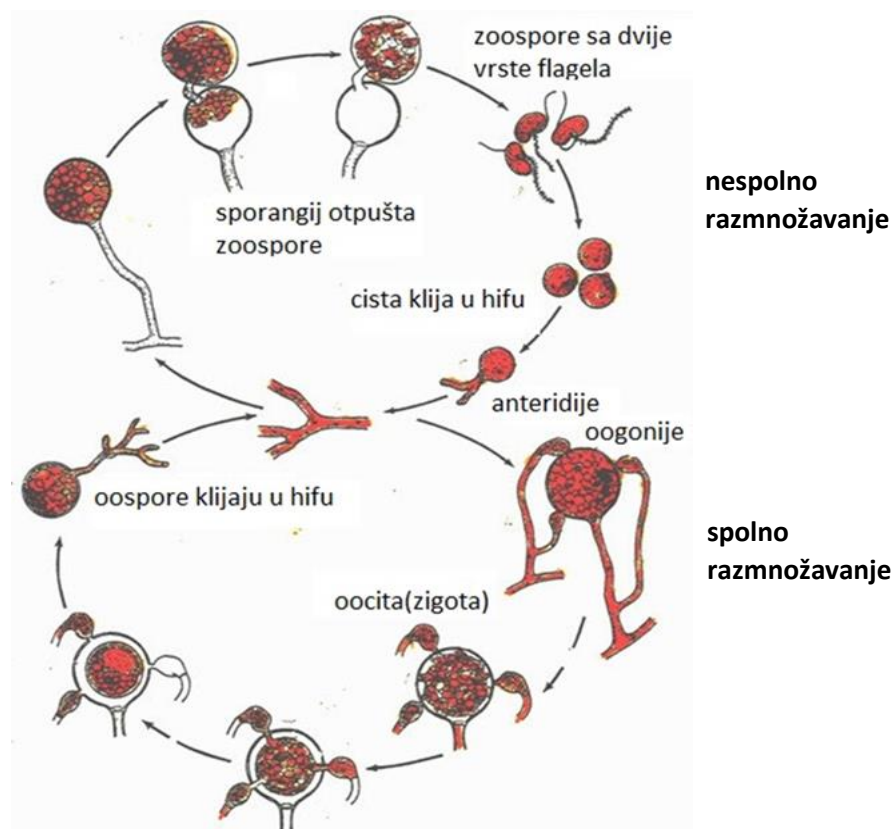
2.1. Oomicete i njihovo štetno djelovanje

Oomicete su eukariotski mikroorganizmi, sastoje od tankih i razgranatih niti koje se nazivaju hife. Dugo su bili svrstavani u carstvo gljiva zbog slične građe tijela i načina hranjenja - apsorpcijom nutrijenata iz okoliša (Rossman i Palm, 2006). Danas je filogenetskim istraživanjima utvrđeno da su kao skupina evolucijski mnogo bliži algama (Fry i Grünwald, 2010). Alge, kao i oomicete, imaju pokretne spore (zoospore) te su većinu svog života diploidi (Schaechter i Kolter, 2009).

Oomicete su prvi put pronađene u vodenom staništu pa se često nazivaju „vodenim plijesnima“. Danas je poznato da se mogu naći gotovo svugdje - u potocima, morima, stajaćicama, kopnu i tlu (Rossman i Palm, 2006). Prema načinu života mogu biti paraziti koji napadaju biljke, životinje i gljive, ali su često i saprofiti, razgrađivači organske tvari (Fry i Grünwald, 2010).

Kod većine oomiceta izmjenjuje se spolno i nesporno razmnožavanje (Slika 1.). Kod nespolnog razmnožavanja hife se diferenciraju u sporangije, strukture nalik vrećicama u kojima nastaje velik broj pokretnih zoospora. Zoospore imaju dva biča i rasprostranjuju se vodom. Nemaju staničnu stijenku pa su jako osjetljive na promjene u okolišu. Kada dospiju na površinu domaćina klijaju u ciste, a zatim u hife. Kada zoospora jednom prijeđe u strukturu ciste dobiva debelu celuloznu staničnu stijenku (Schaechter i Kolter, 2009).

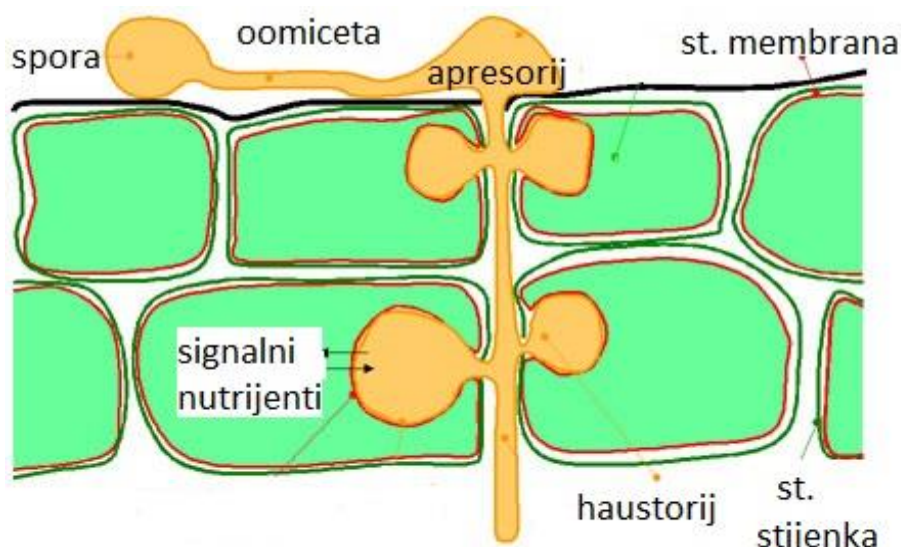
Spolni ciklus započinje tako da stanice na vrhu hife uđu u mejozu te nastaju haploidne gamete. Muške gamete nazivaju se anteridiji, a ženske oogonije (Slika 1.). Spajanjem muških i ženskih gameta nastaje diploidna oocita koja ima zadebljani omotač i puno je otpornija na promjene u okolišu od zoospore. Oocita diobama prelazi u oosporu pa u hifu. Oomicete su većinu života diploidi osim kad tvore haploidne gamete (Schaechter i Kolter, 2009).



Slika 1. Spolni i nespolni ciklus oomiceta (Schaechter i Kolter, 2009).

Većina oomiceta može napasti više od jedne vrste domaćina. Infekcija započinje kontaktom pokretnih zoospora i domaćina. Kod biljnih oomiceta, zoospore ulaze u biljku i na mjestu ulaska nastaje proširenje hife koje se naziva apresorij (Slika 2.). Oomiceta zatim enzimima probija biljnu staničnu stijenku, pritom ne razgrađuje staničnu membranu biljne stanice nego ostaje pričvršćena za nju i takva se struktura naziva haustorij (Slika 2.). Oomiceta je tako u povoljnom položaju jer crpi sve hranjive sastojke te biljne stanice ne dobivaju potrebne hranjive sastojke i odumiru (Schaechter i Kolter, 2009).

Što se tiče oomiceta koje parazitiraju na životinjama, one se najčešće prihvate na površinu domaćina stvarajući pjege na površini ili ulaze kroz rane. Ako se radi o vodenim organizmima, poput pastrve, mogu inficirati i jajašca ribe tako da ih cijela obraste micelij. Kod sisavaca je moguća i infekcija zoosporama preko gastrointestinalnog trakta (Fry i Grünwald, 2010).



Slika 2. Prikaz procesa infekcije kod biljnih oomiceta (Schaechter i Kolter, 2009).

Najčešći biljni patogeni među oomicetima spadaju u rodove *Phytophthora* i *Peronospora* te uzrokuju mnoge poznate biljne bolesti i predstavljaju značajne štetnike na globalnoj razini (Link i sur., 2002). Primjerice, u 19. je stoljeću oomiceta *Phytophthora infestans* uzrokovala glad u Irskoj napadajući usjeve krumpira (Slika 3.a) (Schaechter i Kolter, 2009). Infekcija se očituje po pojavi blijedih listova, a zatim slijedi truljenje gomolja krumpira (Derevnina i sur., 2016). Još jedan problem uzrokovan biljnim oomicetama je truljenje hrasta na Pacifičkoj obali SAD-a uzrokovano oomicetom *Phytophthora ramorum* (Slika 3.b). Ova vrsta osim hrasta napada i drugo drveće. Naglo se proširila na nekoliko priobalnih mjesta u Kaliforniji, uzrokujući pritom velike štete i gubitke (Garbelotto i Hayden, 2012). Što se tiče poljoprivrednih kultura, oomicete napadaju usjeve jagoda, špinata, luka i dr. Problem kod usjeva jest što se veliki broj jedinki iste vrste nalazi na malom geografskom području te se oomicete jako brzo šire od jedne do druge jedinke, što uzrokuje velike štete. Primjer je oomiceta *Plasmopara viticola* koja napada vinovu lozu (Slika 3.c). Infekcija se može prepoznati po pojavi blijedih točkica na listovima (Fry i Grünwald, 2010). Nadalje, u Europi velike probleme uzrokuje i oomiceta *Peronospora belbahrii* koja napada zeljaste biljke i polugrmove kao što su lavanda, bosiljak i kadulja te uzrokuje bolest plamenjaču (Wyenandt i sur., 2015).

U ovom su radu kao modelni organizmi korištena dva biljna patogena oomiceta iz roda *Phytophthora*: *P. plurivora* i *P. cactorum*. Zoospore ovih vrsta pomoću vode u tlu putuju do korijenja domaćina, najčešće drveća. Uvjeti pri kojima se zoospore prenose na biljku su toplo i vlažno tlo, najčešće poslije kiše. U korijenu biljaka nalaze se hranjive tvari i voda koje

oomicete koriste za svoj rast i razvoj i ujedno uzrokuju uništavanje strukture korjenova sustava. *P. plurivora* parazit je drveća, pogotovo hrasta. Uzrokuje propadanje korjenova sustava i u konačnici smrt cijele biljke (Jankowiak i sur., 2014). Vrsta *P. cactorum* napada 160 do 200 različitih vrsta, uključujući drveće i zeljaste biljke. Najveće probleme stvara na plantažama jabuka, jagoda i orhideja. Ulazi u tkivo biljaka i hrani se njihovim nutrijentima uzrokujući trulež. U jabuka napada nadzemni dio i korijen biljke, u orhideja uzrokuje pojavu crnog korijena koji truli, a kod jagoda uzrokuje štetu sadnica tako što napada vriježe (Rivard i sur., 2007).



Slika 3. Infekcija krumpira uzrokovana oomicetom *Phytophthora infestans* (a) (Fry i Grünwald, 2010), hrasta s *Phytophthora ramorum* (b) (Frangioso i Davis, 2012) i vinove loze s *Plasmopara viticola* (c) (Fry i Grünwald, 2010).

Oomicete napadaju i životinje. Neke vrste napadaju sisavce, uključujući čovjeka. Primjer je oomiceta *Pythium insidiosum* koja uzrokuje infekcije konja, mačaka, pasa i ljudi (Fry i Grünwald, 2010). Međutim, domaćin najvećem broju animalnih patogena su razni vodeni organizmi pa oomicete uzrokuju velike štete u akvakulturi i ribarstvu. Ovdje se većinom ubrajaju patogeni rakova i riba iz rodova *Aphanomyces* i *Saprolegnia* (West, 2006). Vrste iz roda *Saprolegnia* uzrokuju saprolegniozu, bolest kod mnogih slatkovodnih riba, primjerice pastrva i lososa. Infekcija se javlja u obliku bijelih i sivih mrlja na tijelu i perajama riba (Slika 4.a).

U ovom je radu kao primjer animalnog patogena iz skupine Oomycetes odabrana vrsta *Aphanomyces astaci* koja uzrokuje račju kugu, bolest deseteronožnih rakova iz porodice Astacidae, i može se naći u gotovo svim slatkovodnim staništima gdje ima njezinog domaćina. Tamne pjege (melanizacije) na kutikuli raka vanjski su simptom bolesti (Slika 4.b). U Europu je dospjela iz Sjeverne Amerike unosom invazivnih sjevernoameričkih vrsta rakova. Sjevernoameričke vrste su otporne i uglavnom ne razvijaju bolest iako im se *A. astaci* nalazi

na površini kutikule. Smatra se da je razlog tome duga koevolucija s patogenom i pojačan imunosni odgovor (Vrålstad i sur., 2011). Nasuprot tome, kada zoospore *A. astaci* dospiju na površinu kutikule zavičajnih europskih rakova, najčešće dođe do prodiranja patogena kroz kutikulu u tijelo raka gdje se hife šire organizmom i uzrokuju smrtonosnu bolest (Vrålstad i sur., 2011).



Slika 4. Infekcija šarana vrstom iz roda *Saprolegnia* (a) (Schaechter i Kolter, 2009), infekcija raka patogenom *A. astaci* (b) (Vrålstad i sur., 2011).

2.2. Standardne metode kontrole oomicetnih patogena

Postojeće metode kontrole biljnih patogenih oomiceta većinom se temelje na korištenju pesticida i fungicida (Cohen i Coffey, 1986; Russell, 2005), a većina tih pripravaka djeluje na zoospore jer su one najosjetljivije (Schaechter i Kolter, 2009). Aktivne tvari čestih fungicida su azoksistrobin, metalaksil M i mandipropamid (Collina i sur., 2016). Međutim, uočeno je da oomicete mogu postati rezistentne na te aktivne tvari. Primjerice, vrsta *Peronospora belbahrii* postala je otporna na aktivnu tvar mefenoksam (Cohen i sur., 2013). Osim toga, tretiranje biljaka fungicidima ostavlja posljedice na okoliš. Aktivne tvari fungicida imaju dugo vrijeme poluraspada pa mogu kruženjem tvari u hranidbenim lancima dospjeti i u hranu za životinje ili ljude (Parrott, 2016). Perzistiraju i u tlu gdje mogu reagirati sa drugim spojevima i činiti još štetnije tvari koje biljke mogu upijati. Potrebno je paziti da se neki fungicidi ne koriste prije kiše jer ih kiša može isprati i mogu doći do podzemnih voda i ugroziti zdravlje ljudi i okoliša. Samo štetno djelovanje fungicida ovisi i o čovjeku. Ljudi koji prskaju biljke fungicidima moraju znati točno vrijeme kada se fungicid koristi, koju količinu fungicida pripremiti i paziti na rok trajanja. Ako se fungicid ne koristi u pravo vrijeme te se urani ili zakasni, ne djeluje na zoospore oomiceta, bolest napreduje te se moraju primjenjivati drastičnije mjere ili veće koncentracije fungicida. Najbolje je fungicid koristiti prije pojave simptoma u periodu kada se očekuje zaraza, pri temperaturama oko 25 °C i relativnoj vlažnosti

zraka iznad 90%. Ako se fungicidom pravilno ne rukuje može uzrokovati zaostatak rasta biljke i pojavu uvenulih listova. Često se fungicidi koriste u kombinaciji s bakrom, čija prevelika koncentracija također nije poželjna (Novak i sur., 2016). Primjeri nekih fungicida:

- Zoxamid je fungicid koji uništava mikrotubularni skelet oomicete *Phytophthora capsici* (Majcen, 2003).
- Cyazofamid inhibira klijanje zoospora kod oomicete *Phytophthora infestans* te djeluje na njihovu pokretljivost (Mitani i sur., 2001).
- Zarilamid inhibira sporulaciju i klijanje zoospora kod vrste *Phytophthora capsici*, a uzrokuje i uništenje mikrotubularnog skeleta te inhibira mitozu (Young i sur., 2001).

Osim upotrebe kemijskih sredstava, za suzbijanje biljnih oomiceta ponekad se koriste i drastične metode poput paljenja drveća u Oregonu gdje se na taj način pokušava suzbiti širenje patogena *P. ramorum* koji napada hrast (Fry i Grünwald, 2010).

Što se tiče oomiceta u vodenom ekosustavu, do 2002. godine se za suzbijanje vrsta iz roda *Saprolegnia* koristilo malahitno zelenilo. Malahitno zelenilo ima kancerogen i toksičan učinak na ljude i životinje te šteti cijelom okolišu pa je njegova upotreba zabranjena 2002. godine (West, 2006). Osim toga, za suzbijanje vodenih oomiceta koriste se tretmani formalinom, natrijevim kloridom i bronopolom. Formalin je također kancerogen, ali još nije zabranjen jer se smatra da će stopa infekcija vodenim oomicetama porasti (van den Berg i sur., 2013).

2.3. Razvoj novih metoda kontrole oomicetnih patogena

Zbog prevelikih štetnih utjecaja postojećih metoda kontrole oomiceta toksičnim kemikalijama sve se više istražuju nove, manje invazivne metode kontrole koje bi imale manje štetnih utjecaja na čovjekovo zdravlje i okoliš (npr. Yusuf i sur., 2005; Dagostin i sur., 2010; Schert i sur., 2010; Bi i sur., 2012). Jedan od primjera je sađenje sadnica bosiljka na većem razmaku čime se povećava strujanje suhog zraka i smanjuje vlažnost koja pogoduje razvoju oomiceta. Na taj način smanjuje se opasnost od zaraze oomicetnim patogenom *Peronospora belbahrii* (Novak i sur., 2016). Osim toga, s obzirom da je poznato da se oomicete razmnožavaju pomoću zoospora u vlažnim uvjetima, usjevi se manje zalijevaju kako bi se smanjila zaraza (Novak i sur., 2016).

Nadalje, isprobavaju se različite hibridne biljke koje bi mogle biti otpornije na djelovanje oomiceta, npr. crveni bosiljak (*Ocimum basilicum purpurescens*) nastao križanjem

bosiljka i divljih vrsta iz roda *Ocimum* (Ben-Naim i sur., 2015). Ipak, utvrđeno je da ni crveni bosiljak prilikom jake infekcije oomicetima ne pokazuje otpornost (Novak i sur., 2016).

U novije se vrijeme tradicionalni pesticidi sve više zamjenjuju biopesticidima koji nisu štetni za okoliš i čovjeka (Parađiković i sur., 2007). Biopesticidi mogu sadržavati korisne mikroorganizme, produkte njihovog metabolizma ili pak biljne ekstrakte i eterična ulja. Produkti mikrobnog metabolizma mogu biti različiti antibiotici i toksini, a biljni ekstrakti sadrže fenole te biljne hormone koji mogu povećati otpornost imunog sustava domaćina (Grahovac i sur., 2009). Tako je pokazano da bakterije iz rodova *Fronidhabitans*, *Aeromonas* i *Pseudomonas* pokazuju inhibicijsko djelovanje na oomicete iz roda *Saprolegnia*, primjerice bakterije iz roda *Fronidhabitans* inhibiraju prihvaćanje oomiceta na jaja lososa (Liu i sur., 2014). Također, utvrđeno je da eterična ulja i ekstrakti nekih biljaka kao što su magnolija (*Magnolia liliiflora*) i rutvica (*Ruta graveolens*) imaju inhibicijsko djelovanje na slatkovodne oomicete iz rodova *Saprolegnia* i *Aphanomyces* (Campbell i sur., 2001). Korišteni su i ekstrakti mnogih biljaka kao što su javanska citronela (*Cymbopogon winterianus*), klasasta metvica (*Mentha spicata*), geranij (*Pelargonium* sp.), klinčić (*Syzygium aromaticum*), timijan (*Thymus vulgaris*), dlakavi dvozub (*Bidens pilosa*), četkovac (*Callistemon citrinus*), trava iva (*Teucrium montanum*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), kadulja (*Salvia officinalis*), bršljan (*Hedera helix*) i pelin (*Artemisia absinthium*) za inhibiciju rasta micelija biljnog patogena *P. infestans* koji uzrokuje bljedilo krumpira (Hubert i sur., 2013; Rodino i sur., 2013; Mazáková i sur., 2017). Nadalje, jedan od prirodnih pripravaka koji se u posljednje vrijeme dosta istražuje kao potencijalna metoda za suzbijanje oomiceta je propolis. Dokazano je njegovo inhibicijsko djelovanje prema biljnim patogenima iz roda *Phytophthora*, *P. infestans* (Yusuf i sur., 2005; Bohinc i sur., 2017; Silva-Castro i sur., 2018), *P. cactorum* i *P. plurivora* (Jurčević, 2018), te životinjskim patogenim oomicetima, npr. patogenu riba *Aphanomyces invadans* (Campbell i sur., 2001).

2.4. Ekstrakti ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) kao potencijalno sredstvo kontrole patogenih oomiceta

U ovom radu fokus je stavljen na ljekovitu kadulju (*Salvia officinalis* L., Slika 5.) kao potencijalno sredstvo za inhibiciju rasta i razmnožavanja patogenih oomiceta. Kadulja je mediteranska biljka, polugrm visine 30 do 60 centimetara. Jakog je aromatičnog mirisa, cvjetovi su tamnoljubičaste boje, a cijela je biljka prekrivena dlačicama. Spojevi izolirani iz kadulje uključuju alkaloide, ugljikohidrate, masne kiseline, derivate glikozida, fenolne spojeve

(flavonoide), poliacetilen, steroide, terpene i voskove. Bioaktivni spojevi kadulje koji su značajni za inhibiciju raznih mikroorganizama, a tako i oomiceta, su flavonoidi, kamfori, tujoni i cineoli. Iz kadulje je izolirano više vrsta flavonoida, a neki od njih su apigenin, hispidulin, rutin itd. Navedene se komponente nalaze u ekstraktima kadulje (flavonoidi) ili pak u eteričnim uljima (Ghorbani i sur., 2017). Kadulja se dugi niz godina upotrebljava u narodnoj medicini i prehrani (Grdiša i sur., 2015). Njezina medicinska svojstva uključuju, između ostalog, antidijabetičko, antioksidativno, protuupalno te antimikrobno djelovanje. Antioksidativno i protuupalno djelovanje pripisuje se flavonoidima, primjerice ružmarinskoj i karnoziskoj kiselini. Nadalje, ekstrakti kadulje inhibiraju rast mnogih bakterija, poput vrsta *Bacillus mycodis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*, *Proteus* sp. i mnogih bakterija otpornih na antibiotike. Antiviralno djelovanje kadulje je, između ostalog, pokazano na primjeru virusa herpes simplex tipa 1 i 2.

U posljednje vrijeme pojavile su se znanstvene studije koje upućuju na to da bi ekstrakti kadulje mogli imati i anti-oomicetno djelovanje. Pokazano je da kadulja može uzrokovati *in vitro* inhibiciju rasta micelija biljnih patogenih oomiceta *Phytophthora capsici* (Bi i sur., 2012) i *Phytophthora infestans* (Rodino i sur., 2013; Mazáková i sur., 2017), iako treba naglasiti da je inhibicija bila relativno slaba u odnosu na druge testirane biljke. Nadalje, postoje dva *in vivo* istraživanja mogućnosti primjene kadulje za kontrolu oomicetnih bolesti biljaka. Dagostin i suradnici (2010) uzgajali su vinovu lozu u plastenicima i na otvorenom. Nakon zaraze oomicetom *Plasmopara viticola*, koja uzrokuje plamenjaču vinove loze, tretirali su biljke ekstraktima kadulje. Zaključili su da kadulja dobro inhibira ovu oomicetu, ali samo djelovanje ovisi o vremenskim uvjetima budući da zbog prevelikih kiša može doći do razrjeđenja ekstrakata i smanjenja njihove učinkovitosti jer je inhibicijski učinak ovisan o koncentraciji. Sličnim problemom bavili su se Scherf i suradnici (2010) kada su infekciju krastavaca oomicetom *Pseudoperonospora cubensis* tretirali ekstraktom kadulje.



Slika 5. Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.) (Stüber, 2004).

3. Materijali i metode

3.1. Ekstrakti listova ljekovite kadulje

Za *in vitro* testiranje inhibicije radijalnog rasta oomiceta korišteni su ekstrakti listova ljekovite kadulje (*Salvia officinalis*), prethodno pripremljeni u Laboratoriju za analitičku kemiju (doc. dr. sc. Maja Dent) klasičnom ekstrakcijom uz refluksiranje na temperaturi vrenja kroz jedan sat. Za ekstrakciju su korištena sljedeća otapala: 96 %-tni etanol (KEFO d.o.o.), 48 %-tni etanol (96 %-tni etanol razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:1), 100 %-tni metanol (J. T. Baker) i 50 %-tni metanol s vodom (100 %-tni metanol razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:1). Koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima bila je 1459,4 mg/L za ekstrakt kadulje u 96%-tnom etanolu; 2487,5 mg/L za ekstrakt kadulje u 46%-tnom etanolu; 1968,8 mg/L za ekstrakt kadulje u 100%-tnom metanolu; 2312,5 mg/L za ekstrakt kadulje u 50%-tnom metanolu.

3.2. Uzgoj mikroorganizama

U istraživanju su korištene patogene oomicete *Aphanomyces astaci* (Schikora 1906), *Phytophthora plurivora* (Jung i Burgess, 2009) i *Phytophthora cactorum* (Lebert i Cohn, 1870). Mikroorganizmi su uzgajani pri 18 °C na dvije vrste krutih hranjivih podloga: PDA (eng. *potato dextrose agar*) i PG1.

3.2.1 Priprema krute hranjive podloge PDA

Podloga PDA korištena je za *in vitro* uzgoj mikroorganizama *P. plurivora* i *P. cactorum*. Podloga sadrži 5 g/L krumpirovog ekstrakta, 20 g/L glukoze i 17 g/L agara (Biolife). Priprema se miješanjem 42 g praškaste smjese i 1000 mL hladne destilirane vode u boci za autoklaviranje. Volumen izmiješane podloge mora biti oko 2/3 boce, boca se začepi, ali ne do kraja kako ne bi došlo do pucanja boce tijekom autoklaviranja. Otopina se sterilizira pri 121 °C kroz 15 minuta te se zatim ohladi na 45 – 50 °C i sterilno izlijeva u Petrijeve zdjelice (oko 25 mL podloge po Petrijevoj zdjelici promjera 90 mm).

3.2.2 Priprema krute hranjive podloge PG1

Kruta hranjiva podloga PG1 korištena je za uzgoj vrste *A. astaci*. Sastoji se od pet različitih otopina:

Otopina 1 sadrži 3 g Bacto peptona (BD Biosciences) otopljenog u 100 mL vode.

Otopina 2 sadrži 6 g D (+) glukoza monohidrata (Sigma) otopljenog u 100 mL vode.

Otopina 3 sadrži:

- 1,70 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 1,45 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 0,20 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma);
- 3,70 g KCl (Sigma);
- 0,55 g dinatrijeve soli etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) (Sigma)

otopljenih u 1000 mL vode.

Otopina 4 je fosfatni pufer čiji je pH = 7,0, a dobije se miješanjem:

- otopine A: 0,067 M (9,5 g/L) Na_2HPO_4 (Sigma)
- otopine B: 0,067 M (9,2 g/L) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma).

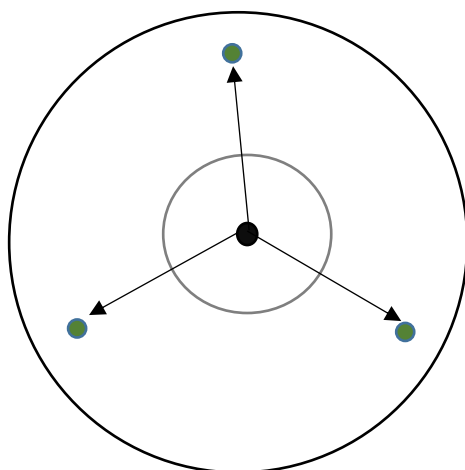
Otopine A i B potrebno je zasebno autoklavirati i nakon autoklavliranja pripremiti otopinu 4 dodatkom 611 mL otopine A u 389 mL otopine B.

Otopina 5 sadrži 12 g agara (Biolife) otopljenog u 600 mL vode.

Svaka otopina se posebno sterilizira u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta, zatim se ohlade na 45 °C i pomiješaju u slijedećim redoslijedom (da ne bi došlo do stvaranja netopljivih čestica): prvo se 100 mL otopine 4 polako dodaje u 600 mL otopine 5, zatim se dodaje 100 mL otopine 3, 100 mL otopine 1 i 100 mL otopine 2. Pripremljena podloga se izlije u Petrijeve zdjelice.

3.3. *In vitro* testiranje inhibicijskog učinka

Schema *in vitro* testiranja djelovanja ekstrakata kadulje na testne mikroorganizme na prikladnim krutim hranjivim podlogama prikazana je na Slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz *in vitro* testiranja inhibicijske aktivnosti ekstrakata kadulje prema patogenim oomicetima. Crni kružić – mjesto početka rasta mikroorganizma. Zeleni kružići – mjesto dodavanja ekstrakata kadulje (po 50 µL). Strelice – linije po kojima je mjereno radijalni rast oomiceta (u mm).

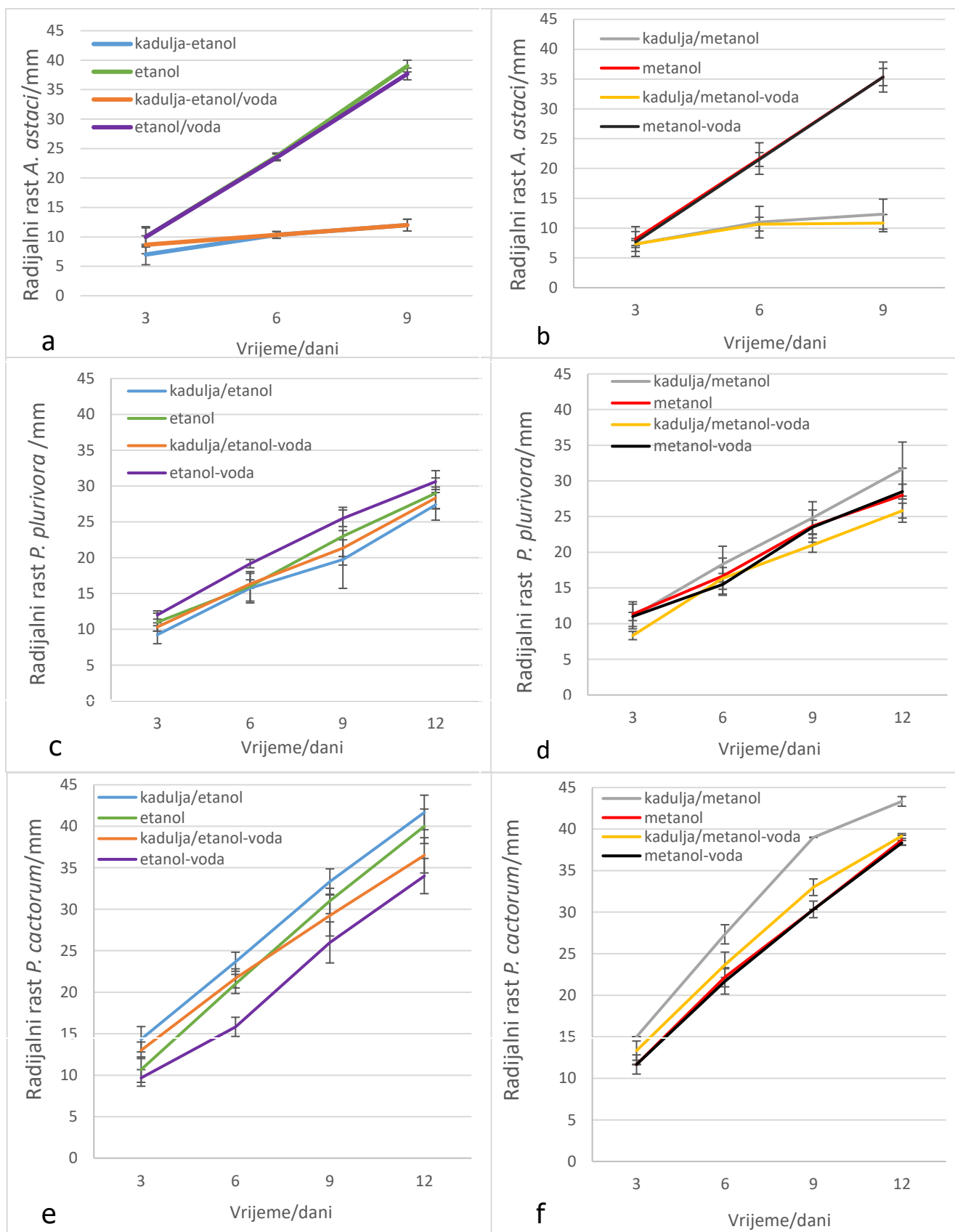
Na sredinu krute hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici prenesen je komadić podloge s micelijem oomiceta (promjer = 5 mm) (crni krug na Slici 4). Uz rub Petrijeve zdjelice načinjena su tri bunara promjera 5 mm, međusobno jednako udaljeni i jednako udaljeni od oomicete (zeleni krugovi na Slici 4). U tri bunara dodano je po 50 µL ekstrakta kadulje, odnosno prikladnih čistih otapala (negativne kontrole). Svaka kombinacija oomicete/ekstrakta kadulje te oomicete/otapala (etanol, etanol-voda, metanol i metanol-voda) testirana je u 3 do 6 ponavljanja. Petrijeve zdjelice s mikroorganizmima inkubirane su 9 dana (*A. astaci*), odnosno 12 dana (*Phytophthora*) pri 18 °C. Radijalni rast micelija oomiceta u mm (tj. rast od središta podloge do vanjskog ruba micelija) izmjeren je svaka tri dana. Nakon provedenih mjerenja uspoređen je rast oomiceta u prisutnosti čistog otapala i ekstrakata kadulje te tako utvrđen intenzitet inhibicijskog djelovanja određenog ekstrakta kadulje prema određenom testiranom mikroorganizmu pri čemu je inhibicijska aktivnost veća što je radijalni rast oomiceta prema ekstraktu kadulje bio sporiji.

4. Rezultati

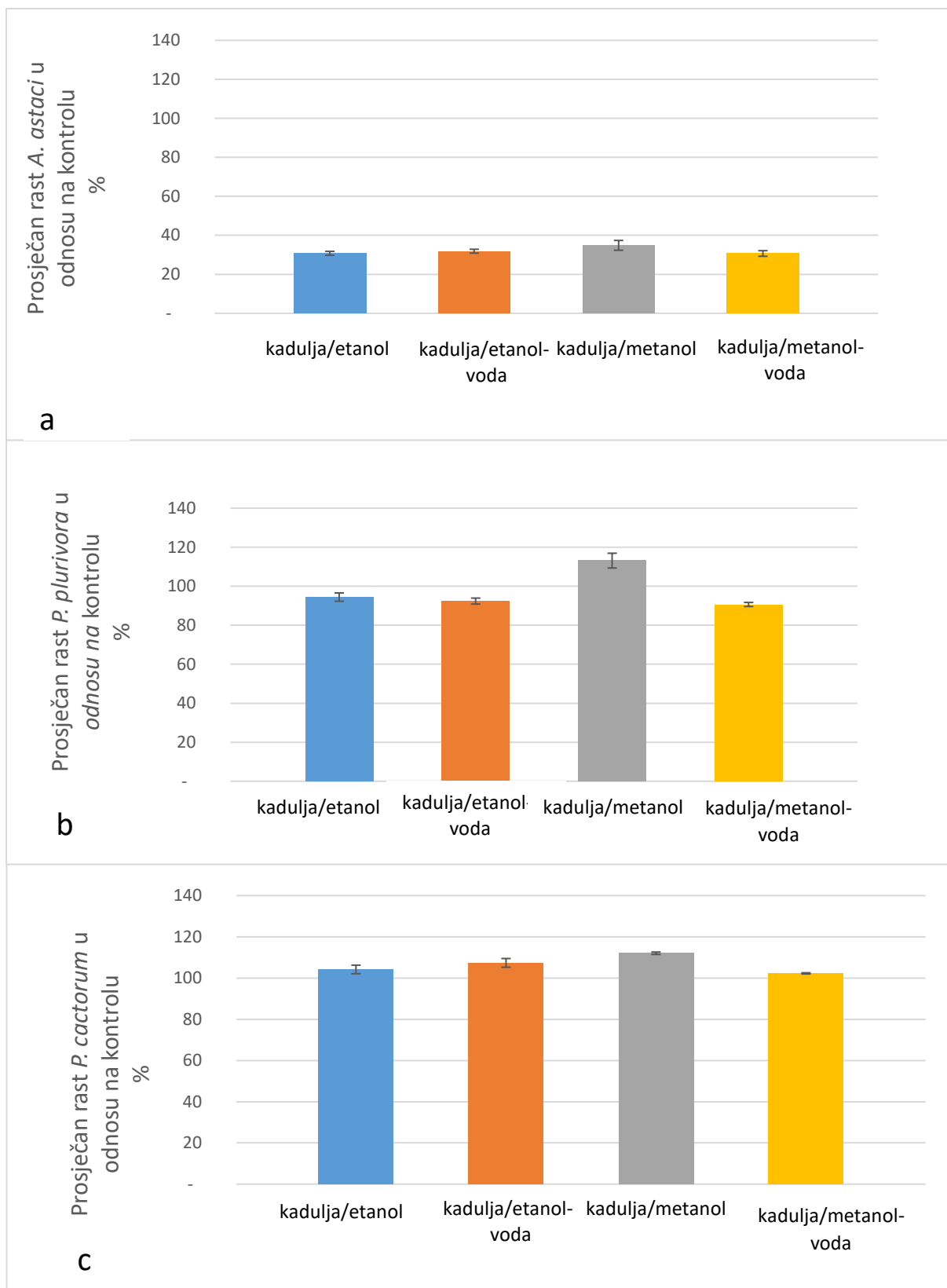
U ovom je radu prvi put istraženo imaju li ekstrakti lista kadulje inhibicijski utjecaj na patogene oomicete *A. astaci*, *P. plurivora* i *P. cactorum*, a rezultati su prikazani na Slikama 7 i 8 te u Tablici 1.

Utvrđeno je da je rast micelija *A. astaci* inhibiran u prisutnosti ekstrakata listova kadulje (Slika 7.a, b; Slika 8.a; Tablica 1). Brzina rasta bila je smanjena u odnosu na pripadajuće kontrole (rast u prisutnosti čistog otapala): nakon 9 dana radijalni rast micelija iznosio je između 10 i 13 mm, odnosno 30 do 35% u odnosu na kontrolu.

Rast micelija biljnih patogena *P. plurivora* i *P. cactorum* nije bio inhibiran ekstraktima kadulje (Slika 7.c - f; Slika 8.b, c; Tablica 1). Brzina radijalnog rasta bila je usporediva sa pripadajućim kontrolama, a u nekim slučajevima čak i nešto veća. Nakon 12 dana radijalni rast oomicete *P. plurivora* iznosio je od 27 do 32 mm (90 do 110% u odnosu na kontrolu), a *P. cactorum* od 36 do 44 mm (102 do 112% u odnosu na kontrolu).

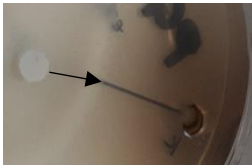
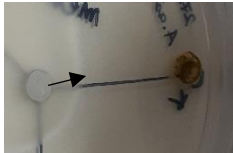
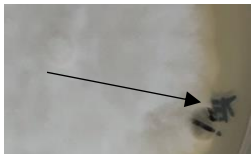
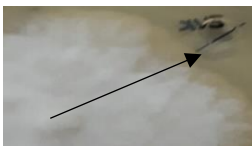
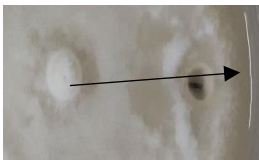


Slika 7. Brzina rasta micelija patogenih oomiceta *A. astaci* (a, b), *P. plurivora* (c, d) i *P. cactorum* (e, f) u prisutnosti ekstrakata listova kadulje u etanolu i etanolu razrijeđenom vodom (a, c, e) te metanolu i metanolu razrijeđenom vodom (b, d, f). Prikazane su i negativne kontrole odnosno rast micelija u prisustvu čistog otapala. Prikazane su srednje vrijednosti 3 – 6 mjerenja $\pm$ standardna devijacija.



Slika 8. Prosječni radijalni rast micelija oomiceta *A. astaci* (a), *P. plurivora* (b) i *P. cactorum* (c) u prisutnosti ekstrakata lista kadulje u odnosu na kontrolu (čisto otapalo). Prikazane su prosječne vrijednosti 3 – 6 mjerenja $\pm$ standardna devijacija nakon 9 (*A. astaci*) odnosno 12 (*P. plurivora*, *P. cactorum*) dana rasta pri 18 °C.

Tablica 1. Radijalni rast micelija (crna strelica) *A. astaci* u nakon 9 dana i vrsta iz roda *Phytophthora* nakon 12 dana u prisutnosti ekstrakata listova kadulje u različitim otapalima.

	Kadulja/etanol	Kadulja/etanol-voda	Kadulja/metanol	Kadulja/metanol-voda
<i>A. astaci</i>				
<i>P. plurivora</i>				
<i>P. cactorum</i>				

5. Rasprava

Ovo je prvo istraživanje u kojem je pokazana različita osjetljivost animalnih i biljnih patogenih oomiceta na ekstrakte listova kadulje. U ranijim istraživanjima demonstrirano je inhibicijsko djelovanje kadulje na neke biljne patogene oomicete *in vitro* (Bi i sur., 2012; Rodino i sur., 2013; Mazáková i sur., 2017) i *in vivo* (Dagostin i sur., 2010; Schert i sur., 2010), dok su za animalne patogene ovo prvi objavljeni podaci.

Rodino i sur. (2013) testirali su inhibicijski učinak ekstrakata kadulje u binarnim otapalima (etanol + destilirana voda) na vrstu *P. infestans* koristeći sličan *in vitro* test kao u ovom radu. Kadulja je pokazala inhibicijski učinak na rast micelija, ali je inhibicija bila slaba u usporedbi s drugim testiranim biljkama (ružmarin, bršljan, čičak i pelin). Nadalje, Mazáková i suradnici (2017) testirali su učinak eteričnih ulja kadulje koncentracije 1 µL/mL na rast micelija *P. infestans*. Kadulja je pokazala slabiju inhibiciju (12%) od većine drugih testiranih eteričnih ulja. Primjerice, eterična ulja javanske citronele (*Cymbopogon winterianus*), liceje (*Litsea cubeba*), metvice (*Mentha spicata*) i geranija (*Pelargonium graveolens*) iste koncentracije (1 µL/mL) uzrokovala su 100%-tnu inhibiciju. U usporedbi s navedenim istraživanjima gdje je u vrlo sličnom eksperimentalnom sustavu pokazano slabo inhibicijsko djelovanje na vrstu *P. infestans* (Rodino i sur., 2013; Mazáková i sur., 2017), u ovom radu nije utvrđen inhibicijski učinak ekstrakata kadulje na vrste *P. plurivora* i *P. cactorum*. Moguće je da su koncentracije ekstrakata kadulje korištene u prethodnim istraživanjima bile veće nego u ovom radu, no direktna usporedba nije moguća zbog nedostatka podataka. Drugo moguće objašnjenje su interspecijske razlike uzrokovane različitim rasponom mogućih domaćina. Iako testni mikroorganizmi spadaju u isti rod, razlikuju se prema domaćinu na kojem parazitiraju. Poznato je da *P. infestans* uglavnom parazitira na krumpiru (Schaechter i Kolter, 2009), dok su *P. plurivora* i *P. cactorum* paraziti drveća i nekih poljoprivrednih kultura (Rivard i sur., 2007). Postoje mnogi primjeri oomiceta koji su dokazani paraziti kadulje i drugih biljaka iz porodice Lamiaceae. Primjerice, *Peronospora swinglei* uzrokuje globalno važnu bolest plamenjaču kadulje (Choi i sur., 2009), a *Phytophthora cryptogea* uzrokuje truljenje njezinog korijena (Garibaldi i sur., 2015). Nadalje, na bosiljku (*Ocimum basilicum*, Lamiaceae) je utvrđeno više vrsta iz roda *Peronospora*, poput vrste *Peronospora lamii* (Belbahri i sur., 2005), a poznato je da vrsta *Phytophthora cactorum* može parazitirati na lavandi (*Lavandula* sp.) koja također spada u porodicu Lamiaceae kao i kadulja (Cline i sur., 2008). Može se pretpostaviti da su paraziti kadulje zahvaljujući dugoj koevoluciji s domaćinom stekli imunost na njezine metabolite. Iako u literaturi za sada nema podataka da ovdje istraživane vrste mogu parazitirati na kadulji, s obzirom na ovdje demonstriranu otpornost na ekstrakte njezinih listova, širok

raspon poznatih domaćina uključujući i one iz porodice Lamiaceae (Rivard, 2007; Cline i sur., 2008) te evolucijsku srodnost s poznatim parazitom kadulje *P. cryptotogea* (Jung i Burgess, 2009), može se pretpostaviti da su vrste *P. plurivora* i *P. cactorum* također potencijalni paraziti ove biljke (a *P. infestans* vjerojatno nije).

U ovom je istraživanju prvi puta *in vitro* demonstriran inhibicijski učinak ekstrakata kadulje na oomicetnog patogena slatkovodnih rakova, vrstu *A. astaci*. Patogeni iz skupine Oomycetes, uključujući rodove *Pythium*, *Saprolegnia* i *Aphanomyces*, čine velike štete u slatkovodnoj akvakulturi na globalnoj razini (Fry i Grünwald, 2010). Primjena biljnih ekstrakata u akvakulturi novo je područje istraživanja zbog velikih prednosti ovakvih tretmana u odnosu na standardnu upotrebu hormona, antibiotika, vitamina i antimikrobnih kemijskih sredstava (De la Cruz-Cervantes i sur., 2018). Ovdje demonstrirano antioomicetno djelovanje kadulje na vrstu *A. astaci*, ali i raspon ranije pokazanih antimikrobnih, antioksidativnih i drugih aktivnosti (Ghorbani i sur., 2017) ukazuju na moguću primjenu kadulje u akvakulturi. De la Cruz-Cervantes i suradnici (2018) su demonstrirali moguću upotrebu propolisa kao dodatka ribljoj hrani kako bi se smanjila pojavnost bolesti riba i poboljšao njihov rast. Slično tome, ekstrakti kadulje bi se mogli uklopiti u riblju hranu i tako koristiti u borbi protiv infekcija oomicetima, ali i bakterijskim i virusnim patogenima. Na kraju treba naglasiti da prije *in vivo* testiranja primjene ekstrakata kadulje u akvakulturi, treba testirati njezin inhibicijski učinak i na drugim oomicetama bitnima u akvakulturi, kao što su vrste iz roda *Saprolegnia* (Hatai i Hoshiai, 1992). Osim toga, ekstrakti bi se trebali testirati, osim na miceliju, i na drugim fazama životnog ciklusa oomiceta, kao što su zoospore. Poznato je da su zoospore osjetljivije na djelovanje vanjskih faktora od micelija, što su dokazali i Ziogasa i Davidse (1987) pokazavši kako je za inhibiciju zoospora potrebno puno manje fungicida cymoxanila nego za inhibiciju micelija.

6. Zaključak

U ovom je radu prvi put istraživano inhibicijsko djelovanje ekstrakata kadulje na patogene oomicete *A. astaci*, *P. plurivora* i *P. cactorum*. Rezultati su pokazali sljedeće:

- Kadulja je imala snažan inhibicijski učinak na rast micelija vrste *Aphanomyces astaci* (rast smanjen za 70% u odnosu na kontrolu). Ovo je prva demonstracija inhibicijskog djelovanja kadulje na animalne patogene iz skupine Oomycetes.
- Na vrste iz roda *Phytophthora* ekstrakti kadulje nisu djelovali inhibicijski, naprotiv neki su ekstrakti čak utjecali blago poticajno na rast micelija. Ovo ukazuje na razvoj otpornosti na metabolite kadulje zbog duge koevolucije ovih biljnih patogena s metabolitima prisutnima u biljkama domaćinima.

7. Popis literature

- Afzali S. F., Wong W. L. (2017) *In vitro* screening of *Sonneratia alba* extract against the oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Iranian Journal of Fisheries Science*. **4**: 1333 - 1340.
- Araújo M. J. A. M., de Moraes Gimenes Bosco S., Sforcin J. M. (2016) *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Brazilian Journal of Microbiology*. **47**: 863 – 869.
- Belbahri L., Calmin G., Pawlowski J., Lefort F. (2005) Phylogenetic analysis and Real Time PCR detection of a presumably undescribed *Peronospora* species on sweet basil and sage. *Mycological Research*. **109**: 1276 - 1287.
- Ben-Naim Y., Falach L., Cohen Y. (2015). Resistance against basil downy mildew in *Ocimum species*. *Phytopathology*. **105**: 778 - 785.
- Bi, Y. L., Wang B., Huang B. H., Zhanng W. T., Zhang Y. H. (2011). Antifungal actyivity of botanical extracts against *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*. *Journal of Agricultural Science and Technology* **12**: 862 – 864.
- Bohinc T., Vučajnk F., Plut A., Trdan S. (2017) Field testing of fungicidal efficacy of propolis on early blight of potato (*Alternaria solani*) and late blight of potato (*Phytophthora infestans*); <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183159802>> Pristupljeno 30. lipnja 2018.
- Campbell R. E., Lilley J. H., Taukhid I., dan Perikanan B. K., Panyawachira V., Kanchanakhan S. (2001) *In vitro* screening of novel treatments for *Aphanomyces invadans*. *Aquaculture Research*. **32**: 223 – 233.
- Choi Y. J., Shin H. D., Thines M. (2009) Two novel *Peronospora* species are associated with recent reports of downy mildew on sages. *Mycological Research*. **113**: 1340 - 1350.
- Cline E. T., Farr D. F., Rossman A. Y. (2008) A synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress*. **10**: 1 - 318.
- Cohen Y., Coffey M. D. (1986) Systemic fungicides and the control of oomycetes. *Annual review of phytopathology*. **24**: 311 - 338.
- Cohen Y., Vaknin M., Ben-Naim Y., Rubin A. E. (2013) Light suppresses sporulation and epidemics of *Peronospora belbahrii*. *PloS one*. **8**: 81282.

- Dagostin S., Formolo T., Giovannini O., Pertot I., Schmitt A. (2010) *Salvia officinalis* extract can protect grapevine against *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*. **94**: 575 – 580.
- Derevnina L., Petre B., Kellner R., Dagdas Y. F., Sarowar M. N., Giannakopoulou A., De la Concepcion J. C., Chaparro-Garcia A., Pennington H. G., van West P., Kamoun S. (2016) Emerging oomycete threats to plants and animals. *The Royal Society Publishing*. **371**.
- Fry W. E., Grünwald N. J. (2010) Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>> Pristupljeno 7. lipnja 2018.
- Garbelotto M., Hayden K. J. (2012) Sudden oak death: interactions of the exotic oomycete *Phytophthora ramorum* with naïve North American hosts. *Eukaryotic Cell*. **11**: 23 - 1313.
- Garibaldi A., Bertetti D., Pensa P., Ortu G., Gullino M. L. (2015) *Phytophthora cryptoea* on common sage (*Salvia officinalis* L.) in Italy. *Plant Disease*. **99**: 161.
- Ghorbani A., Esmaeilzadeh E. (2016) Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. **4**: 433 - 440.
- Grahovac M., Indić D., Lazić S., Vuković S. (2009.) Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenju poljoprivredi. *Pesticides & phytomedicine*. **24**: 245 - 258 .
- Grdiša M., Jug-Dujaković M., Lončarić M., Carović-Stanko K., Ninčević T., Liber Z., Šatović Z. (2015) Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): a review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. **80**: 69 - 78.
- Jung I., Burgess T. I. (2009) Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. *Persoonia*. **22**: 95 – 110.
- Hatai K., Hoshiai G. (1992) Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* coker. *Journal of Wildlife Diseases*. **28**: 532 - 536.
- Hubert G. Y. J., Julianne N., Charles D. D., Daniel F., Sandrine P. T., Romain F. F., Henry A. Z. P. (2013) Antifungal potential and phytochemical analysis of extracts from seven Cameroonian plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **2**: 140 - 154.
- Jankowiak R., Stepniewska H., Bilanski P., Kolarik M. (2014) Occurrence of *Phytophthora plurivora* and other *Phytophthora* species in oak forests of southern Poland

and their association with site conditions and the health status of trees, *Folia Microbiologica*. **59**: 531 - 542.

Jung I., Burgess T. I. (2009) Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. *Persoonia*. **22**: 95 – 110.

Jurčević M. (2018) Inhibicijski učinak propolisa na patogene mikroorganizme iz skupine Oomycetes. Završni rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Link H., Powelson V., Johnson K. B. (2002) Oomycetes. The Plant Health Instructor; <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/Oomycetes.aspx>> Pristupljeno 27. lipnja 2018.

Liu Y., De Bruijn I., Jack A. L., Drynan K., Van Den Berg A. H., Thoen E., Van Der Voort M. (2014) Deciphering microbial landscapes of fish eggs to mitigate emerging diseases. *The ISME journal*. **8**: 2002 - 2014.

Louws F. J., Rivard C. L., Kubota C. (2010) Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Scientia Horticulturae*. **127**: 127 - 146.

Majcen D. (2003) ELECTISÒ 76 WG-new fungicide on the basis of novel compound zoxamide and mancozeb provides efficient control of potato late blight and downy mildew of grape. In *6th Slovenian Conference on Plant Protection (6. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin)*.

Mascheretti S., Croucher P. J. P., Vettraino A., Prospero S., Garbelotto M. (2008) Reconstruction of the sudden oak death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology*. **17**: 2755 - 2768.

Mitani S., Sugimoto K., Hayashi H., Takii Y., Ohshima T., Matsuo N. (2003) Effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin on Chinese cabbage. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. **59**: 287 - 293.

Mueller-Riebau F., Berger B., Yegen O. (1995) Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**: 2262 - 2266.

Nanni I. M., Pirondi A., Mancini D., Stammel G., Gold R., Ferri I., Collina M. (2016) Differences in the efficacy of carboxylic acid amide fungicides against less sensitive strains of *Plasmopara viticola*. *Pest management science*. **72**: 1537 - 1539.

- Novak A., Sever Z., Ivić D., Čajkulić A. M. (2016) Plamenjača bosiljka (*Peronospora belbahrii*) – destruktivna bolest u proizvodnji bosiljka. *Glasilo biljne zaštite*. **16**: 544 - 547.
- Parađiković N., Vinković T., Iljkić D. (2007.) Hydroponic Cultivation and Biological Protection of Pepper (*Capsicum annum* L.). *Acta Agriculturae Serbica*. **12**: 19 - 24.
- Rodino S., Dobre A., Butu M. (2013) Screening of some indigenous plants for identifying the inhibitory effect against *Phytophthora infestans*. *Vasile Goldis University Press*. **23**: 483 - 486.
- Rossman A.Y., Palm M.E. (2006) Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true Fungi? *American Phytopathological Society*. **17**: 217 - 219.
- Russell P. E. (2005) A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*. **143**: 11 - 25.
- Schaechter M. and Kolter R. (2009) Five Questions About Oomycetes; <<http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/fiv-1.html>> Pristupljeno 21. lipnja 2018.
- Scherf A., Schuster C., Marx P., Gärber U., Konstantinidou-Doltsinis S., Schmitt A. (2010) Control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of greenhouse grown cucumbers with alternative biological agents. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. **75**: 54 - 541.
- Silvia-Castro I. S., García J. M., Díez J. J., Pacheco J. A. F., Gil J. M., Ramos P. M. (2018). Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European Journal of Plant Pathology*. **150**: 401 - 411.
- Van den Berg A. H., McLaggan D., Diéguez-Urbeondo J., Van West P. (2013) The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biology Reviews*. **27**: 33 - 42.
- Vrålstad T., Johnsen S. I., Taugbøl T. (2011) NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Aphanomyces astaci*; <https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/a/aphanomyces-astaci/aphanomyces_astaci.pdf> Pristupljeno 11. lipnja 2018.
- West P. (2006) *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*. **20**: 99 - 104.

Wyenandt C. A., Simon J. E., Pyne R. M., Homa K., McGrath M. T., Zhang S., Raid R. N., Ma L. J., Wick R., Guo L., Madeiras A. (2015) Basil Downy Mildew (*Peronospora belbahrii*): Discoveries and Challenges Relative to Its Control. *Phytopathology*. **105**: 94 - 885.

Young D. H., Spiewak S. L., Slawecki R. A. (2001) Laboratory studies to assess the risk of development of resistance to zoxamide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. **57**: 1081 - 1087.

Yusuf Y., Durdane Y., Servet A. (2005) Antifungal Activity of Turkish Propolis Against *Phytophthora* Species. *Plant Pathology Journal*. **4**: 58 - 60.

Zanzotto A., Morroni M. (2016) Major Biocontrol Studies and Measures against Fungal and Oomycete Pathogens of Grapevine;
<https://cab.presswarehouse.com/sites/stylus/resrcs/chapters/1780647123_1stChap.pdf>Pri
stupljeno 17. lipnja 2018.

Ziogas B. N., Davidse L. C. (1987) Studies on the mechanism of action of cymoxanil in *Phytophthora infestans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **29**: 89 - 96.

Marija Škof
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Zagreb, 17.07.2018

Fakultetskom vijeću

putem Odbora za znanost PBF-a i
Zavoda za biokemijsko inženjerstvo

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da su svi moji radovi na koje se pozivam u postupku izbora u zvanje odnosno na radno mjesto izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istih radova nisam koristio drugim izvorima osim onih koji su u njima navedeni.

Marija Škof

