

Utjecaj eteričnih ulja na porast *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

Sažetak

Istraživan je utjecaj jedanaest vrsta eteričnih ulja (anis, metvica, gorka naranča, ružmarin, cimet, kim, bor, kadulja, timijan, klinčićevac, lavanda) na porast micelija *Macrophomina phaseolina*. Nakon tri dana eterična ulja timijana, metvice, anisa, cimeta i klinčićevca imala su statistički značajano fungistatično djelovanje, dok su ostala eterična ulja u odnosu na kontrolu imala stimulirajući učinak na rast micelija. Nakon šest dana samo je kod timijana zabilježeno inhibitorno djelovanje, a nakon devet dana niti kod jednog eteričnog ulja nije zabilježeno inhibitorno djelovanje na porast micelija.

Ključne riječi: fitopatogene gljive, eterična ulja, rast micelija, inhibicija.

Uvod

Eterična ulja su smjese hlapljivih, biološki aktivnih spojeva, a dobivaju se iz različitih dijelova biljnog materijala destilacijom ili tiještenjem. 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 često ovise o spoju koji je najzastupljeniji u njegovu sastavu. Na temelju toga Suhr i Nielsen (2003.) su došli do zaključka kako 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 ispitaio 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.

Primjerice, istraživanje utjecaja četiri različite koncentracije (1%, 2%, 3% i 4%) vodenih ekstrakata listova nima (*Azadirachta indica* A. Juss.), indijskog jorgovana (*Melia azedarach* L.) i indijskog cedra (*Toona ciliata* Roxb.) pokazalo je kako su ekstrakti listova nima i indijskog jorgovana imala inhibitorna svojstva na rast micelija *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. od 34% do 85%, dok je ekstrakt indijskog cedra pokazao u sve četiri koncentracije stimulativni učinak na rast micelija gljive (Ashraf i Javaid, 2007.). Kumar i sur. (2007) navode kako eterično ulje listova *Chenopodium ambrosioides* Linn. u koncentraciji od 100 µg/mL inhibira rast micelija *M. phaseolina* za 68,2%. Slično istraživanje o utjecaju eteričnog ulja sjemenki kima (*Carum carvi* L.) provedeno je na šest fitopatogenih gljiva, a rezultati su pokazali značajna inhibitorna svojstva na *M. phaseolina* u koncentraciji od 100 ppm, dok je minimalna doza koja je bila dovoljna da se ostvari inhibicija rasta micelija 50 ppm (Begum i sur. 2008.).

M. phaseolina uzročnik je suhe truleži biljaka. Pripada fakultativnim zemljišnim parazitima i tremofilna je gljiva te se njezino pojavljivanje može očekivati tijekom vrućih ljetnih mjeseci s vrlo malo oborina. Uzrokuje infekciju na više od 500 kultiviranih i korovnih biljnih vrsta (Jurković i Ćosić, 2004.). Budući da se ova gljiva iz godine u godinu sve učestalije javlja na različitim kulturama u našoj zemlji cilj našeg rada je bio ispitati utjecaj jedanaest eteričnih ulja na rast micelija *M. phaseolina*.

Materijal i metode rada

Izolacija *M. phaseolina* obavljena je sa suncokreta. Komadi biljnog tkiva zaraženi gljivom *M. phaseolina* isprani su tekućom vodom i dezinficirani u 70% etanolu (1 min.) te tri puta isprani destiliranom vodom. Biljni dijelovi su stavljeni na PDA podlogu i držani su u tamnoj komori na temperaturi 22°C. Razvijeni micelij precijepljen je na nove PDA podloge kako bi se dobile čiste kulture za daljnje istraživanje.

U središte svake posudice na hranjivu podlogu stavljen je papirnati disk promjera 5 mm na koji je pipetom dodano 5 µL eteričnog ulja, a u kontrolu 5 µL destilirane vode. U svaku posudicu na četiri mjesta udaljena 2,5 cm od središnjeg diska stavljeni su kružni isječki podloge promjera 5 mm s micelijem gljive. Upotrebljena su sljedeća eterična ulja: *Pimpinella anisum* L. (anis), *Mentha x piperita* L. (metvica), *Citrus aurantium* L. ssp. *amara* (gorka naranča), *Rosmarinus officinalis* L. (ružmarin), *Cinnamomum zeylanicum* Bl. (cimet), *Carum carvi* L. (kim), *Pinus sylvestris* L. (obični bor), *Salvia officinalis* L. (kadulja), *Thymus vulgaris* L. (timijan), *Eugenia caryophyllus* Spreng. (klinčićevac), *Lavandula angustifolia* ssp. *angustifolia* Mill. (lavanda). Pokus je postavljen u četiri ponavljanja. Petrijeve zdjelice su držane u termostatu na 22°C.

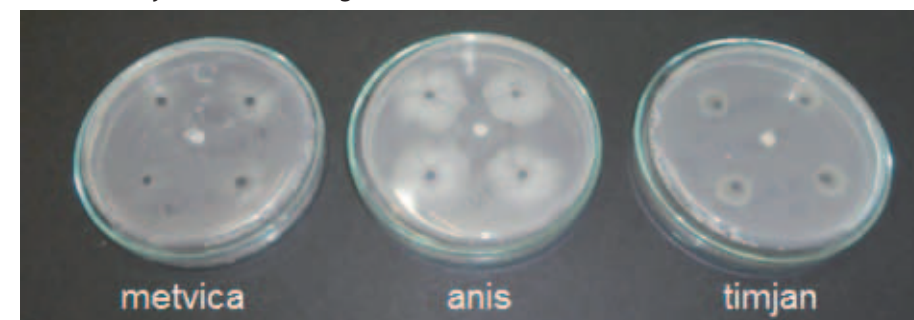
Mjerenje inhibitorne zone (udaljenost od kraja kolonije gljiva do papirnato disk) provedeno je nakon tri, šest i devet dana od početka inkubacije.

Statistička analiza rezultata provedena je analizom varijance (ANOVA) i najmanje signifikantne razlike (LSD) koristeći Microsoft Excel.

Rezultati i rasprava

Utjecaj eteričnih ulja na rast micelija *M. phaseolina* tri, šest i devet dana nakon inokulacije prikazan je u tablici 1.

Tri dana nakon inokulacije eterična ulja timijana, metvice, anisa, klinčićevca i cimeta pokazala su značajan inhibitorni učinak na rast micelija gljive *M. phaseolina* (slika 1 i 2). Utvrđene su statistički značajne razlike u djelovanju navedenih pet eteričnih ulja u odnosu na kontrolu za prag značajnosti 99% (tablica 1). Slične rezultate za timijan, cimet i klinčićevac navode i drugi autori. Primjerice u istraživanju koje su proveli Wilson i sur (1997.) navedena eterična ulja pokazala su jak inhibitorni učinak na porast micelija *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Pérez-Sánchez i sur. (2007.) također su ispitali utjecaj timijana na pet patogenih gljiva (*Pythium irregulare* Buisman, *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn, *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, *Fusarium oxysporum* Schlecht. emenf Snyder i Hansen, i *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary) pri čemu je također utvrđen značajan fungistatični učinak. Kumar i sur. (2007.) ispitali su inhibitorno djelovanje eteričnog ulja metvice koncentraciji 0,10 mg/mL u odnosu na djelovanje sintetičkih fungicida. Autori su utvrdili statistički značajno bolji fungistatični učinak ulja metvice u odnosu na istu koncentraciju sintetičkih fungicida.



Slika 1. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *M. phaseolina* nakon tri dana

¹ Ivana Posavac, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, Osijek
² doc. dr. sc. Karolina Vrandečić, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, Osijek
³ prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, Osijek

Tablica 1. Zona inhibicije (srednja vrijednost/mm) tri, šest i devet dana nakon inokulacije *M. phaseolina*

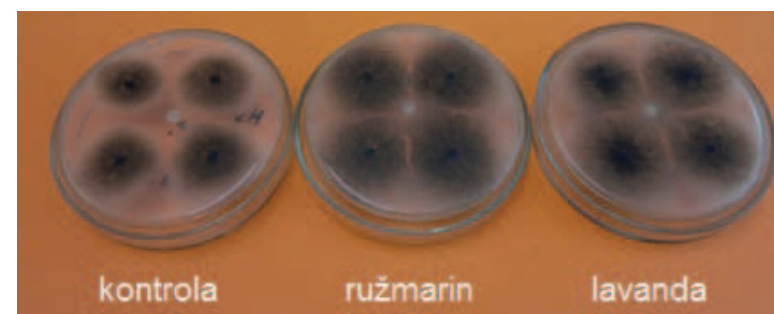
ETERIČNO ULJE	3. DAN	6. DAN	9. DAN
<i>Carum carvi</i>	0	0	0
<i>Cinnammum verum</i>	3,81**	0	0
<i>Citrus aurantium ssp. amara</i>	0,94	0,3	0
<i>Eugenia caryophyllus</i>	6,19**	0	0
<i>Lavandula angustifolia</i>	0	0	0
<i>Mentha piperita</i>	11**	0,5	0
<i>Pimpinella anisum</i>	6,56**	0	0
<i>Pinus sylvestris</i>	1,56	0,2	0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0	0	0
<i>Salvia officinalis</i>	0	0	0
<i>Thymus vulgaris</i>	18**	9,19**	2,5
Kontrola	1,94	0,9	0,75
LSD 0,05	2,39	2,92	-
LSD 0,01	3,21	3,91	-

** Eterična ulja koja su imala vrlo značajno inhibitorno djelovanje nakon tri i šest dana od inokulacije ($P < 0,01$)

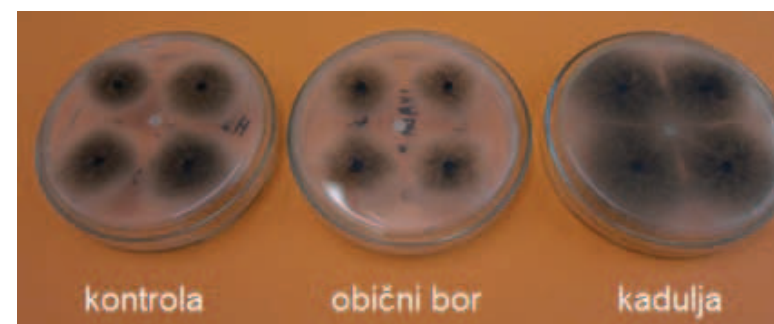


Slika 2. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *M. phaseolina* nakon tri dana

Eterična ulja koja su pokazala stimulirajući učinak na rast micelija *M. phaseolina* u odnosu na kontrolu su obični bor, gorka naranča, kim, lavanda, ružmarin i kadulja (slika 3 i 4). Dobiveni rezultati slažu se s istraživanjem Lee i sur. (2007.) i Ravlić (2011.) gdje ulja običnog bora i ružmarina nisu imala inhibitorni učinak na razvoj micelija više vrsta fitopatogenih gljiva. Prema Ćosić i sur. (2010.) eterično ulje gorke naranče i običnog bora također nije imalo fungistatično djelovanje za *F. graminearum*, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenw. i Reink.) Nelson, Toussoun i Marasas, *F. oxysporum*, *F. avenaceum* Fr. Sacc., *Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. i sur., *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Lehmann) Wehmeyer, *Phomopsis longicolla* Hobbs., *P. viticola* (Sacc.) Sacc, *Helminthosporium sativum* Pamm, King i Bakke, *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Huges, *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk što se slaže s našim rezultatom za *M. phaseolina*.



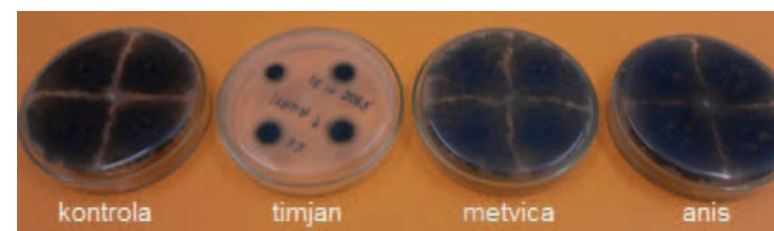
Slika 3. Stimulirajući učinak eteričnih ulja na porast micelija *M. phaseolina* nakon tri dana



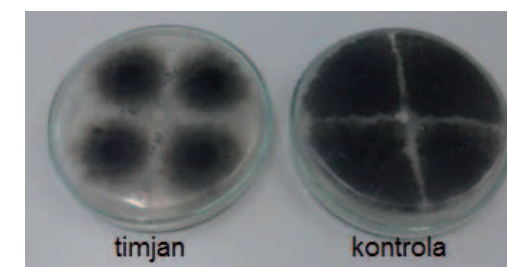
Slika 4. Stimulirajući učinak eteričnih ulja na porast micelija *M. phaseolina* nakon tri dana

Šest dana nakon inokulacije utvrđeno je kako jedino eterično ulje timijana ima statistički značajno inhibitorno djelovanje na porast micelija *M. phaseolina* (slika 5) (tablica 1).

Devet dana nakon inokulacije niti jedno eterično ulje nije imalo statistički značajno fungistatično djelovanje na istraživanu gljivu (slika 6).



Slika 5. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *M. phaseolina* nakon šest dana



Slika 6. Utjecaj eteričnog ulja na porast micelija *M. phaseolina* nakon devet dana

Zaključak

Utjecaj jedanaest eteričnih ulja na porast micelija *M. phaseolina* mjereno je nakon tri, šest i devet dana od inkubacije. Nakon tri dana eterična ulja običnog bora, gorke naranče, kima, lavande, ružmarina i kadulje imala su stimulirajući učinak na rast micelija u odnosu na kontrolu, dok su ulja timijana, metvice, anisa, klinčićevca i cimeta pokazala značajan inhibitory učinak na porast micelija gljive.

Nakon šest dana samo eterično ulje timijana ima značajno inhibitory djelovanje, dok nakon devet dana od inokulacije niti jedno eterično ulje nije imalo statistički značajno fungistatično djelovanje na rast micelija *M. phaseolina*.

Literatura

- Ashraf, H., Javaid, A. (2007): Evaluation of Antifungal Activity of Meliaceae Family Against *Macrophomina phaseolina*, *Mycopath*, 5(2): 81-84
- Begum, J., Nazrul Islam Bhuiyan, M., Uddin Chowdhury, J., Nuzmul Hoque, M., Nural Anwer, M. (2008): Antimicrobial Activity of Essential Oil from Seeds of *Carum carvi* and Its Composition, *Bangladesh J Microbiol*, 25(2): 85-89
- Čosić, J., Vrandečić, K., Postić, J., Jurković, D., Ravlić, M. (2010): In Vitro Antifungal Activity of Essential Oils on Growth of Phytopathogenic Fungi, *Poljoprivreda*, 16(2): 25-28
- Jurković, D., Čosić, J. (2004): Bolesti suncokreta u knjizi: Vratarić, M. i sur. (2004): *Suncokret Helianthus annuus L.*, Poljoprivredni institut Osijek, 283-329
- Kumar, R., Kumar Mishra, A., Dubey, N.K., Tripathi, Y.B. (2007): Evaluation of *Chenopodium* brosioides Oil as a Potential Source of Antifungal, Antiflatogenic and Antioxidant Activity, *Int J Food Microbiol.*, 115(2): 159-164
- Kumar, R., Dubey, N.K., Tiwari, O.P., Tripathi, Y.B., Sinha, K.K. (2007): Evaluation of Some Essential Oils as Botanical Fungitoxicants for the Protection of Stored Food Commodities from Fungal Infestation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(9): 1737-1742
- 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 Fungicidal Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi, *Plant Pathol. J.*, 23(2): 97-102
- Pérez-Sánchez, R., Infante, F., Gálvez, C., Ubersa, 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
- Ravlić, M. (2011): Utjecaj eteričnih ulja na porast važnijih fitopatogenih gljiva, diplomski rad, Poljoprivredni fakultet Osijek
- 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
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. (1997): Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*, *Plant Disease*, 81(2): 204-210

Scientific study

Influence of essential oils on growth of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

Summary

The impact of 11 different essential oils (aniseed, peppermint, bitter orange, rosemary, cinnamon, cumin, pine, sage, thyme, clove and lavender) on the growth of *Macrophomina phaseolina* mycelium were tested. After three days thyme, peppermint, aniseed, cinnamon and clove essential oils showed significant inhibitory properties, while other essential oils compared to the control had a stimulating effect on mycelial growth. After six days only thyme oil had inhibitory effects, and after nine days none of the essential oils had inhibitory effect.

Keywords: phytopathogenic fungi, essential oils, mycelial growth, inhibition.

Preiner D.¹, Jasminka Karoglan Kontić², Maletić E.³, Zvezdana Marković⁴, Ivana Tomaz.⁵

Znanstveni rad

Sadržaj polifenola u prošek od hrvatskih autohtonih sorata vinove loze

Sažetak

Prošek je desertno vino s kontroliranim zemljopisnim podrijetlom iz regije Primorska Hrvatska. Tradicionalna tehnologija proizvodnje podrazumijeva vinifikaciju grožđa sa visokim koncentracijama šećera što se postiže njegovim prosušivanjem na trsu ili u kontroliranim uvjetima. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi sadržaj polifenola u prošecima proizvedenih od 10 autohtonih sorata vinove loze koje se tradicionalno koriste u proizvodnji prošeka na području Dalmacije: Babić, Glavinuša, Grk, Lasina, Maraština, Plavac mali, Plavina, Pošip, Prč, Vugava. Utvrđene su značajne razlike između prošeka dobivenih od različitih sorata, ali generalno je sadržaj ukupnih fenola kod bijelih i kod crnih sorata viši nego u redovnim vinima ovih sorata. Sadržaj pojedinačnih fenolnih spojeva također se značajno razlikuje između sorata, a posebno je zanimljiv relativno visok sadržaj resveratrola utvrđen u prošek proizvedenom od sorata Plavac mali, Babić i Glavinuša.

Glavne riječi: prošek, polifenoli, autohtone sorte vinove loze, vinova loza

Uvod

Prošek je tradicionalno vezan uz primorsku Hrvatsku gdje se proizvodi od autohtonih sorata vinove loze. Slična tehnologija proizvodnje desertnih vina prisutna je i u drugim mediteranskim zemljama gdje se vino također proizvodi od djelomično prosušenog grožđa (Franco i sur., 2004.). Tradicionalni prošek dopušteno je proizvoditi samo iz prosušenog grožđa, bez ikakvih dodataka kojima bi se promijenio sadržaj šećera ili alkohola. Specifičnost ovog vina je u tome što se proizvodi od grožđa koje je djelomično prosušeno na trsu ili nakon berbe čime se povećava koncentracija šećera u njemu što omogućava dobivanje slatkog vina sa relativno visokim sadržajem alkohola. Tijekom prosušivanja dolazi i do koncentriranja ostalih spojeva koji se nalaze u soku bobice, a dolazi i do promjene relativnog odnosa kože, sjemenki i soka. Sve ovo ima znatan utjecaj kako na tehnologiju prerade takvog grožđa, a posebno na sastav i karakteristike dobivenog vina – prošeka.

U primorskoj Hrvatskoj tradicionalno se za proizvodnju prošeka koristio veći broj autohtonih sorata (Bulić, 1949), a među njima su najzastupljenije bile: Maraština, Vugava, Babić, Pošip, Plavac mali, Plavina, Lasina, Grk, Prč i Glavinuša. Prošek proizveden od različitih sorata znatno se razlikuje u brojnim karakteristikama, a ponajviše u organoleptičnim svojstvima i kemijskom sastavu (Karoglan Kontić i sur., 2009.). U dosadašnjim istraživanjima utvrđene su značajne razlike između autohtonih sorata korištenih u proizvodnji prošeka tijekom prosušivanja grožđa, što se u značajnoj mjeri povezuje s mehaničkim sastavom grožđa, prvenstveno debljinom kože, ali i veličinom bobice (Karoglan Kontić i sur., 2009a.). Utvrđene su i razlike u kemijskom sastavu grožđa nakon prosušivanja kao što su razlike u koncentraciji organskih kiselina nakon prosušivanja grožđa (Preiner i sur., 2009.). Polifenoli su spojevi koji su izuzetno važni za kvalitetu vina, pa tako i prošeka, a ujedno je utvrđeno kako mnogi od njih imaju

¹ doc. dr. sc. Darko Preiner, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Svetošimunska 25, Zagreb (dpreiner@agr.hr)

² prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Svetošimunska 25, Zagreb

³ prof. dr. sc. Edi Maletić, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Svetošimunska 25, Zagreb

⁴ dr. sc. Zvezdana Marković, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Svetošimunska 25, Zagreb

⁵ dipl. ing. Ivana Tomaz, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Svetošimunska 25, Zagreb