

Antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*

Antifungal activity of essential oils and their major components on mycelial growth of *Colletotrichum coccodes*

Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., Čosić, J.

Poljoprivreda/Agriculture

ISSN: 1848-8080 (Online)

ISSN: 1330-7142 (Print)

<http://dx.doi.org/10.18047/poljo.24.2.3>



Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Poljoprivredni institut Osijek

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Agricultural Institute Osijek

ANTIFUNGALNA AKTIVNOST ETERIČNIH ULJA I NJIHOVIH GLAVNIH KOMPONENTI NA RAST MICELIJA *Colletotrichum coccodes*

Palfi, M.⁽¹⁾, Konjevoda, P.⁽²⁾, Vrandečić, K.⁽³⁾, Čosić, J.⁽³⁾

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

U radu je ispitivan utjecaj pet eteričnih ulja (anisa, paprene metvice, bosiljka, ružmarina i lavande prave) i njihovih dviju najzastupljenijih komponenti na porast micelija *Colletotrichum coccodes*, ekonomski značajne fitopatogene gljive i uspoređen s fungicidima. Ispitivanja su provedena u uvjetima in vitro u osam volumena na PDA podlozi u četiri ponavljanja. Porast micelija mjereno je osmi i petnaesti dan nakon nacjepljivanja micelija. Utvrđeno je da neka eterična ulja i komponente, primijenjeni u određenome volumenu, imaju signifikantan antifungalni učinak, u pojedinim primjerima usporediv s fungicidima. Najbolje djelovanje i najniži IC_{50} imala su eterična ulja anisa i paprene metvice te komponenta anetol. Petnaesti dan nakon inokulacije micelija eterična ulja imala su značajno bolje antifungalno djelovanje od svoje druge komponente po zastupljenosti.

Ključne riječi: eterična ulja, fitopatogena gljiva, fungicidi, IC_{50}

UVOD

Fitopatogena gljiva *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hoge ekonomski je vrlo značajan patogen. Prema mišljenju međunarodne zajednice, *Colletotrichum* spp. nalazi se na osmome mjestu ekonomski i znanstveno najznačajnijih biljnih patogena (Dean i sur., 2012.). Nekoliko gljivica roda *Colletotrichum*, kao što su *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. acutatum* Simmonds, *C. capsici* (Syd. & P. Syd.) Butler & Bisby i *C. coccodes*, mogu prouzročiti bolest poznatu pod nazivom „antraknoza“. *C. coccodes*, kao značajni predstavnik roda *Colletotrichum*, može izazvati značajne štete na krumpiru, rajčici i paprici (Trkulja i sur., 2008.), što je osobito važno proizvođačima povrća. *C. coccodes* se iz jedne vegetacije u drugu prenosi zaraženim sjemenom, kao i ostacima zaraženih biljaka. Prema istraživanjima Dillarda i Cobba (1998.), u tlu se može održati i do osam godina.

Biljne bolesti suzbijaju se, prvenstveno, sintetičkim fungicidima, čija prekomjerna uporaba može dovesti do razvoja otpornih populacija patogena (da Cruz Cabral i sur., 2013.), akumulacije rezidua u hrani (Ogah i sur.,

2016.) i zagađenja okoliša. Smanjenje uporabe sintetičkih fungicida, zbog sve većega pritiska javnosti (Bhagwat i Datar, 2014.) i pronalazak novih i ekološko prihvatljivijih aktivnih tvari u zaštiti bilja, postaje imperativ moderne poljoprivrede. Eterična ulja, zbog svojih antifungalnih, antibakterijskih, antivirusnih i insekticidnih svojstava, postala su poželjan izvor alternativnih metoda u zaštiti bilja (Bassolé i Juliani, 2012.). Mogu sadržavati više od 60-tak različitih sastojaka, od kojih su dva ili tri glavna sastojka u visokim koncentracijama, a ostali se sastojci nalaze u tragovima (Bakkali i sur., 2008.). Glavne komponente čine oko 85% eteričnog ulja, dok su ostali spojevi prisutni u malim količinama ili tragovima. Njihova biološka aktivnost ovisi o vrsti i zemljopisnome podrijetlu biljaka, njihovome kemijskome sastavu, primijenjenim koncentracijama ili volumenima, okolišnim uvjetima uzgoja, agrotehnici (Čosić i sur., 2014.), kao i vremenu inkubacije (Nosrati i sur., 2011.).

(1) Dr. sc. Marina Palfi (marina.palfi@podravka.hr) - Podravka d.d., Istraživanje i razvoj, Ante Starčevića 32, 48000 Koprivnica, Hrvatska, (2) Doc. dr. sc. Paško Konjevoda - Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, (3) Prof. dr. sc. Karolina Vrandečić, Prof. dr. sc. Jasenka Čosić - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek

Ćosić i sur. (2010.) utvrdili su povoljan antifungalni učinak eteričnog ulja anisa na porast micelija *C. coccodes*. De i sur. (2002.) navode da se antifungalna svojstva zvjezdolikog anisa (*Illicium verum* Hook) na 12 bakterija i 15 gljivica u najvećoj mjeri mogu pripisati komponenti anetolu.

Mnogi istraživači utvrdili su antifungalno djelovanje pojedinih komponenti eteričnih ulja poput timola, eugena, 1,8-cineola (El-Shiekh i sur., 2012.; Marei i sur., 2012.). Ipak, brojna istraživanja ukazuju da antifungalno djelovanje ulja ovisi o svim komponentatama eteričnih ulja, odnosno o njihovome sinergističkome djelovanju (Stefan i sur., 2013.).

Cilj ovoga rada bio je u uvjetima *in vitro* utvrditi antifungalni utjecaj pet eteričnih ulja (anisa, paprene metvice, bosiljka, ružmarina, lavande prave) i njihovih glavnih komponenti na rast fitopatogene gljivice *C. coccodes*, utvrditi polovinu maksimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}) za eterična ulja i njihove glavne komponente te usporediti njihov antifungalni učinak s učinkom fungicida.

MATERIJAL I METODE

U pokusu (*in vitro*) je ispitivan utjecaj eteričnih ulja anisa (*Pimpinella anisum* L.), paprene metvice (*Mentha x piperita* L.), bosiljaka (*Ocimum basilicum* L.), ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), lavande prave (*Lavandula angustifolia* Mills.) i njihovih najzastupljenijih komponenti: anetola, estragola, mentola, mentona, eukaliptola, pinena alfa plus, linalola, linalil acetata na porast micelija fitopatogene gljivice *C. coccodes*.

Eterična ulja proizvedena su i analizirana upotrebom GC-MC (plinske kromatografije – masene spektrometrije) u Pranarôm International Ltd. (Belgija). Eterično ulje anisa proizvedeno je i analizirano u Kemigu d.o.o., Sesvete-Soblinec. Komponente eteričnih ulja proizvedene su u Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG (Hamburg, Njemačka).

Ispitivanje je provedeno s osam različitih volumena eteričnih ulja: 3 μ L, 5 μ L, 7 μ L, 9 μ L, 15 μ L, 30 μ L, 50 μ L i 70 μ L /10 mL PDA (krumpir dekstrozni agar). Količina svake komponente preračunata je prema postotnom udjelu za svaki ispitivani volumen eteričnog ulja. Zastupljenost ispitivanih komponenti bila je za eterično ulje anisa (anetol 89,0%, estragol 4,15%), paprene metvice (mentol 43,90%, menton 20,91%), bosiljka (estragol 71,49%, linalol 20,03%), ružmarina (eukaliptol 40,59%, pinen alfa plus 14,51%) i lavande prave (linalol 32,87%, linalil acetat 33,25%). U kontrolnoj varijanti pokusa korištena je destilirana voda.

Za fitopatogenu gljivicu *C. coccodes* ispitano je djelovanje fungicida Dithane M45, proizvođača Dow AgroScineces V.m.b.H (Austrija), u dvije količine (0,2 kg/80 L H₂O; 0,25 kg/80 L H₂O) i fungicida Ortiva Top, proizvođača Syngenta Crop Protection AG (Švicarska), primijenjenog u četiri količine (0,8 L/500 L H₂O; 1 L/500 L H₂O; 0,8 L/1000 L H₂O; 1 L/1000 L H₂O). Umjesto vode, korištena je ista količina pripremljene PDA podloge.

Količine fungicida određene su prema proizvođačkim uputama za svaki primijenjeni fungicid.

Izolacija i determinacija gljivice obavljena je na Katedri za fitopatologiju Poljoprivrednoga fakulteta u Osijeku, a sva ostala istraživanja u laboratorijima Istraživanja i razvoja, Podravka d.d., Koprivnica.

Fitopatogena gljivica *C. coccodes* izolirana je iz svježega biljnoga materijala rajčice. Komadi biljnoga tkiva sa simptomima isprani su tekućom vodom i dezinficirani u 70% etanolu (1 min.) te tri puta isprani destiliranom vodom. Biljni su dijelovi stavljeni na PDA podlogu i držani su u klima-komori na temperaturi 22°C i režimu svjetla 12 h svjetlo/12 h tama. Determinacija je obavljena na temelju morfoloških karakteristika.

U pokusu je korištena PDA podloga proizvođača Merck KGaA, (Darmstadt, Njemačka) i pomoćno sredstvo Polysorbatum 80 (Tween 80), proizveden u Kemigu d.o.o., Donja Zelina. U svaku Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm razliveno je 10 mL PDA podloge. U PDA podlogu dodano je pomoćno sredstvo Tween 80 u koncentraciji od 0,05% i planom rada predviđene količine eteričnih ulja i njihovih komponenti. U sredinu svake zdjelice postavljene su diskovi micelija gljivice promjera 4 mm stari osam dana. Pokus je proveden za svaki volumen eteričnih ulja i njihovih komponenti, fungicida i za kontrolnu varijantu (destilirana voda) u četiri ponavljanja. Nakon inokulacije, Petrijeve zdjelice stavljene su na inkubaciju u termostat, na temperaturu 20°C i svjetlosni režim 12 h svjetlo/12 h tama. Promjer micelija (mm) mjereno je osmoga i petnaestoga dana od inokulacije.

Statistička obrada podataka

Analiza podataka i izrada grafikona obavljena je uporabom programa GraphPad Prism verzija 7 (GraphPad Prism, <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Podaci su izraženi kao aritmetička sredina, standardna devijacija te 95 postotne granice pouzdanosti za parametar IC_{50} . Za usporedbu među skupinama korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) te Tukeyev test višestruke usporedbe (Rowe, 2016.). Svi primijenjeni testovi bili su dvosmjerni. Statistički signifikantnima smatrane su P vrijednosti manje ili jednake 0,05. Vrijednost parametra IC_{50} izračunavana je kao koncentracija ispitivanoga spoja koja smanjuje rast micelija na pola između bazalnog i maksimalnog odgovora uporabom subrutina u programu GraphPad Prism.

REZULTATI I RASPRAVA

Iako fungicidi Dithane M45 i Ortiva Top nisu u Republici Hrvatskoj registrirani za suzbijanje *C. coccodes* u rajčici, povrtnoj kulturi iz koje je izolirana gljivica, rezultati pokazuju da postoji izvjesno fungicidno djelovanje i na tu gljivicu u odnosu na netretiranu kontrolu (Fitosanitarni informacijski sustav, 2017.). Rezultati istraživanja pokazali su da niti kod jednoga fungicida nije utvrđeno potpuno (100%) suzbijanje rasta micelija. Ipak, fungicidi su u svim primijenjenim dozama u odnosu na kontrolu uvijek pokazali bolji učinak, što je u skladu s očekivanjima (Tablica 1.).

Tablica 1. Odnos primijenjenih doza fungicida na promjer rasta micelija *Colletotrichum coccodes* (mm) u usporedbi s kontrolomTable 1. Relationship effect of applied fungicide doses on *Colletotrichum coccodes* (mm) mycelium growth versus control

Fungicid/Fungicide	Doza/Dose	Promjer rasta micelija (mm) Diameter of the mycelial growth (mm)	
		8. dan/ 8 th day	15. dan/15 th day
Dithane M45	0,2 kg / 80 L H ₂ O	10±1,0	31±1,0
	0,25 kg / 80 L H ₂ O	12±0,5	31±0,5
	Kontrola (Control)	28±0,5	55±0,5
Ortiva Top	0,8 L / 500 L H ₂ O	7±0,0	10±0,5
	1 L / 500 L H ₂ O	7±0,5	11±0,6
	0,8 L / 1000 L H ₂ O	7±0,5	10±0,5
	1 L / 1000 L H ₂ O	7±0,5	10±0,0
	Kontrola (Control)	28±0,5	55±0,5

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± SD (n = 4)/Results are expressed as mean ± SD (n=4)

Osmi dan nakon inokulacije, potpunu inhibiciju rasta micelija imala su eterična ulja anisa, paprene metvice, lavande prave, bosiljka te komponenta anetol i to u najvišim primijenjenim volumenima (Tablica 2.). Njihovo djelovanje u tim volumenima bilo je bolje nego djelovanje fungicida Dithane M45 i Ortiva Top. Petnaesti dan eterično ulje lavande prave nije u potpunosti inhibiralo rast micelija niti pri najvećem primijenjenome volumenu. Iako petnaesti dan nakon inokulacije komponenta anetol nije pokazala potpunu inhibiciju, izmjereni rast micelija

pri volumenu 70 µL/10 mL PDA bio je manji nego kod primijenjenih fungicida. Naši rezultati ispitivanja u skladu su s rezultatima drugih znanstvenika koji navode da antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih komponenti ovisi o primijenjenoj količini, odnosno koncentraciji (Edris i Farrag, 2003., Duduk i sur., 2015.; Elshafie i sur., 2015.; Adebayo i sur., 2013.). Moghaddam i sur. (2013.) navode da se antifungalno djelovanje eteričnog ulja *Mentha piperita* povećava s povećanjem koncentracije te da ovisi i o vrsti patogena.

Tablica 2. Odnos između primijenjenih volumena eteričnih ulja i njihovih komponenti (µL/10 mL PDA) i promjera (mm) micelija *C. coccodes* kod kojih je zabilježena potpuna inhibicija micelija - 8. i 15. danTable 2. The relationship between the applied volumes of essential oils and their components (µL/10 mL PDA) and diameter (mm) of *C. coccodes* mycelium in which total mycelium inhibition was observed - 8th and 15th day

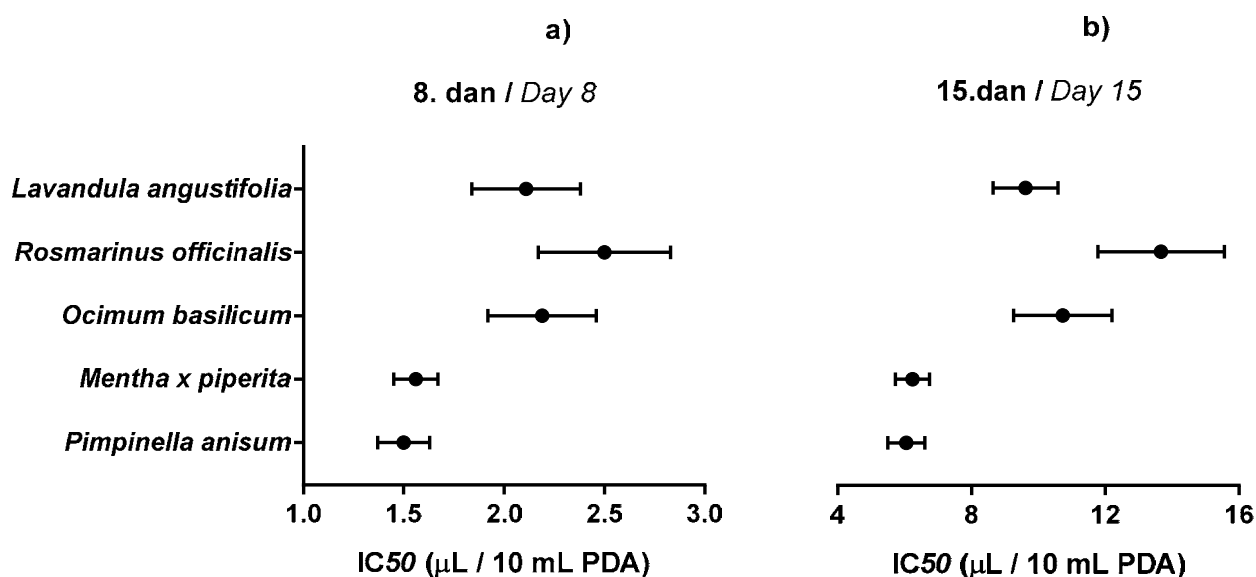
Eterična ulja i njihove komponente Essential oils and their components	Volumeni/Volumes			
	8. dan/8 th dan		15. dan/15 th day	
	50 µL/10 mL PDA	70 µL/10 mL PDA	50 µL/10 mL PDA	70 µL/10 mL PDA
<i>Pimpinella anisum</i>	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
· anetol / anethol	6±0,0	0±0,0	13±4,0	2±3,5
· estragol / estragol	30±0,0	30±1,4	56±0,6	54±2,2
<i>Mentha x piperita</i>	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
· mentol / menthol	21±1,7	19±4,0	47±1,7	44±6,0
· menton / menthone	27±0,8	28±0,5	54±1,3	52±0,8
<i>Ocimum basilicum</i>	11±7,6	0±0,0	29±8,5	0±0,0
· estragol / estragol	30±1,7	29±1,3	55±1,6	56±1,4
· linalol / linalool	29±1,3	28±1,8	58±2,1	58±2,7
<i>Rosmarinus officinalis</i>	17±1,3	19±4,6	37±1,0	36±3,4
· eukaliptol / eucalyptol	29±3,0	29±1,5	56±2,9	57±2,5
· pinen alfa plus / pinene alpha plus	30±1,0	30±0,5	59±1,5	58±2,2
<i>Lavandula angustifolia</i>	0±0,0	0±0,0	29±6,9	21±1,4
· linalol / linalool	28±2,9	28±1,4	56±1,6	57±1,3
· linalil acetat / linalyl acetate	32±0,8	33±1,0	58±0,5	61±1,3

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± SD (n=4)/Results are expressed as mean ± SD (n=4)

Većina ispitivanih komponenti eteričnih ulja nije u potpunosti inhibirala rast micelija *C. coccodes* niti u najvećim primijenjenim volumenima, što je u skladu s rezultatima istraživača koji su utvrdili da komponente eteričnih ulja često ne inhibiraju u potpunosti rast micelija patogenih gljivica (Dev i sur., 2004.; Ōzek i sur., 2010.).

Najmanji IC_{50} , koji ukazuje na učinkovit inhibični učinak, tijekom cijeloga inkubacijskoga perioda imalo je eterično ulje anisa, slijede eterična ulja

paprene metvice i lavande prave (Slika 1.). Fonseca i sur. (2015.) su za mentu i ružmarin utvrdili vrijednost parametra MIC_{50} od 0,44 mg/L, dok je MIC_{90} iznosio 3,5 mg/L. Rezultati naših ispitivanja pokazuju povećanje vrijednosti parametra IC_{50} eteričnih ulja petnaestog u odnosu na osmi dan ispitivanja (Slika 1.). Nosrati i sur. (2011.) utvrdili su lagano smanjenje djelotvornosti eteričnih ulja kroz inkubacijsko vrijeme te smatraju da inhibični učinak eteričnog ulja ovisi o vremenu inkubacije.



Slika 1. Procijenjena vrijednost parametra IC_{50} za eterična ulja osmi (a) i petnaesti (b) dan nakon naccjepljivanja micelija *C. coccodes*. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina te kao 95%-tna granica pouzdanosti za IC_{50} ($n=32$)

Figure 1. Estimated value of the IC_{50} parameter for essential oils on eighth (a) and fifteen (b) days after inoculation *C. coccodes*. The results are expressed as the arithmetic mean and 95% confidence interval IC_{50} ($n=32$)

Razlike u djelovanju između eteričnih ulja i njihovih komponenti osmoga dana ispitivanja utvrđene su između eteričnog ulja anisa i njegove komponente estragol, dok ostala eterična ulja nisu imala jači učinak od svojih komponenti. Također, antifungalno djelovanje anetola bilo je statistički značajno jače u odnosu na drugu glavnu komponentu ulja anisa estragol (Tablica 3.). Petnaesti dan ispitivanja kod svih eteričnih ulja (izuzev ulja bosiljka) utvrđene su statistički značajne razlike u djelovanju u odnosu na njihovu drugu komponentu po zastupljenosti, a statistički značajne razlike utvrđene su i između komponenata međusobno. Antifungalno djelovanje anetola i niske vrijednosti IC_{50} u našem radu u skladu su s rezultatima De i sur. (2002.) i Marei i sur. (2012.). Inhibični učinak eteričnih ulja ovisi o svim

njihovim komponentama te je zbog toga najčešće učinak pojedinih komponenti ulja slabiji u odnosu na učinak ulja (De i sur., 2002.; El-Shiekh i sur., 2012.; Marei i sur., 2012.; Stefan i sur., 2013.; López-Meneses i sur., 2017.). Smatra se da i manje zastupljeni spojevi imaju utjecaj na antifungalnu aktivnost ili da je antifungalna aktivnost rezultat sinergizma između različitih spojeva (Edris i Farrag, 2003.; Angioni i sur., 2006.; Adeyinka i Richard, 2015.).

Buduća istraživanja potrebno je usmjeriti na različite kombinacije eteričnih ulja i njihovih komponenti. Osobito je važno proširiti ispitivanja učinkovitosti eteričnih ulja, komponenti ili njihovih kombinacija u *in vivo* uvjetima.

Tablica 3. Procijenjena vrijednost parametra IC₅₀ za eterična ulja i njihove komponente osmog i petnaestog dana nakon inokulacije gljivom *C. coccodes*. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina te kao 95%-tna granica aritmetičke sredine (n=32)

Table 3. Estimated IC₅₀ value of the parameter for the essential oils and their components of the eighth and fifteenth day after the inoculation with *C. coccodes*. The results are expressed as the arithmetic mean and the 95 per cent confidence interval of the mean (n=32)

Eterična ulja i njihove komponente Essential oils and their components	8. dan/8 th day		15. dan/15 th day	
	IC ₅₀ (95 % CI) ¹	ANOVA and Tukey test ^{2,3}	IC ₅₀ (95 % CI) ¹	ANOVA and Tukey test ^{2,3}
<i>Pimpinella anisum</i>	1,50 (1,24 - 1,78)	P = 0,009 ²	6,05 (4,98 - 7,30)	P < 0,001 ²
· anetol / <i>anethol</i>	1,70 (1,38 - 2,05)	P = 0,897 ³	7,66 (6,10 - 9,59)	P = 0,885 ³
· estragol / <i>estragol</i>	2,81 (1,79 - 4,16)	P = 0,012 ³	19,29 (10,85 - 35,27)	P < 0,001 ³
<i>Mentha x piperita</i>	1,56 (1,34 - 1,80)	P > 0,05 ²	6,24 (5,25 - 7,40)	P = 0,002 ²
· mentol / <i>menthol</i>	2,10 (1,47 - 2,87)		14,57 (9,45 - 22,76)	P = 0,080 ³
· menton / <i>menthone</i>	2,56 (1,66 - 3,74)		19,98 (11,96 - 34,06)	P = 0,001 ³
<i>Ocimum basilicum</i>	2,19 (1,65 - 2,82)	P > 0,05 ²	10,73 (7,86 - 14,63)	P > 0,05 ²
· estragol / <i>estragol</i>	2,60 (1,64 - 3,87)		20,40 (11,52 - 37,15)	
· linalol / <i>linalool</i>	2,71 (1,72 - 4,02)		25,39 (14,33 - 46,11)	
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,50 (1,83 - 3,31)	P > 0,05 ²	13,67 (9,81 - 19,17)	P = 0,037 ²
· eukaliptol / <i>eucalyptol</i>	2,97 (1,87 - 4,47)		22,88 (12,36 - 43,49)	P = 0,036 ³
· pinen alfa plus / <i>pinene alpha plus</i>	2,99 (1,85 - 4,57)		31,32 (18,67 - 53,72)	P = 0,028 ³
<i>Lavandula angustifolia</i>	2,11 (1,57 - 2,74)	P > 0,05 ²	9,62 (7,65 - 12,10)	P = 0,005 ²
· linalol / <i>linalool</i>	2,72 (1,75 - 4,01)		25,72 (14,68 - 46,09)	P = 0,066 ³
· linalil acetat / <i>linalyl acetate</i>	3,21 (2,01 - 4,87)		32,98 (19,27 - 57,79)	P = 0,004 ³

¹Aritmetička sredina i 95%-tna granica aritmetičke sredine/Arithmetic mean and 95% confidence interval; ²P vrijednost jednosmjerne analize varijance/P value of One-way Analysis of Variance; ³Tukey HSD test višestruke usporedbe (komponenta vs eterično ulja)/Tukey's HSD Test of multiple comparison (component vs. Essential oil)

ZAKLJUČAK

Ispitivanjem antifungalnoga djelovanja eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na porast micelija *C. coccodes* u *in vitro* uvjetima, utvrđeno je da neka eterična ulja i komponente imaju dobro antifungalno djelovanje, čak bolje od ispitivanih fungicida. Najbolje djelovanje i najniži IC₅₀ imala su ulja anisa i paprene metvice te komponenta anetol. Zadnji dan ispitivanja eterična ulja imala su značajno bolje djelovanje od svoje druge komponente po zastupljenosti.

ZAHVALA

Zahvaljujemo tvrtki Kemig d.o.o., Sesvete-Soblinec, na doniranim komponentama eteričnih ulja, koje su korištene u ovome radu.

LITERATURA

- Adebayo, O., Dang, T., Bélanger, A., & Khanizadeh, S. (2013). Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Research*, 2(1), 217-226. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n1p217>
- Adeyinka, A., & Richard, F. (2015). Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: A review. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 3(3), 31-35. <http://sciencewebpublishing.net/ijbfs/archive/2015/April/pdf/Adeyinka%20and%20Richard.pdf>
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4364-4370. <https://doi.org/10.1021/jf0603329>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Bhagwat, M. K., & Datar, A. G. (2014). Antifungal activity of herbal extracts against plant pathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(8), 959-965. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.826857>

7. Ćosić, J., Vrandečić, K., & Jurković, D. (2014). The effect of essential oils on the development of phytopathogenic fungi. *Biological Controls for Preventing Food Deterioration: Strategies for Pre- and Postharvest Management*, 273-291. <https://doi.org/10.1002/9781118533024.ch12>
8. Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., & Ravlić, M. (2010). *In vitro* antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda*, 16(2), 25-28.
9. Da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>
10. De, M., De, A. K., Sen, P., & Banerjee, A. B. (2002). Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook f). *Phytotherapy Research*, 16(1), 94-95. <https://doi.org/10.1002/ptr.989>
11. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
12. Dev, U., Devakumar, C., Mohan, J., & Agarwal, P. C. (2004). Antifungal activity of aroma chemicals against seed-borne fungi. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 496-499. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698780>
13. Dillard, H. R., & Cobb, A. C. (1998). Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. *Plant Disease*, 82(2), 235-238. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.235>
14. Duduk, N., Marković, T., Vasić, M., Duduk, B., Vico, I., & Obradović, A. (2015). Antifungal activity of three essential oils against *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of strawberry anthracnose. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(3), 529-537. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1004120>
15. Edris, A. E., & Farrag, E. S. (2003). Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Food/Nahrung*, 47(2), 117-121. <https://doi.org/10.1002/food.200390021>
16. Elshafie, H. S., Mancini, E., Camele, I., De Martino, L., & De Feo, V. (2015). *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against post-harvest brown rot disease of peach fruit. *Industrial Crops and Products*, 66, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.031>
17. El-Shiekh, Y. W. A., El-Din, N. H., Shaymaa, M. A. A., & El-Din, K. A. Z. (2012). Antifungal activity of some naturally occurring compounds against economically important phytopathogenic fungi. *Nature and Science*, 10(6), 114-123. http://www.sciencepub.net/nature/ns1006/017_9826ns1006_114_123.pdf
18. Fitosanitarni informacijski sustav (2017). Ministarstvo poljoprivrede (FIS). Retrieved from <https://fis.mps.hr/trazilicaszb/>
19. Fonseca, A. O. S., Pereira, D. I. B., Jacob, R. G., Maia Filho, F. S., Oliveira, D. H., Maroneze, B., ... & Meireles, M. C. A. (2015). *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. *Mycopathologia*, 179(3-4), 253-258. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9841-6>
20. GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Retrieved from <http://www.graphpad.com/>
21. López-Meneses, A. K., Sánchez-Mariñel, R. I., Quintana-Obregón, E. A., Parra-Vergara, N. V., González-Aguilar, G. A., López-Saiz, C. M., & Cortez-Rocha, M. O. (2017). *In vitro* antifungal activity of essential oils and major components against fungi plant pathogens. *Journal of Phytopathology*, 165(4), 232-237. <https://doi.org/10.1111/jph.12554>
22. Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., & Abdelgaleil, S. A. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.004>
23. Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H. K., Farhadi, N., & Hosseini, S. M. A. (2013). Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(4), 506-512. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.813265>
24. Nosrati, S., Esmailzadeh-Hosseini, S. A., Sarpeleh, A., Soflaei Shahrababak, M., & Soflaei Shahrababak, Y. (2011). Antifungal activity of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* the causal agent of stem and crown rot of greenhouse cucumber in Yazd, Iran. In *International Conference on Environmental and Agricultural Engineering, Chengdu, China held on* (Vol. 2011, pp. 52-56). Retrieved from <http://www.ipcbee.com/vol15/10-U00041.pdf>
25. Ogah, C. O., Coker, H. B., & Adepoju-Bello, A. A. (2016). Organophosphate and carbamate pesticide residues in beans from markets in Lagos State, Nigeria. *Journal of Innovative Research in Engineering and Sciences*, 2(1), 50-61.
26. Özek, T., Tabanca, N., Demirci, F., Wedge, D. E., & Baser, K. H. C. (2010). Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Records of Natural Products*, 4(4), 180-192. <https://pubag.nal.usda.gov/download/55140/PDF>
27. Rowe, P. (2016). *Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences*. 2nd ed. Chichester: Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119109075>
28. Stefan, M., Zamfirache, M., Padurariu, C., Trută, E., & Gostin, I. (2013). The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. *Central European Journal of Biology*, 8(6), 600-608. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0171-8>
29. Trkulja, V., Stojčić, J., & Ćurković, B. (2008). Etiološka proučavanja pojave antraknoze jagode u sjeverozapadnom dijelu Bosne i Hercegovine. *Glasnik zaštite bilja*, 31(5), 75-89. <https://hrcak.srce.hr/164015>

ANTIFUNgal ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR MAJOR COMPONENTS ON MYCELIAL GROWTH OF *Colletotrichum coccodes*

SUMMARY

The effect of five essential oils (anise, peppermint, basil, rosemary and true lavender) and their two most common components on the mycelial growth in Colletotrichum coccodes, economically important phytopathogenic fungi and compared with fungicides have been investigated in the study. Tests were conducted in vitro conditions in eight volumes on a PDA substrate in four replicates. The increase in mycelium was measured on the eighth and fifteenth day after the mycelium inoculation. It was found out that some essential oils and components applied at a given volume have a significant antifungal effect, in some examples comparable to fungicides. Anise and peppermint essential oils as well as the anethole component had the best activity and the lowest IC₅₀. Fifteen days after the inoculation of the mycelium, the essential oils had a significantly better antifungal activity compared to their second most represented component.

Key-words: essential oils, phytopathogenic fungi, fungicides, IC₅₀

(Primljeno 11. srpnja 2018.; prihvaćeno 09. studenoga 2018. - Received on 11 July 2018; accepted on 9 November 2018)