

Izvorni znanstveni rad  
Original scientific paper

## UTJECAJ ETERIČNIH ULJA NA RAST MICELIJA *Globisporangium ultimum* I *Globisporangium irregulare*

Antonia PETRIĆ<sup>1</sup>, Helena EREŠ<sup>1</sup>, Karolina VRANDEČIĆ<sup>2</sup>, Jasenka ČOSIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Studentice diplomskog studija Zaštita bilja, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

<sup>2</sup>Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Zavod za fitomedicinu, Vladimira Preloga 1, 31 000 Osijek  
helena.eres17@gmail.com

Prihvaćeno: 24-06-2021

### SAŽETAK

Provedeno je *in vitro* istraživanje antifungalnog djelovanja devet vrsta eteričnih ulja (anis, bor, cimeta kora, citronela, čajevac, čempres, eukaliptus, klinčić, lavanda) na zemljišne patogene *Globisporangium ultimum* i *Globisporangium irregulare*. Eterična ulja primijenjena su u količinama 5, 15 i 30 µL. Rezultati istraživanja pokazuju da biološka aktivnost eteričnih ulja ovisi o primijenjenoj količini ulja i gljivičnoj vrsti. Osam dana od inokulacije najjače antifungalno djelovanje u svim primijenjenim količinama na *G. ultimum* imala su ulja klinčića, anisa, cimeta kore i citronele, a na *G. irregulare* ulje klinčića. Najslabije djelovanje na obje pseudogljive i u svim količinama imala su ulja bora i čempresa.

**Ključne riječi:** eterična ulja, *Globisporangium*, zona inhibicije

### INFLUENCE OF ESSENTIAL OILS ON MYCELIAL GROWTH OF *Globisporangium ultimum* AND *Globisporangium irregulare*

### SUMMARY

Nine essential oils (anise, pine, cinnamon bark, citronella, tea tree, cypress, eucalyptus, clove, lavender) were tested for *in vitro* antifungal activity on two soilborne phytopathogenic fungi *Globisporangium ultimum* and *Globisporangium irregulare*. Essential oils were applied in three amounts (5, 15 and 30 µL). The zone of inhibition was measured on the fourth and eighth day after the inoculation. The results showed that biological activity of essential oils depends on applied amount of essential oils and fungi species. Eight days after inoculation the best antifungal activity against *G. ultimum* in all applied amounts had clove, anise, cinnamon bark and citronella oils, while against *G.*

*irregulare* the best antifungal activity had clove oil. The weakest antifungal activity on both pathogens in all applied amounts had oils of pine and cypress.

**Key words:** essential oils, *Globisporangium*, zone of inhibition

## UVOD

*Globisporangium ultimum* (Trow.) Uzuhashi, Tojo & Kakish. i *Globisporangium irregulare* (Buisman) Uzuhashi, Tojo & Kakish. zemljišni su polifagni patogeni koji su do 2010. godine pripadali rodu *Pythium* i bili su poznati kao *Pythium ultimum* Trow i *Pythium irregulare* Buisman (Uzuhashi i sur., 2010). Obje su vrste stanovnici poljoprivrednih tala diljem svijeta i uzrokuju ekonomski vrlo značajne štete osobito u početnim stadijima razvoja biljaka domaćina (Ho, 2018).

Suzbijanje uzročnika biljnih bolesti u suvremenoj proizvodnji još uvijek se ponajviše temelji na uporabi kemijskih fungicida, iako je percepcija javnosti o njihovoj uporabi sve negativnija, pojava rezistentnosti sve češća, a zagađenost tala i voda sve veća (Katooli i sur., 2011). Uporaba eteričnih ulja u suzbijanju uzročnika bolesti sve više se istražuje kako u *in vitro* (Sitara i sur., 2008; Palfi, 2017) tako i u *in vivo* uvjetima (Al-Reza i sur., 2010; Aminifard i Mohammadi, 2013; Elshafie i sur., 2015). U rezultatima mnogih istraživanja navodi se da eterična ulja mogu imati značajno fungistatično djelovanje, ali da mogu i stimulirati rast micelija nekih gljiva (Ćosić i sur., 2010; Simas i sur., 2017). Christian (2007), Bittner i sur. (2009), Liosatou (2011), Katooli i sur. (2011), Liu i sur. (2017) ispitivali su učinak različitih eteričnih ulja na rast *Pythium* vrsta koje su važni uzročnici bolesti kultiviranog bilja. Rezultati istraživanja pokazuju da većina eteričnih ulja uključenih u istraživanja imaju zadovoljavajuće antifungalno djelovanje te bi se mogla koristiti u zaštiti bilja osobito u ekološkoj proizvodnji.

Cilj je ovoga istraživanja bio odrediti *in vitro* učinak devet eteričnih ulja na rast micelija dvaju zemljišna patogena uz primjenu 5, 15 i 30  $\mu$ L ulja. Rezultati takvih istraživanja mogu biti prvi korak u pronalaženju novih ekološki prihvatljivih biofungicida.

## MATERIJALI I METODE RADA

Za ispitivanje fungistatičnog djelovanja eteričnih ulja na zemljišne patogene *G. ultimum* (izolat 146, Katedra za fitopatologiju, FAZOS) i *G. irregulare* (izolat 201, Katedra za fitopatologiju, FAZOS) upotrebljavana su sljedeća ulja: anis (*Pimpinella anisum* L.), bor (*Pinus sylvestris* L.), cimet kora (*Cinnamomum verum* Bercht & Presl), citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), čajevac (*Melaleuca alternifolia* Cheel.), čempres (*Cupressus sempervirens* L.), eukaliptus (*Eucalyptus globulus* Labill.), klinčić (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) i lavanda (*Lavandula angustifolia* L.). Ulja su proizvedena i njihov

je kemijski sastav utvrđen u Kemig d.o.o., Sesvete-Soblinec. Sva eterična ulja upotrebljavana su nerazrijeđena i u količinama 5, 15 i 30  $\mu$ L.

Pokus je postavljen prema metodi Saikia i sur. (2001). U sredinu Petrijevih zdjelica promjera 90 mm s 10 mL KDA podloge (krumpir-dekstrozni agar, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) stavljen je kružni isječak sterilnog filter-papira na koji je aplicirana prethodno navedena količina eteričnog ulja. Kružni isječki osam dana starih čistih kultura *G. ultimum* odnosno *G. irregulare* uzgojenih na KDA podlozi stavljeni su nasuprotno na četiri mjesta pri čemu je svaki isječak udaljen 5 mm od ruba Petrijeve zdjelice. U kontrolnoj varijanti umjesto eteričnog ulja postavljen je filter-papir tretiran sterilnom destiliranom vodom. Zdjelice su inkubirane na temperaturi od 22 °C, relativnoj vlažnosti zraka 70 % i svjetlosnom režimu 12 sati svjetlo / 12 sati tama. Četvrti i osmi dan inkubacije obavljeno je mjerenje zone inhibicije rasta *Globisporangium* izolata.

Pokus je za svaku količinu i svako eterično ulje postavljen u tri ponavljanja.

Pri obradi podataka upotrijebljen je program SAS 8.0 (SAS Inst., 1997). Podaci dobiveni u istraživanju obrađeni su analizom varijance. Za usporedbu srednjih vrijednosti upotrijebljen je LSD test za  $P = 0,05$ .

## REZULTATI I RASPRAVA

Djelovanje eteričnih ulja primijenjenih u trima različitim količinama na rast micelija *G. ultimum*. prikazano je u Tablici 1, a na rast micelija *G. irregulare* u tablici 2.

**Tablica 1.** Djelovanje eteričnih ulja na rast micelija *Globisporangium ultimum* (zona inhibicije u mm)

**Table 1** The effect of essential oils on mycelial growth of *Globisporangium ultimum* (inhibition zone in mm)

Ulje	5 $\mu$ L		15 $\mu$ L		30 $\mu$ L	
	4. dan	8. dan	4. dan	8. dan	4. dan	8. dan
Lavanda	0	0	30,0	24,0	23,8	18,7
Citronela	13,0	0	25,0	23,0	30,0	30,0
Čajevac	0	0	30,0	18,3	22,4	22,4
Cimet kora	14,3	0	16,7	15,0	17,6	15,0
Eukaliptus	0	0	0	0	20,7	20,6
Bor	0	0	0	0	0	0
Anis	10,3	0	30,0	18,3	19,4	14,7
Čempres	0	0	0	0	0	0
Klinčić	16,7	15,0	21,0	18,0	23,4	16,4
Kontrola	0	0	0	0	0	0
LSD 0,05	0,26	0,11	0,31	1,17	1,38	1,49

**Tablica 2.** Djelovanje eteričnih ulja na rast micelija *Globisporangium irregulare* (zona inhibicije u mm)**Table 2** The effect of essential oils on mycelial growth of *Globisporangium irregulare* (inhibition zone in mm)

<i>Globisporangium ultimum</i>				
Ulje	5 $\mu$ L	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L	LSD 0,05
Citronela	18,5	30,0	30,0	0,23
Cimet kora	16,4	18,3	20,0	0,79
Anis	10,0	20,0	30,0	0,65
Klinčić	15,7	28,0	25,8	0,42
<i>Globisporangium irregulare</i>				
Klinčić	15,0	18,0	16,4	0,43

Eterična ulja koncentrirane su hidrofobne tekućine u čijem se sastavu nalazi više desetaka kemijskih spojeva od kojih su dva ili tri glavna sastojka, a svi ostali nalaze se u tragovima (Bakkali i sur., 2008). Danas je poznato da mnoga eterična ulja imaju antifungalno djelovanje, a jačina djelovanja ovisi o vrsti i kemijskom sastavu ulja, vrsti gljive te količini i načinu primjene ulja (Palfi, 2017).

Četiri dana od inokulacije uz primjenu 5  $\mu$ L ulja sva su ulja, u odnosu na kontrolu, osim čajevca, eukaliptusa i čempresa imala značajno fungistatično djelovanje na *G. ultimum*, dok na *G. irregulare* fungistatično nisu djelovala ulja čajevca, eukaliptusa, lavande, bora i čempresa. Zona inhibicije se kod ulja koja su imala značajno fungistatično djelovanje kretala od 17,2 mm (cimet kora) do 20,7 mm (anis) za *G. ultimum* odnosno za *G. irregulare* od 10,3 mm (anis) do 16,7 mm (klinčić). Osam dana od inokulacije i micelij *G. ultimum* je prerastao Petrijevu zdjelicu u prisutnosti ulja lavande i bora. Čosić i sur. (2010) navode da ulja lavande i bora primjenjena u istoj količini nisu imala fungistatično djelovanje niti na *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Fusarium oxysporum* Schl., *Fusarium graminearum* Schw., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Diaporthe longicolla* (Hobbs) Santos, Vrandečić & Phillips i *Phomopsis phaseoli* (Desm.) Sacc., da je ulje bora stimuliralo rast *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljč. & Petrov., a ulja bora i lavande stimulirala su rast *Fusarium fujikuroi* Niren. Tanović i sur. (2005) također navode da su ulja bora i naranče od 18 ispitivanih eteričnih ulja imala najslabije antifungalno djelovanje na *Botrytis cinerea* Pers., dok su najjače djelovanje imala ulja timijana, cimeta i anisa. Pri primjeni 15  $\mu$ L ulja eukaliptusa, čempresa i bora micelij obiju ispitivanih pseudogljiva prerastao je Petrijeve zdjelice već nakon četiri dana od nacjepljivanja, dok uz primjenu 30  $\mu$ L četiri dana od inokulacije ulje bora nije imalo supresivno djelovanje na rast niti jedne pseudogljive, a ulje čempresa samo na *G. ultimum*.

Eterična ulja citronele, cimeta kore, anisa i klinčića u svim primijenjenim količinama imala su značajno fungistatično djelovanje na porast *G. ultimum*.

Osam dana od inokulacije na porast micelija *G. irregulare* samo je ulje klinčića djelovalo fungistatično u svim primijenjenim količinama. U tablici 3 prikazane su razlike u jačini djelovanja s obzirom na primijenjenu količinu, i to samo za ulja s najjačim antifungalnim učinkom na ispitivane pseudogljive.

**Tablica 3.** Antifungalno djelovanje eteričnih ulja (zona inhibicije u mm) s obzirom na primijenjenu količinu

**Table 3** Antifungal effect of essential oils (inhibition zone in mm) in relation to the applied amount

Ulje	5 $\mu$ L		15 $\mu$ L		30 $\mu$ L	
	4. dan	8. dan	4. dan	8. dan	4. dan	8. dan
Lavanda	19,8	0	20,0	18,0	30,0	27,3
Citronela	18,5	18,5	30,0	30,0	30,0	30,0
Čajevac	0	0	27,5	8,3	30,0	30,0
Cimet kora	17,2	16,4	20,9	18,3	25,8	20,0
Eukaliptus	0	0	0	0	26,1	20,7
Bor	2,2	0	0	0	0	0
Anis	20,7	10,0	30,0	20,0	30,0	30,0
Čempres	0	0	0	0	5,0	0
Klinčić	18,3	15,7	30,0	28,0	29,0	25,8
Kontrola	0	0	0	0	0	0
LSD 0,05	0,55	0,31	0,97	0,79	0,68	1,06

Eterična ulja citronele i cimeta imala su jednak fungistatični utjecaj na porast *G. ultimum* pri primjeni 15 i 30  $\mu$ L, dok je ulje anisa imalo statistički značajno jače djelovanje pri primjeni 30  $\mu$ L u odnosu na ostale primijenjene količine. Ulje klinčića imalo je najjače supresivno djelovanje na obje pseudogljive pri primjeni 15  $\mu$ L. Brojni autori navode da se u velikom broju slučajeva antifungalno djelovanje eteričnih ulja povećava s povećanjem primijenjene količine (Ziedan i Farrag, 2008; Viuda-Martos i sur., 2008; Hung i sur., 2013; Gebel i Magurno, 2014; Palfi, 2017), ali da isto tako neka ulja imaju jako fungistatično pa čak i fungicidno djelovanje i pri vrlo malim primijenjenim količinama (Palfi, 2017).

### ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja utjecaja devet eteričnih ulja primijenjenih u trima količinama na rast micelija fitopatogenih pseudogljiva *Globisporangium ultimum* i *Globisporangium irregulare* može se zaključiti da učinak ulja ovisi o vrsti eteričnog ulja, primijenjenoj količini, duljini inkubacije i vrsti gljive. U pravilu se inhibitorno djelovanje ulja povećava s povećanjem primijenjene količine te s produljenjem inkubacije. U našem istraživanju nije ustanovljeno stimulativno djelovanje eteričnih ulja na rast ispitivanih gljiva.

## LITERATURA

AL-REZA, S.M., RAHMAN, A., AHMED, Y., KANG, S.C. (2010). Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pestic. Biochem. Physiol., 96(2): 86-92.

AMINIFARD, M.H., MOHAMMADI, S. (2013). Essential oils to control *Botrytis cinerea* in vitro and in vivo on plum fruits. J. Sci. Food Agr., 93(2): 348-353.

BAKKALI, F., AVERBECK, S, AVERBECK, D, IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. Food Chem. Toxicol., 46(2):446-475.

BITTNER, M., AGUILERA, M.A., HERNANDEZ, V., ARBERT, C., BECCERA, J., CASANUEVA, M.E. (2009). Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis phillipiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. Chilean *Monimiaceae*. Chil. J. Agric. Res., 69(1): 30-37.

CHRISTIAN, E.J. (2007). Plant extracted essential oils as a contact fungicide seed treatment for organic corn. Diplomski rad. Iowa State University, USA.

ĆOŠIĆ, 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.

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 postharvest brown rot diseases of peach fruit. Ind. Crops Prod., 66: 11-15.

GEBEL, M.P., MAGURNO, F. (2014). Assessment of the antifungal potential of the essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* causative agent of postharvest grey mould on strawberry fruits. Columella: Journal of agricultural and environmental sciences, 1(2): 17-24.

HO, H.H. (2018). The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium*. Journal of Bacteriology and Mycology, 6(1): 40-45.

HUNG, V.P., CHI, P.T.L., PHI, N.T.L. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. Nat. Prod. Res., 27(4-5): 506-508.

KATOOLI, N., MAGHSODLO, R., RAZAVI, S.E. (2011). Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi. J. Plant Breed. Crop Sci., 3(2): 41-43.

LIOSATOU, G. (2011). The use of essential oils of thyme, lavender and sage on the control of the disease caused by *Pythium ultimum* on tomato in Greece. Doktorski rad. University of Reading, UK.

LIU, X., YAN, D., OUYANG, C., YANG, D., WANG, Q., LI, Y., GUO, M., CAO, A. (2017). Oil extracted from *Eupatorium adenophorum* leaves show potential to control *Pythium myriotylum* in commercially-grown ginger. PLoS ONE, 12(5): e0176126.

PALFI, M. (2017). Antifungalno djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti na fitopatogene gljivice u in vitro uvjetima. Doktorski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku i Institut Ruđer Bošković Zagreb.

SAIKIA, D., KHANUJA, S.P.S., KAHOL, A.P., GURTA, A.P., KUMAR, S. (2001). Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. Current Science, 80: 1264–1266.

SIMAS, D.L.R., DE AMORIM, S.H.B.M., GOULART, F.R.V., ALVIANO, C.S., ALVIANO, D.S., DA SILVA, A.J.R. (2017). Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. Ind. Crops Prod., 98: 108-115.

SITARA, U., NIAZ, I., NASEEM, J., SULTANA, N. (2008). Antifungal effect of essential oils on in vitro growth of pathogenic fungi. Pak. J. Bot., 40(1): 409-414.

TANOVIĆ, B., MILIJAŠEVIĆ, S., TODORVIĆ, B., POTOČNIK, I., REKANOVIĆ, E. (2005). Toxicity of essential oils to *Botrytis cinerea* Pers. in vitro. Pesticidi i fitomedicina, 20(2): 109-114.

UZUHASHI, S., TOJO, M., KAKISHIMA, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. Mycoscience, 51: 337-365.

VIUDA-MARTOS, M., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNANDEZ-LOPEZ, J., PEREZ-ALVAREZ, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food control, 19(12): 1130-1138.

ZIEDAN, E.H.E., FARRAG, E.S. (2008). Fumigation of peach fruits with essential oils to control postharvest decay. Res. J. Agric. Biol. Sci., 4(5): 512-519.