

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja *Melissa officinalis* i *Myrtus communis*

Sadržaj

Provedeno je *in vitro* istraživanje volatilnog djelovanja eteričnih ulja *Melissa officinalis* i *Myrtus communis* na fitopatogene gljive *Macrophomina phaseolina*, *Alternariaster helianthi*, *Alternaria radicina*, *Stromatinia cepivora*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* i *Verticillium dahliae*. Eterična ulja primijenjena su u količinama da volumni udio ulja u zraku bude 0,01; 0,03 i 0,05 %. Antifungalno djelovanje ulja ovisilo je o vrsti eteričnog ulja, volumnom udjelu ulja u zraku i vrsti gljive. Eterično ulje mirte nije inhibiralo porast gljiva *S. sclerotiorum*, *A. radicina*, *B. cinerea* i *V. dahliae* dok ulje matičnjaka nije inhibiralo rast *S. sclerotiorum*, *A. radicina* i *V. dahliae* niti pri najvećoj primjenjenoj količini ulja.

Ključne riječi: eterična ulja, matičnjak, mirta, fitopatogene gljive

Uvod

Fitopatogene gljive, ovisno o vrsti te vrsti i osjetljivosti biljke domaćina i agroklimatskim uvjetima, mogu značajno smanjiti količinu i kakvoću prinosa. *Macrophomina phaseolina*, uzročnik suhe ili ugljenaste truleži, je u svijetu široko rasprostranjeni, polifagni fakultativni parazit s više od 500 biljnih domaćina (Marquez i sur. 2021). *Alternariaster helianthi* je fakultativni parazit, uzročnik smeđe crne koncentrične pjegavosti suncokreta prisutan u svim uzgojnim područjima ove biljne vrste (Prasad i sur.). Osim na kultiviranom i divljim vrstama suncokreta ovaj je patogen utvrđen i na običnom ricinusu (*Ricinus communis*), proljetnoj ivančici (*Leuchanthemum vulgare*) i ciniji (*Zinnia elegans*). *Alternaria radicina* je uzročnik crne truleži ili crne pjegavosti mrkve, a danas je prisutna u svim područjima gdje se mrkva uzgaja (Trivedi, 2010.). Bijela trulež češnjaka i luka bolest je koju uzrokuje gljiva *Stromatinia cepivora* i značajan je limitirajući čimbenik proizvodnje ovih kultura u cijelom svijetu. *Sclerotinia sclerotiorum* (uzročnik bijele truleži) i *Botrytis cinerea* (uzročnik sive plijesni) pripadaju najdestruktivnijim biljnih patogenima diljem svijeta s više od 600 odnosno 400 biljnih vrsta domaćina. *Monilinia laxa* je uzročnik paleži cvijeta i mladica te truleži plodova koštičavog, ali i nekih vrsta jezgričavog voća na kojima može izazvati ekonomski značajne gubitke. *Verticillium dahliae* je uzročnik verticilij-skog venuća velikog broja uzgajanih i divljih biljnih vrsta (Inderbitzin i Subbaro, 2014.).

¹ Irena Brajković, studentica Diplomskog studija Zaštita, prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrrobiotehničkih znanosti Osijek, V. Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska
² Dunja Ćosić, mag. math., III gimnazija, Kamila Firingera 14, Osijek
Autor za korespondenciju: jassenkacosic1968@gmail.com

Uporaba kemijskih fungicida tijekom vegetacije i skladištenja još uvijek je najučinkovitiji i najčešći način zaštite biljaka i biljnih proizvoda od uzročnika bolesti. S druge strane, znanja o nizu negativnih posljedica njihove uporabe na ljudsko zdravlje, okoliš i populaciju patogena posljednjih su desetljeća rezultirala brojnim istraživanjima alternativnih proizvoda s ciljem pronalazjenja onih koji bi se mogli iskoristiti za proizvodnju biofungicida (Nguyen i sur., 2017.). Nepoželjni učinci kemijskih fungicida uključuju opasnost za ljude pri rukovanju s fungicidima, ostatke u hrani, hrani za životinje, tlu i vodi (Faraj i sur., 2024), razvoj rezistentnih populacija patogena (Yin i sur., 2023.) te izrazito negativan utjecaj na bioraznolikost (Munoz-Leoz i sur., 2011.).

Biološka aktivnost eteričnih ulja, koja uključuje i njihovo antifungalno djelovanje, poznata je stoljećima, a potvrđena je brojnim znanstvenim istraživanjima. Eterična ulja su aromatske hlapljive uljne tekućine vrlo složenog kemijskog sastava. Način djelovanja eteričnih ulja do danas nije potpuno poznat, ali se smatra da utječu na propusnost staničnih membrana i membrana staničnih organela kao i da dovode do morfološke degeneracije stanica što dovodi do promjena u metabolizmu i funkcioniranju stanica i do njihove smrti (Omar i Kordali, 2019.).

Cilj ovoga istraživanja je bio utvrditi volatilno antifungalno djelovanje eteričnih ulja mirte i matičnjaka na rast osam fitopatogenih gljiva u *in vitro* uvjetima.

Materijali i metode rada

Istraživanje volatilnog djelovanja eteričnih ulja matičnjaka (*Melissa officinalis*) i mirte (*Myrtus communis*) na fitopatogene gljive *Macrophomina phaseolina*, *Alternariaster helianthi*, *Alternaria radicina*, *Stromatinia cepivora*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* i *Verticillium dahliae* provedeno je u Centralnoj agrobiotehničkoj analitičkoj jedinici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

Eterična ulja korištena u istraživanju proizvedena su i analizirana upotrebom GC-MC (plinska kromatografija – masena spektrofotometrija) u tvrtci Kemig Ltd., Sesvete – Soblinec, Hrvatska. Izolati gljiva dio su kolekcije fitopatogenih gljiva Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

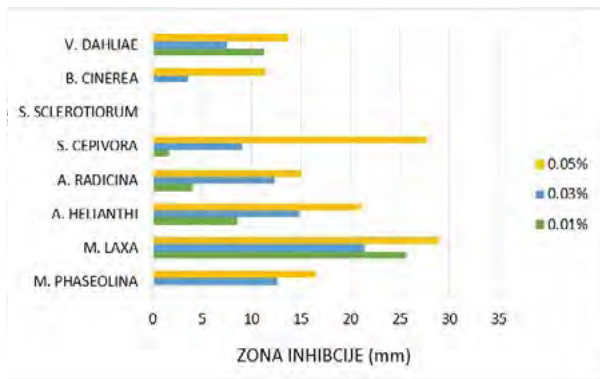
Pokus je postavljen u tri ponavlja prema modificiranoj metodi Saikia i sur. (2001). Eterična ulja su primijenjena u količinama da volumni udio ulja u zraku bude 0,01; 0,03 i 0,05 %. U sredinu Petrijevih zdjelica (promjer 90 mm, V = 65 mL) s 15 mL KDA podloge (krumpir-dekstrozni agar) postavlja se kružni isječak sterilnog filter papira promjera 4 mm na koji se aplicira eterično ulje kako bi se dobio pokusom predviđeni volumni udio ulja u zraku. Isječki KDA podloge promjera 5 mm s razvijenim micelijem gljive postavljaju se na podlogu na četiri nasuprotna mjesta udaljena 5 mm od ruba zdjelice.

Petrijeve zdjelice stavljene su u termostat komoru na temperaturu 22°C, relativnu vlagu zraka 70 % i režim svjetla 12 sati svjetlo / 12 sati tama pri čemu se prati rast micelija gljive (mm). Zona inhibicije mjerena je 168 sati od inokulacije.

Svi dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu R (verzija 4.3.1). Podaci su analizirani Kruskal-Wallis testom i Dunn testom na razini $p < 0,05$.

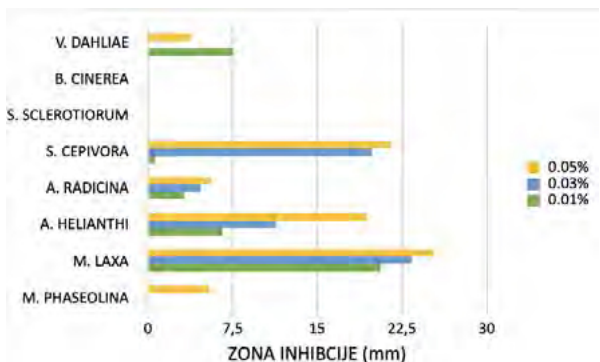
Rezultati i rasprava

Rezultati istraživanja volatilnog djelovanja eteričnih ulja *Melissa officinalis* (matičnjak) i *Myrtus communis* (mirta) primijenjenih u tri različite količine 168 sati od inokulacije pokazuju njihov značajan učinak na rast micelija uzročnika biljnih bolesti ovisno o vrsti ulja, vrsti ciljane fitopatogene gljive i primjenjenoj količini (grafikon 1 i 2).



Grafikon 1. Zona inhibicije uz primjenu različitih količina eteričnog ulja *Melissa officinalis*

Graph 1. Zone of inhibition depending on the amount of *Melissa officinalis* essential oil



Grafikon 2. Zona inhibicije uz primjenu različitih količina eteričnog ulja *Myrtus communis*

Graph 2. Zone of inhibition depending on the amount of *Myrtus communis* essential oil

Posljednjih je desetljeća proveden velik broj istraživanja utjecaja eteričnih ulja na rast i formiranje reproduktivnih organa različitih fitopatogenih gljiva (Sarkosh i sur. 2017., Sharma i sur. 2017., Parikh i sur. 2021., Allagui i sur. 2023.). Antifungalno djelovanje ulja mirte i matičnjaka na neke fitopatogene gljive kao što su *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum lentis*, *Didymella pisi*, *Fusarium solani*, *Fusarium avenaceum*, *Pythium sylvaticum*, *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum* utvrđeno je u istraživanjima Curini i sur. (2003.), Slim i sur. (2017.) i Parikh i sur. (2021.).

Analizom naših podataka dobivenih mjerenjem zone inhibicije utvrđeno je da se antifungalno djelovanje eteričnih ulja u pravilu pojačava s povećanjem primjenjene količine što je u skladu s rezultatima istraživanja Curini i sur. (2003.), El Ouadi i sur. (2017.), Palfi (2017), Slim i sur. (2017.) i Shybat i sur. (2021.). Volumni udio eteričnih ulja u našem istraživanju kretao se između 0,01 i 0,05 % pri čemu nije utvrđena potpuna inhibicija rasta niti jedne istraživane gljive i niti u jednoj primjenjenoj količini.

Micelij gljive *Sclerotinia sclerotiorum* kod primjene obadva ulja i u sve tri količine te micelij *Botrytis cinerea* kod primjene ulja mirte u sve tri količine potpuno je prerastao Petrijeve zdjelice što znači da nije bilo negativnog utjecaja istraživanih ulja na rast navedenih gljiva. Obzirom da djelovanje eteričnog ulja ovisi o brojnim čimbenicima poput načina primjene i količine primijenjenog ulja te kemijskom sastavu ulja na koji utječu agroklimatski uvjeti uzgoja i vrijeme berbe ne iznenađuju vrlo različiti rezultati o utjecaju određenog ulja na neki ciljani organizam. Tako su naši rezultati o izostanku supresivnog ulja mirte na rast *Sclerotinia sclerotiorum* i u tretmanu s najvećom primijenjenom količinom ulja potpuno suprotni rezultatima Slim i sur. (2017.) koji navode da je ulje mirte u potpunosti inhibiralo rast navedene gljive, ali pri tome treba uzeti u

obzir da smo u našem istraživanju ispitivali volatilno djelovanje, a navedeni autori kontaktno djelovanje ulja što, pored ostaloga, može značajno utjecati na dobivene rezultate.

U tretmanima s gljivama *Monilinia laxa*, *Alternariaster helianthi*, *Alternaria radicina* i *Stromatinia cepivora* utvrđeno je postojanje zone inhibicije pri primjeni sve tri količine obadva eterična ulja. U varijantama pokusa s *Macrophomina phaseolina*, *Monilinia laxa*, *Alternaria radicina* i *Stromatinia cepivora* utvrđeno je da je pri primjeni ulja mirte u količini pri kojoj je volumni udio ulja u zraku 0,05 % zona inhibicije značajno veća u odnosu na varijante pokusa u kojima je volumni udio bio 0,01 %. Za gljive *Macrophomina phaseolina*, *Alternariaster helianthi* i *Alternaria radicina* također je utvrđena značajno veća zona inhibicije kada je volumni udio ulja 0,05 % u odnosu na 0,03 %. Kod *Verticillium dahliae* zona inhibicije je bila značajno veća kada je volumni udio ulja bio 0,03 % u odnosu na tretman u kojem je volumni udio ulja u zraku bio 0,01 %.

Značajno jače antifungalno djelovanje ulja matičnjaka kada je volumni udio ulja 0,05 % u odnosu na tretman kada je volumni udio ulja 0,01 % utvrđeno je za gljive *Macrophomina phaseolina*, *Alternariaster helianthi*, *Alternaria radicina*, *Stromatinia cepivora* i *Botrytis cinerea* dok je značajno jače antifungalno djelovanje ulja pri volumnom udjelu 0,05 % u odnosu kada je volumni udio 0,03 % utvrđeno za gljive *Monilinia laxa* i *Verticillium dahliae*.

Antifungalni potencijal ulja mirte i matičnjaka, ali i brojnih drugih eteričnih ulja na istraživane gljive (Yohalem i Passey 2011., El-Mohamedy i sur. 2013., Elshafie i sur. 2015., Grgić i sur. 2016.) ukazuje na potrebu daljnjih in vitro i in vivo istraživanja koja mogu biti temelj za razvoj učinkovitih i ekološki prihvatljivih biofungicida.

Zaključak

Temeljem provedenih istraživanja o volatilnom utjecaju eteričnih ulja matičnjaka *Melissa officinalis* i mirte *Myrtus communis* primijenjenih u količinama da je volumni udio ulja u zraku 0,01 %, 0,03 % i 0,05 % na rast fitopatogenih gljiva *Macrophomina phaseolina*, *Alternariaster helianthi*, *Alternaria radicina*, *Stromatinia cepivora*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* i *Verticillium dahliae* može se zaključiti da učinak ulja ovisi o ciljanom organizmu te vrsti i primijenjenoj količini eteričnog ulja. U pravilu se antifungalno djelovanje ulja povećava s povećanjem primijenjene količine. Budući da istraživana eterična ulja djeluju supresivno na rast gotovo svih gljiva uključenih u istraživanje neophodna su daljnja istraživanja čiji bi rezultati mogli dovesti do razvoja učinkovitih i ekološki prihvatljivih sredstava za suzbijanje uzročnika biljnih bolesti.

Literatura

- Allagui, M.B., Mounni, M., Romanazzi, G. (2023)** Antifungal Activity of Thirty Essential Oils to Control Pathogenic Fungi od Postharvest Decay. *Antibiotics*, 13(1), 28. DOI: doi.org/10.3390/antibiotics13010028
- El-Mohamedy, R.S., Abdel-Kader, M.M., Abd-El-Kareem, F., El-Mougy, N.S. (2013)** Essential oils, inorganic acids and potassium salts as control measures against the growth of tomato root rot pathogens in vitro. *Journal of Agricultural Technology*, 9(6), 1507-1520.
- El Ouali, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H., Shariati, M.A., Melhaoui, A., Hammouti, B. (2017)** Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from North-East Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microbial Pathogenesis*, 107, 1-6. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.04.004
- 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 disease of peach fruit. *Ind. Crops Prod.*, 66, 11-15.
- Faraj, T.K., El-Saeid, M.H., Najim, M.M.M., Chieb, M. (2024)** The Impact of Pesticide Residues on Soil Health for Sustainable Vegetable Production in Arid Areas. *Separations*, 11(2), 46. DOI: 10.3390/separations11020046

Grgić, S., Ćosić, J., Rebekić, A., Vrandečić, K. (2016) Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *Botrytis cinerea*. Poljoprivreda, 22(2), 29-33. DOI: 10.18047/poljo.22.2.5

Marquez, N., Giachero, M.L., Decklerck, S., Ducasse, D.A. (2021) *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 634397.

Muñoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I., Garbisu, C. (2011) Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biol Biochem.*, 43, 2176–2183. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.07.001

Nguyen, P.A., Strub, C., Fontana, A., Schorr-Galindo, S. (2017) Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biol. Control.*, 104, 10-27. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.10004

Omar, M.S., Kordali, S. (2019) Review of Essential Oils as Antifungal Agents for Plant Fungal Diseases. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2), 294-301.

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.

Parikh, L., Agindotan, B.O., Burrows, M.E. (2021) Antifungal Activity of Plant-Derived Essential Oils on Pathogens of Pulse Crops. *Plant Disease*, 105, 1692-1071.

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.

Sarkhosh, A., Schaffer, B., Vargas, A.I., Palmateer, A.J., Lopez, P., Soleymani, A., Farzaneh, M. (2017.) Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit. *Biological Agriculture & Horticulture*, 43(1): 18-26.

Sharma A, Rajendran S, Srivastava A, Sharma S, Kundu B. 2017. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *J Biosci Bioeng* 123(3):308-313.

Shybat, Z.L., Abdoul-latif, F.M., Ainane, A., Tarik, A. (2017.) Antifungal activity of the essential oils of the Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.). application in agriculture. *Pharmacologyonline*, 2: 485-491.

Slim, S., Azouzi, M., Salah, M., Mohamed, Y.B., Ayed, F., Louhaichi, M. (2017) Antifungal Activity of Essential Oil from Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.). *Sylwan*, 161(9), 63-78.

Trivedi, R.K.S. (2010) Strategies to control *Alternaria radicina* in carrot seed production. PhD thesis, Lincoln University, Canterbury, New Zeland.

Yohalem, D., Passey, T. (2011) Amendment of soils with fresh and post-extraction lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavender (*Lavandula × intermedia*) reduce inoculum of *Verticillium dahliae* and inhibit wilt in strawberry. *Appl. Soil Ecol.*, 49, 187196.

Yin, Y., Miao, J., Shao, W., Liu, X., Zhao, Y., Ma, Z. (2023) Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management. *Phytopathology*, 13, 707-718. DOI: 10.1094/PHYTO-10-22-0370-KD

Prispjelo/Received: 29.8.2024.

Prihvaćeno/Accepted: 30.9.2024.

Original scientific paper

Antifungal activity of *Melissa officinalis* and *Myrtus communis* essential oils

Abstract

An in vitro study of the volatile effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) and *Myrtus communis* (myrtle) essential oils on phytopathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*, *Alternariaster helianthi*, *Alternaria radicina*, *Stromatinia cepivora*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* and *Verticillium dahliae* was carried out. Essential oils were applied that the volume fraction of oil in the air was 0.01; 0.03 and 0.05 %. The antifungal effect of the oil depended on the type of essential oil, the volume fraction of the oil in the air and the type of fungus. Myrtle essential oil did not inhibit the growth of *S. sclerotiorum*, *A. radicina*, *B. cinerea* and *V. dahliae*, while lemon balm oil did not inhibit the growth of *S. sclerotiorum*, *A. radicina* and *V. dahliae* even at the highest applied amount of oil.

Key words: essential oils, lemon balm, myrtle, phytopathogenic fungi