

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja domaćinoga bilja Hrvatske na uzročnika sive plijesni (*Botrytis cinerea*) s vinove loze

Antifungal effect of essential oils from the native Croatian flora on the suppression of the *Botrytis cinerea* fungus in grapevines

Jelenić, J., Ilić, J., Ćosić, J., Vrandečić, K., Velki, M.

Poljoprivreda/Agriculture

ISSN: 1848-8080 (Online)

ISSN: 1330-7142 (Print)

<http://doi.org/10.18047/poljo.26.2.7>



Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Poljoprivredni institut Osijek

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Agricultural Institute Osijek

ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA DOMICILNOGA BILJA HRVATSKE NA UZROČNIKA SIVE PLIJESNI (*Botrytis cinerea*) S VINOVE LOZE

Jelenić, J.⁽¹⁾, Ilić, J.⁽¹⁾, Čosić, J.⁽¹⁾, Vrandečić, K.⁽¹⁾, Velki, M.⁽²⁾

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

SAŽETAK

U istraživanju je ispitivano djelovanje eteričnih ulja domicilnoga bilja Hrvatske na supresiju rasta micelija *Botrytis cinerea* izoliranoga s vinove loze. U pokusu su korištena ulja sljedećih biljaka: metvice paprene (*Mentha x piperita*), kadulje (*Salvia officinalis*), ružmarina (*Rosmarinus officinalis*), lavandina (*Lavandula hybrida*), mravinaca (*Origanum compactum*), timijana (*Thymus vulgaris*), gospine trave (*Hiperici oleum*), stolisnika (*Achillea millefolium*) i smilja (*Helichrysum italicum*). Rezultati in vitro volatilnog testa i makrodilucijskoga testa pokazali su da ulja timijana i paprene metvice mogu imati pozitivan utjecaj na inhibiciju rasta gljive *Botrytis cinerea* pri svim ispitivanim koncentracijama te da fungistatski učinak traje i preko 96 h. Primjena ulja stolisnika i gospine trave u makrodilucijskoj metodi dala je bolje rezultate u odnosu na volatilnu metodu. Eterično ulje smilja stimuliralo je porast micelija *B. cinerea* u obje metode. S obzirom na smanjenje porasta micelija *B. cinerea* u uvjetima in vitro, eterična ulja, kao biofungicidi, predstavljaju moguću zamjenu za sintetske pripravke u suzbijanju razvoja sive plijesni na vinovoj lozi, no potrebna su dodatna istraživanja kako u uvjetima in vitro, tako i u uvjetima in vivo.

Ključne riječi: *Botrytis cinerea*, vinova loza, volatilna metoda, makrodilucijska metoda, eterična ulja, biofungicidi

UVOD

Botrytis cinerea izaziva sivu plijesan na više od 240 biljnih vrsta i jedan je od najvažnijih patogena u povrtlarскоj, voćarskoj, vinogradarskoj i cvjećarskoj proizvodnji (Hahn, 2014.). U svijetu, ekonomske štete bilježe se u milijardama dolara, a gubitci na prinosima u određenim godinama prelaze i 50% (Panebianco i sur., 2015.).

Od početka 90-tih godina prošloga stoljeća u primjeni je nekoliko aktivnih tvari (boskalid, fludioksonil, fenheksamid itd.) u borbi protiv uzročnika sive plijesni (Panebianco i sur., 2015.). Učestali tretmani fungicidima istoga mehanizma djelovanja doveli su do geografske, genetičke i fenotipske raznolikosti rezistentnih sojeva *B. cinerea* (Amiri i sur., 2013., Avenot i sur. 2018.). Velik broj istraživanja pokazuje da je rezistentnost postala izrazito velik problem u modernoj poljoprivrednoj proizvodnji, te je većina standardnih botritricida izgubila učinkovitost (Hahn, 2014.). S obzirom na značajne ekonomske gubitke, uz konvencionalne mjere zaštite potrebno je uvoditi i biološke mjere u suzbijanju gljive *B. cinerea*.

Djelatne tvari izolirane iz biljaka poput hidroalkoholnih ekstrakata i eteričnih ulja, endofitni organizmi,

biostimulanti na bazi anorganskih spojeva, samo su neki od bioloških pripravaka koji se mogu koristiti u borbi protiv uzročnika sive plijesni.

Prema kemijskoj su definiciji eterična ulja hlapljive aromatske hidrofobne tekućine dobivene iz biljnih dijelova kao što su kora, cvjetovi, plodovi, listovi i sl. (Nazzaro i sur., 2017.). Zbog velikoga broja sekundarnih metabolita (monoterpeni, seskviterpeni te njihovi oksigenirani derivati) eterična ulja posjeduju antibakterijsko, antivirusno, antifungalno te insekticidno djelovanje (Palfi i sur., 2018.). Iako točan mehanizam djelovanja eteričnih ulja još uvijek nije poznat, smatra se da eterična ulja nepovoljno utječu

(1) Jelena Jelenić, mag. ing. agr. (jelena.jelenic33@gmail.com), izv. prof. dr. sc. Jelena Ilić, prof. dr. sc. Jasenka Čosić, prof. dr. sc. Karolina Vrandečić – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska, (2) izv. prof. dr. sc. Mirna Velki – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju, Cara Hadrijana 8a, 31000 Osijek, Hrvatska

na stanične membrane i enzimsku aktivnost unutar stanica patogena te na taj način uzrokuju destabilizaciju metabolizma i narušavanje normalnih funkcija stanice (Bakkali i sur., 2008., Macwan i sur., 2016., Nazzaro i sur., 2017).

Među prvim istraživanjima utjecaja eteričnih ulja na porast fitopatogenih gljiva korišteno je eterično ulje čajevca *Melaleuca alternifolia*, koje je testirano kao inhibitor porasta gljive *B. cinerea* s biljke kupusa (*Brassica oleracea*) (Bishop i Reagan, 1998.).

Osim eteričnoga ulja čajevca, i eterično ulje mažorana (*Majorana hortensis*) pokazalo je jako antifungalno djelovanje protiv *Phytophthora citrophthora*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum acutatum* i *B. cinerea* te antibakterijsko djelovanje protiv dva soja Gram-pozitivnih bakterija i pet sojeva Gram-negativnih bakterija (El-Mohamedy, 2013.).

U istraživanju koje su proveli Stupar i sur. (2014) eterično ulje primorskoga smilja pokazalo je jako antifungalno djelovanje na izolate gljiva *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *B. cinerea*, *Bipolaris spicifera*, *Epicoccum nigrum*, *Penicillium* sp. i *Trichoderma viride*. Inhibicija porasta primijećena je pri koncentracijama od 25 µg/mL.

U istraživanjima Vitoratosi i sur. (2013.), da Silve Bomfim i sur. (2015.) te Sharme i sur. (2017.) potvrđena je jaka antifungalna aktivnost eteričnih ulja ružmarina i klinčića na inhibiciju rasta izabranih vrsta roda *Fusarium*. Mikroskopskom analizom utvrđene su rupturi citoplazme i stanične stijenke. Eterična ulja ružmarina i klinčića uzrokovala su smanjenje klijavosti spora, rupturi stanične stijenke i istjecanje citoplazme, dehidraciju konidija i nemogućnost razvoja hifa.

Zbog navedenih svojstava eteričnih ulja postavljeno je istraživanje s ciljem utvrđivanja utjecaja devet eteričnih ulja domicilne flore – metvica paprena (*Mentha x piperita*), kadulja (*Salvia officinalis*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), lavandin (*Lavandula hybrida*), mravinac (*Origanum compactum*), timijan (*Thymus vulgaris*), gospina trava (*Hiperici oleum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) i smilje (*Helichrysum italicum*) – na porast micelija gljive *Botrytis cinerea*, uzročnika sive plijesni.

MATERIJAL I METODE

Ispitivan je utjecaj čistih eteričnih ulja sljedećih biljaka: metvica paprena (*Mentha x piperita*), kadulja (*Salvia officinalis*), ružmarin (*Rosmarinus officinalis*), lavandin (*Lavandula hybrida*), mravinac (*Origanum compactum*), timijan (*Thymus vulgaris*), gospina trava (*Hiperici oleum*), stolisnik (*Achillea millefolium*) i smilje (*Helichrysum italicum*) na porast micelija gljive *B. cinerea* izolirane s vinove loze. Eterična ulja proizvedena su i analizirana upotrebom GC-MC (plinske kromatografije – masene spektrometrije) u Kemigu d. o. o., Sesvete-Soblinec, Hrvatska. Istraživanje je provedeno u Centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Volatilna metoda *in vitro*

Tjedan dana stare kulture *B. cinerea* izolirane su s vinove loze (sorta graševina) i uzgojene na KDA podlozi (krumpir – dekstrozni agar, *Biolife*).

Eterična ulja su primijenjena u količinama od 3, 5, 10 i 15 µL po Petrijevoj zdjelici. Svaka Petrijeva zdjelica sadržavala je 10 mL KDA podloge te je sterilni filter papir promjera 5 mm postavljen u sredinu zdjelice (Ø 90 mm). Na 5 mm od ruba zdjelice križno su postavljena četiri kružna isječka (Ø5 mm) čiste kulture gljive *B. cinerea*. Na središnji filter-papir mikropipetom su nanosene pret hodno navedene količine eteričnih ulja. Petrijeve zdjelice (okrenute poklopcem prema gore) inkubirane su u klima-komori na 22°C tijekom 96 h pri svjetlosnom režimu 12 h noć/12 h dan. Pokus je postavljen u tri ponavljanja. Kontrolna varijanta priređena je na isti način, uz jedinu razliku što je središnji filter-papir, umjesto eteričnim uljem, tretiran istom količinom sterilne destilirane vode. Zone inhibicije mjerene su 48, 72 i 96 h od postavljanja pokusa tako da je izmjerena udaljenost od sredine zdjelice, tj. sredine filter-papira s eteričnim uljem, do ruba micelija gljive. Za procjenu statističke značajnosti utjecaja ispitivanih eteričnih ulja u odnosu na kontrolu primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (*One-Way ANOVA*) te kao *post hoc* Dunnettov test višestruke usporedbe. Razlike su smatrane statistički značajnima na razini $p \leq 0,05$.

Makrodilucijska metoda *in vitro*

Antifungalna aktivnost devet eteričnih ulja ispitivana je prema modificiranoj makrodilucijskoj metodi (Lui i sur., 2002.) na KDA (krumpir – dekstrozni agar, *Biolife*) podlozi.

KDA za makrodilucijsku metodu je pripremljen na način da je KDA otopljen u destiliranoj vodi u koncentraciji od 39 g/L i steriliziran na 120°C u trajanju od 20 min. Suspenzija konidija gljive *B. cinerea* pripremljena je u deioniziranoj vodi, a koncentracija konidija utvrđena je uz pomoć hemocitometra. U pokusu je korištena koncentracija od 10⁶ konidija/mL.

KDA podloga je držana u vodenoj kupelji na 60°C kako bi se izbjeglo stvrdnjavanje. Podloga je izlivena u mikrotitarske jamice u volumenu od 1 mL po jamici te je neposredno prije stvrdnjavanja u svaku jamicu dodano 10 µL vodene suspenzije konidija.

Tako pripremljena podloga ostavljena je u klima-komori na 22°C. Nakon 24 h u svaku jamicu (na površinu KDA podloge) dodano je 25, 50, 75 odnosno 100 µL pojedinog eteričnoga ulja. U kontrolne jamice je umjesto ulja dodana sterilna destilirana voda u istim volumenima. Mikrotitarske pločice poklopljene su originalnim poklopcem i vraćene u klima-komoru na 22°C tijekom 96 h pri svjetlosnome režimu 12 h noć/12 h dan. Nakon isteka 96 h očitani su rezultati na način da je izmjeren promjer gljive koja je tijekom 96 h narasla u jamici (promjer jamice je 1 cm, pa stoga potpuno prerasla jamica označuje 100 % porasta micelija gljive). Skala od 0 do 4 korištena je za prikaz rezultata, pri čemu

- 0 = nema razvoja gljive, maksimalna supresija rasta
- 1 = 25% porasta micelija gljive (promjer gljive do 0,25 cm)
- 2 = 50% porasta micelija gljive (promjer gljive od 0,25 cm do 0,50 cm)
- 3 = 75% porasta micelija gljive (promjer gljive od 0,50 cm do 0,75 cm)

4 = 100% porasta micelija gljive (promjer gljive od 0,75 cm do 1 cm, odnosno potpuno prerasla jamica).

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati dobiveni primjenom volatilne metode *in vitro*, 48 h nakon inokulacije, pokazali su značajan učinak vrste i količine ulja na porast micelija *B. cinerea*. Ovisno o ulju, utjecaj je bio ili supresivnoga karaktera ili je, suprotno tome, pojedino eterično ulje imalo stimulativan utjecaj na rast gljive (Tablica 1). Uočeno je da su eterična ulja timijana i paprene metvice pri svim ispitivanjima

koncentracijama inhibitorno djelovala na porast micelija *B. cinerea*, dok je kod ulja kadulje i ružmarina uočena supresija porasta samo pri količini 10 i 15 μL . Ulje lavandina imalo je fungistatičan učinak već pri primijenjenoj količini od 5 μL . Ulja mravinca, gospine trave, stolisnika i smilja djelovala su stimulativno na porast micelija 48 h nakon tretmana. Ulja paprene metvice i timijana djelovala su fungistatično 96 h nakon tretmana pri svim koncentracijama, dok je kod ostalih ulja micelij nesmetano nastavio s rastom.

Tablica 1. Razlike u utjecaju ulja na porast gljive *B. cinerea* 48 h nakon inokulacije

Table 1. Differences between oil treatments on the growth of *B. cinerea* 48 h subsequent to the inoculation

Inhibicija (-) / Stimulacija (+) rasta 48 h nakon inokulacije Suppression (-) / Stimulation (+) of growth after 48 h after inoculation	% promjene u porastu micelija % of change in the micelium growth			
Kontrola u korelaciji s eteričnim uljem Control in correlation with the essential oil	Primjena 3 μL Application of 3 μL	Primjena 5 μL Application of 5 μL	Primjena 10 μL Application of 10 μL	Primjena 15 μL Application of 15 μL
Control vs <i>H. oleum</i>	+ 8%	+ 18% **	+ 15% *	+ 18% ***
Control vs <i>A. millefolium</i>	+ 5%	+ 6%	+ 7%	- 14% *
Control vs <i>H. italicum</i>	+ 20% ***	+ 15% **	+ 9%	+ 7%
Control vs <i>L. hybrida</i>	+ 3%	- 20% ***	- 100% ***	- 100% ***
Control vs <i>S. officinalis</i>	+ 9%	- 24% **	- 53% ***	- 84% ***
Control vs <i>M. piperita</i>	- 100% ***	- 100% ***	- 100% ***	- 100% ***
Control vs <i>T. vulgaris</i>	- 100% ***	- 100% ***	- 100% ***	- 100% ***
Control vs <i>R. officinalis</i>	+ %	- 7 %	- 18% *	- 33% ***
Control vs <i>O. compactum</i>	+ 35% ***	+ 21% ***	+ 16%	+ 5%

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,0001$ (ANOVA, *post hoc* Dunnett)

Djelovanje timijana i paprene metvice 96 h nakon tretmana u skladu je s istraživanjem Sumalan i sur. (2013.), u kojem je utvrđeno da ulja matičnjaka, kadulje, paprene metvice i timijana zadržavaju fungistatično djelovanje i 120 h nakon tretmana. U istraživanju Palfi i sur. (2019.a) ulje timijana u količini od 15 $\mu\text{L}/10\text{ mL}$ KDA inhibiralo je razvoj micelija *B. cinerea* 192 h nakon postavljanja pokusa. Djelovanje lavandina i ružmarina na inhibiciju rasta micelija *B. cinerea* u našem istraživanju u skladu je s istraživanjima Soyulu i sur. (2010.). Naime, ulja lavandina i ružmarina suzbila su razvoj micelija pri koncentraciji od 5 i 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Spomenuta ulja testirana su u suzbijanju *B. cinerea* u proizvodnji rajčice, a inhibirala su porast sive plijesni u potpunosti pri svim ispitivanim koncentracijama testnih mješavina (Soyulu i sur., 2010.). U istome istraživanju ulje mravinca pokazalo je jako fungistatično djelovanje na porast micelija sive plijesni. Inhibiciju rasta micelija *B. cinerea* i inhibiciju klijanja konidija dokazali su i Adebayo i sur. (2013.), no u ovom istraživanju ulje mravinca djelovalo je stimulativno na porast micelija pri svim ispitivanim volumenima.

Prema istraživanju Ferreire i sur. (1998.), ukoliko ulje mravinca nije bogato monoterpenom cimofenolom, ono ne posjeduje antifungalno djelovanje. Figueredo i

sur. (2006.) i Diaz Maroto i sur. (2006.) utvrdili su da prinos eteričnoga ulja, odnosno komponenata ulja, kod vrsta roda *Oreganum* i *Foeniculum* uvelike ovisi o okolišnim čimbenicima, od kojih je najvažnija nadmorska visina. Naime, ako biljka raste na višim nadmorskim visinama izložena je dužem periodu suše i manjem porastu, što ulja čini koncentriranijima i bogatijima monoterpenom cimofenolom, koji djeluje antifungalno. Iako u ovome istraživanju nije mjerena koncentracija pojedinih komponenata eteričnih ulja, iz prijašnjih i rezultata ovoga istraživanja moguće je uočiti razlike u djelovanju eteričnih ulja, koje su direktno povezane s udjelom sekundarnih metabolita. Navedene razlike bit će potrebno dodatno istražiti u budućim istraživanjima.

Razlike u djelovanju eteričnih ulja primijećene su i kod stolisnika, koji u volatilnoj metodi nije uspio suzbiti rast *B. cinerea*, što je suprotno rezultatima istraživanja Iacomi i sur. (2000.). Spomenuti autori dokazali su da stolisnik ima jako inhibitorno djelovanje na porast izolata micelija *B. cinerea* s patlidžana. Također, u istraživanju koje su proveli Sesan i sur. (2015.) ispitivana su ulja *Tagetes patula*, *Rosmarinus officinalis*, *Satureja hortensis*, *Allium sativum*, *Artemisia dracuncululus* 'Sativa', *Valeriana officinalis*, *Achillea millefolium* i *Mentha* sp.

i njihov utjecaj na inhibiciju rasta micelija sive plijesni. Ulje stolisnika imalo je pri najvećim ispitivanim koncentracijama inhibitoran utjecaj na porast micelija sive plijesni. Moguće objašnjenje za razlike u dobivenima rezultata može biti posljedica nedovoljnoga nakupljanja monoterpena (1,8 - cineola, kamfora, borneola i piperitona), koji djeluju antifungalno. Naime, prema istraživanju Tozlu i sur. (2011.), nakupljanje monoterpena vezano je uz karakteristike regije u kojoj ljekovito bilje raste. U određenim godinama biljka može sadržavati male koncentracije glavnih monoterpena (1,8 - cineola i kamfora) zahvaljujući klimatskim prilikama, pa je i antifungalna aktivnost smanjena. Diao i sur. (2014.) i Mota i sur. (2015.) istraživali su djelovanje okolišnih čimbenika i geografske regije na nakupljanje glavnih komponenata eteričnoga ulja komorača te su utvrdili da se ulja iz Egipta, Kine, Turske i Portugala značajno razlikuju s obzirom na glavnu komponentu, čime su potvrdili da nakupljanje monoterpena direktno ovisi o *terroiru* (karakteristikama geografskoga područja) i klimatskim prilikama.

Suprotno djelovanju ulja stolisnika, eterična ulja timijana i paprene metvice imala su jak fungistatičan utjecaj pri svim ispitivanim količinama, što je u skladu s istraživanjem El-Mohamedyja i sur. (2013.). Autori su ispitivali antifungalni utjecaj eteričnoga ulja *Thymus vulgaris* te su dokazali da navedeno eterično ulje može inhibirati porast *B. cinerea* i *Monilinia fructicola*. Također, eterično ulje *T. vulgaris* pokazalo je antifungalnu aktivnost protiv najznačajnijih skladišnih uzročnika bolesti, poput *Penicillium italicum*, *Penicillium citrophthora*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum radices-lycopersici*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium* sp., *Phytophthora* sp. U istraživanju Palfi i sur. (2019.a) ulje timijana je u potpunosti inhibiralo porast micelija *F. oxysporum* i *B. cinerea* pri primijenjenim volumenima od 7 i 9 μL .

Značajno antifungalno djelovanje pokazala su i ulja mente, kadulje i lavandina. Naime, u ovome istraživanju spomenuta ulja pokazala su antifungalno djelovanje od 53% pri koncentracijama većim od 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ KDA, što je u skladu s istraživanjima Yilmaz i sur. (2015) i Xueuan i sur. (2018). U ispitivanju antifungalnoga utjecaja eteričnog ulja kadulje, *Salvia officinalis*, na porast micelija *B. cinerea* s jabuke utvrđeno je jako fungistatično djelovanje ulja lavandina, kadulje, mente i čajevca te potpuna inhibicija porasta micelija pri ispitivanoj koncentraciji većoj od 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ KDA (Yilmaz i sur., 2015.). U volatilnoj metodi, pri koncentraciji većoj od 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ KDA, najjaču inhibiciju izazvalo je ulje mente, s inhibicijskim učinkom od 73%. Eterična ulja kadulje, čajevca i lavandina imala su inhibicijski učinak od 71%, 61% i 57% (Xueuan i sur., 2018.). Također, rezultati djelovanja ulja paprene metvice iz ovoga istraživanja u skladu su s istraživanjem Palfi i sur. (2019.b), u kojem je utvrđeno da to eterično ulje može inhibirati porast micelija *Colletotrichum coccoides*. U istome istraživanju utvrđeno je da eterično ulje paprene metvice u ispitivanim volumenima bolje inhibira razvoj micelija *C. coccoides* u odnosu na ispitivane fungicide.

Rezultati dobiveni primjenom makrodilucijske metode *in vitro* pokazali su suprotne učinke pojedinih ulja u odnosu na volatilnu metodu (Tablica 2). Naime, u volatilnoj metodi eterično ulje stolisnika imalo je pozitivan učinak na porast micelija gljive uzročnika sive plijesni, za razliku od makrodilucijske metode, gdje je pri svim volumenima ulja zabilježen fungistatičan utjecaj. Slične rezultate pokazalo je i eterično ulje gospine trave pri ispitivanim volumenima od 75 i 100 μL . Pri volumenu od 100 μL eterična ulja mravinca i gospine trave djelovala su inhibitorno na porast micelija, dok su pri manjim volumenima testne mješavine zabilježeni porasti micelija od minimalno 25%.

Tablica 2. Utjecaj eteričnih ulja na porast micelija *B. cinerea* – makrodilucijska metoda nakon 96 h (0 = nema razvoja gljive, maksimalna supresija rasta; 1 = 25% porasta micelija gljive; 2 = 50% porasta micelija gljive; 3 = 75% porasta micelija gljive; 4 = 100% porasta micelija gljive)

Table 2. Influence of essential oils on the *B. cinerea* mycelium growth – macrodilution method after 96 h (0 = suppression of growth, 1 = 25% of mycelium growth, 2 = 50% of mycelium growth, 3 = 75% of mycelium growth, 4 = 100% of mycelium growth)

Esencijalno ulje <i>Essential oil</i>	Koncentracija / <i>Concentration</i>			
	25 μL	50 μL	75 μL	100 μL
<i>H. oleum</i>	1	1	0	0
<i>A. millefolium</i>	0	1	0	0
<i>H. italicum</i>	4	4	4	4
<i>L. hybrida</i>	0	0	0	0
<i>S. officinalis</i>	0	0	0	0
<i>M. piperita</i>	0	0	0	0
<i>T. vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>R. officinalis</i>	3	3	2	0
<i>O. compactum</i>	3	3	1	0

Objašnjenje za supresivno djelovanje u makrodilucijskoj metodi posljedica je većega testiranog volumena eteričnoga ulja, a time i veće koncentracije komponenta ulja, primarno monotrepna, za koje je dokazano fungistatično djelovanje. Rezultati ovoga istraživanja u skladu su s istraživanjem Edrisa i Farraga (2003.), Nosratija i sur. (2011.), Adebaya i sur. (2013.) i El-Mohamedyja i sur. (2013.), koji navode da antifungalna aktivnost eteričnih ulja ovisi o ispitivanoj metodi, vremenu inkubacije te primijenjenoj količini inhibitorne tvari — što je količina eteričnoga ulja u testu veća, značajnije je smanjenje rasta micelija. Ulje smilja testirano u obje metode nije pokazalo fungistatičan utjecaj na porast *B. cinerea* niti u jednome ispitivanom volumenu. U dosadašnjim istraživanjima eterična ulja dobivena destilacijom biljaka vrsta roda *Hypericum* pokazala su jako antimikrobno djelovanje (Dall'Agnol i sur., 2003.; Cakir i sur., 2004.; Kalaba i sur., 2015.). Inhibicija rasta micelija, prema Cakir i sur. (2004.), može se pripisati prisutnosti α -pinenina i izokariofilena u kombinaciji. Naime, navedeni monoterpni djelovali su stimulativno na porast micelija *Rhizoctonia solani*, a prilikom pojedinačnoga testiranja utvrđeno je da izokariofilen ima antifungalno djelovanje i na *Rhizoctonia solani* i na pet ispitivanih vrsta roda *Fusarium*.

Značajnost ovoga istraživanja ogleda se u potvrdi antifungalnoga utjecaja nekih eteričnih ulja (timijana, mente, kadulje i lavandina) na uzročnika sive plijesni. Rezultati ukazuju da eterična ulja mente i timijana imaju najjače antifungalno djelovanje, a time i najveći potencijal primjene kao biofungicidi. Razlike u rezultatima primijenjenih metoda posljedica su različitih volumena eteričnih ulja, a time i veće količine sekundarnih metabolita po jedinici tretirane površine. Također, ovo istraživanje ukazuje na određene implikacije prilikom primjene eteričnih ulja u uvjetima *in vivo*. Naime, prilikom destilacije ulja bit će potrebno odraditi analizu sekundarnih metabolita kako bi se u biofungicidnome pripravku nalazilo ulje s najvećim udjelom antifungalne tvari. Također, godište proizvodnje eteričnih ulja bit će jedan od važnih čimbenika za određivanje antifungalne jačine, jer abiotički čimbenici tijekom jedne proizvodne godine mogu značajno utjecati na kvalitetu eteričnoga ulja.

ZAKLJUČAK

U istraživanju je ispitivano djelovanje devet eteričnih ulja dobivenih iz domicilnoga bilja Hrvatske na supresiju porasta micelija gljive *B. cinerea*, uzročnika sive plijesni vinove loze. Rezultati ovoga istraživanja potvrdili su da ulja timijana i paprene metvice mogu imati antifungalno djelovanje na porast micelija *B. cinerea* s vinove loze. Ulja paprene metvice i timijana imala su najjače fungistatično djelovanje pri svim ispitivanim koncentracijama primjenom obje metode, za razliku od ulja smilja, kod kojega je izostalo antifungalno djelovanje. S obzirom na redukciju porasta micelija *B. cinerea* u uvjetima *in vitro*, eterična ulja kao biofungicid predstavljaju moguću zamjenu za sintetske preparate u sprječavanju razvoja

sive plijesni na vinovoj lozi, no potrebna su dodatna istraživanja kako u uvjetima *in vitro*, tako i u uvjetima *in vivo*. Uzimajući u obzir dobivene rezultate, potrebno je dodatno ispitati utjecaj pojedinih komponenta eteričnih ulja na inhibiciju porasta gljive *B. cinerea* te napraviti analizu utjecaja abiotičkih faktora na sastav sekundarnih metabolita za eterična ulja domicilnoga bilja Hrvatske, s posebnim osvrtom na razlike između uzgojnih područja u kontinentalnoj i primorskoj Hrvatskoj. Također, potrebno je istražiti i mogućnost djelovanja mješavine eteričnih ulja u realnim uvjetima te istražiti ulja koja su u pokusu imala stimulativan utjecaj na porast micelija sive plijesni kako bi se utvrdio razlog takvoga djelovanja. Potrebno je naglasiti da bi komercijalna primjena pojedinoga eteričnog ulja bila vezana za godišta u kojima su razine sekundarnih metabolita bile maksimalne.

LITERATURA

1. 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>
2. Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. (2013). Phenotypic characterisation of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease*, 97(3), 393-401. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0748-RE>
3. Avenot, H., Quattrini J., Puckett, R., & Michailides, T. J. (2018). Different levels of resistance to cyprodinil and iprodione and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates collected from pistachio, grape, and pomegranate fields in California. *Crop Protection*, 12, 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.005>
4. 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>
5. Bishop, C. D., & Reagan, J. (1998). Control of the storage pathogen *Botrytis cinerea* on Dutch white cabbage (*Brassica oleracea* Var. *capitata*) by the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Essential Oil Research*, 10(1), 57-60. <https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700838>
6. Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., & Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 62-68. <http://doi.org/10.1002/ffj.1279>
7. Da Silva Bomfim, N., Nakassugi, L. P., Oliveira, J. F. P., Kohiyama, C. Y., Mossini, S. A. G., & Machinski, M. (2015). Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry*, 166, 330-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.019>
8. Diao, W., Hu, Q., Zhang, H., & Xu, J. (2014). Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of

- action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control*, 35, 109-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.056>
9. Diaz-Maroto, M. C., Pearez-Coello, M. S., Esteban, J., & Sanz, J. (2006). Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6814-6818. <http://doi.org/10.1021/jf0609532>
 10. Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D., Nör, C., Sarmento, L., ... & Schapoval, E. E. S. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 10(6-7), 511-516. <https://doi.org/10.1078/094471103322331476>
 11. 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>
 12. 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.
 13. Ferreira, P., Gaspar, F., Sousa, C., Bernardo-Gil, G., Empis, J. A., Rouzet, M., & Bastos, J. (1998). *Origanum virens*: An oregano from Portugal. AIR e Agro Industrial Research, European Project AIR3CT93e0818. Lisboa: European Commission eDG XII e Science, Research and Development, IST.
 14. Figueredo, G., Cabassu, P., Chalchat, J. C., & Pasquier, B. (2006). Studies of Mediterranean oregano populations, VIII e chemical composition of essential oils of oreganos of various origins. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 134-139. <http://doi.org/10.1002/ffj.1543>
 15. Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*, 7, 133-141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
 16. Iacomi, B., Gheorghies, C., Enciu, E., & Manole, M. (2000). Phytoextracts with antifungal activity. *Lucrari științifice, Seria B* Vol. XL.
 17. Kalaba, V., Glusac, J., Stijepić, M., Kalaba, D., & Đurđević Milosević, D. (2015). Antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* essential oil. *Quality of Life*, 6(3-4):45-52. <http://doi.org/10.7251/QOL1503045K>
 18. Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
 19. Lui, Y., Tortora, G., Ryan, M., Lee, H. M., & Golub L. M. (2002). Potato dextrose agar antifungal susceptibility testing for yeast and molds: evaluation of phosphate effect on antifungal activity of CMT-3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1455-1461. <http://doi.org/10.1128/AAC.46.5.1455-1461.2002>
 20. Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D., & Prajapati, J. B. (2016). Essential oils of herbs and spices: Their antimicrobial activity and application in preservation of food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(5), 885-901. <http://doi.org/10.20546/IJCMAS.2016.505.092>
 21. Mota, A. S., Martins, M. R., Arantes, S., Lopes, V. R., Bettencourt, E., Pombal, S., ... & Silva, L. A. (2015). Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of Portuguese *Foeniculum vulgare* fruits. *Natural Product Communications*, 10(4), 673-676. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000437>
 22. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10, 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
 23. 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).
 24. Panebianco, A., Castello, I., Cirvilleri, G., Perrone, G., Epifani, F., Ferrara, M., Polizzi, G., & Walters, D. R. (2015). Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection*, 77, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.010>
 25. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., & Čosić, J. (2018). Antifungalna aktivnost eteričnih ulja i njihovih glavnih komponenti na rast micelija *Colletotrichum coccodes*. *Poljoprivreda*, 24(2), 20-26. <https://doi.org/10.18047/poljo.24.2.3>
 26. Palfi, M., Konjevoda, P., Vrandečić, K., & Čosić, J. (2019a). Antifungal activity of essential oils on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 31(7), 544-554.
 27. Palfi, M., Vrandečić, K., Popijač, V., & Čosić, J. (2019b). Utjecaj eteričnih ulja na fitopatogene gljive. *Poljoprivreda*, 25(1), 32-40. <https://doi.org/10.18047/poljo.25.1.5>
 28. Sesan, T., Enache, E., Iacomi, B.M., Oprea, M., Oancea, F., & Iacomi, C. (2015). Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(1), 29-43.
 29. 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(3), 308-313.
 30. Soyulu, E. M., Kurt, S., & Soyulu, S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
 31. Sumalan, R. M., Alexa, E., & Poiana, M. A. (2013). *Chemistry Central Journal*, 7(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-32>

32. Stupar, M., Ljaljević-Grbić, M., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., & Vukojević, J. (2014). Antifungal activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don (*Asteraceae*) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. *Archives of Biological Sciences*, 66(4), 1539-1545. <https://doi.org/10.2298/ABS1404539S>
33. Tozlua, E., Cakir, A., Kordali, S., Tozluc, G., Ozer, H., & Akcine T. A. (2011.) Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). *Scientia Horticulturae*, 130, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.019>
34. Vitoratos, A., Bilalis, D., Karkanis, A., & Efthimiadou, A. (2013). Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 86-92. <https://doi.org/10.15835/nbha4118931>
35. Xueuan, R., Dandan, S., Zhuo, L., & Qingjun, K. (2018). Effect of mint oil against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanism of action. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 321-328. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01604-y>
36. Yilmaz, A., Ermis, E., & Boyraz, N. (2016). Investigation of in vitro and in vivo anti-fungal activities of different plant essential oils against postharvest apple rot diseases *Colletotrichum gleosporioides*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 67(5), 122-131.

ANTIFUNGAL EFFECT OF ESSENTIAL OILS FROM THE NATIVE CROATIAN FLORA ON THE SUPPRESSION OF THE *Botrytis cinerea* FUNGUS IN GRAPEVINES

SUMMARY

The aim of this research was to determine the effect of nine essential oils from the Croatian native flora (*Mentha x piperita*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula hybrida*, *Origanum compactum*, *Thymus vulgaris*, *Hiperici oleum*, *Achillea millefolium* and *Helichrysum italicum*) on the *Botrytis cinerea* mycelial growth suppression. The research results demonstrated that the oils of *Thymus vulgaris* and *Mentha x piperita* in both investigated methods (the volatile and the macrodilution one) have exerted a positive influence on the suppression of mycelial growth. Also, the aforementioned oils had a fungistatic effect in all investigated concentrations long after 96 hours. The essential oils of *Achillea millefolium* and *Hiperici oleum* in the volatile method have not manifested a suppression effect, while the effect of suppression of a mycelial growth was recorded in the macrodilution method. The essential oil of *Helichrysum italicum* stimulated the growth of *B. cinerea* mycelium in both investigated methods. Considering a reduction of the mycelium growth, the essential oils, as a biocontrol agent, could be a positive substitution for the traditional pesticides in grapevine gray mold control. Additional investigation with regard to the essential oils in the *Botrytis* control are needed both the in vitro and the in vivo conditions.

Keywords: *Botrytis cinerea*, grapevines, volatile method, macrodilution method, essential oils, biocontrol

(Primljeno 18. rujna 2020.; prihvaćeno 30. listopada 2020. – Received on September 18, 2020; accepted on October 30, 2020)