

Uticaj etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na porast micelije *Colletotrichum acutatum*

Nataša Duduk, Aleksa Obradović i Mirko Ivanović

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Beograd, Srbija
(natasadukic@yahoo.com)

Primljen: 10. februara 2010.

Prihvaćen: 13. maja 2010.

REZIME

Proučavan je efekat isparljive faze etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na prouzrokovača antraknoze jagode *Colletotrichum acutatum* u uslovima *in vitro*. Fragmenti micelije gljive, prečnika 1 cm, zasejani su na KDA podlogu u petri-kutije (V = 66 ml). Različite koncentracije etarskih ulja (153, 107, 76, 46, 15, 14, 12, 11, 7,6, 3,82, 1,53, 0,153 i 0,0153 $\mu\text{l/l}$ vazduha) dobijene su nanošenjem određene količine ulja, koncentrovanih ili razblaženih u etanolu, na središnji deo unutrašnje strane poklopca. Petri-kutije su zatvorene parafilmom i postavljene u obrnuti položaj, a porast micelije je meren posle 7 dana inkubacije. U kulturama u kojima nije došlo do porasta micelije fungicidno ili fungitoksično dejstvo određeno je prebacivanjem fragmenata na KDA podloge bez prisustva ulja. Efekat etarskih ulja predstavljen je procentom inhibicije porasta micelije, poređenjem sa kontrolom. Proučavana etarska ulja timijana, cimeta i karanfilića su svojom gasovitom fazom inhibirala porast micelije *C. acutatum*. Stepent inhibicije zavisio je od primenjene koncentracije. Etarsko ulje timijana je potpuno inhibiralo porast micelije pri koncentraciji 76 $\mu\text{l/l}$ vazduha, a cimeta i karanfilića pri koncentraciji 107 $\mu\text{l/l}$ vazduha. Fungicidno dejstvo ispoljilo je etarsko ulje timijana u koncentraciji 107 $\mu\text{l/l}$ vazduha i cimeta u koncentraciji 153 $\mu\text{l/l}$ vazduha. Rezultati istraživanja *in vitro* pokazali su antifungalno dejstvo testiranih etarskih ulja, što govori o potencijalu korišćenja etarskih ulja u kontroli *C. acutatum*.

Ključne reči: Etarska ulja; timijan; cimet; karanfilić; *Colletotrichum acutatum*; antifungalno dejstvo

UVOD

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds je prouzrokovač oboljenja velikog broja gajenih i korovskih vrsta biljaka (Mass, 1984; Wharton i Dieguez Uribeondo, 2004), ali je ekonomski najznačajniji kao

prouzrokovač oboljenja jagode (OEPP/EPPO, 2004). Karakteristični simptomi se uočavaju na plodovima jagode i to u vidu antraknozih pega, zbog čega se i oboljenje naziva antraknozno propadanje plodova ili crna pega (anthracnose fruit rot, black spot). Na lisnim i cvetnim drškama patogen izaziva pojavu sitnih crnih,

izduženih i udubljenih pega. Osim toga, *C. acutatum* može da prouzrokuje nekrozu i izumiranje korena (rot necrosis), kao i izumiranje krune jagode (crown rot). Često se patogen nalazi latentno na jagodi bez ispoljavanja simptoma.

Značajnije štete u proizvodnji jagode nastaju upravo zbog osobine patogena da se brzo širi i dovodi do truleži plodova. Smanjenje prinosa i preko 80%, usled pojave ovog patogena, zabeleženo je u Francuskoj (OEPP/EPPO, 2004) i u našoj zemlji kada je prvi put utvrđeno prisustvo *C. acutatum* na jagodi (Ivanović i sar., 2005).

Kontrola *C. acutatum* prvenstveno je usmerena na primenu hemijskih mera. Međutim, sve veća potreba za zdravstveno bezbednom hranom ograničava primenu pesticida u proizvodnji jagode i otvara prostor za primenu alternativnih mera zaštite od ovog ekonomski značajnog patogena. Korišćenje prirodnih komponenti nekih biljnih vrsta, prvenstveno njihovih produkata sekundarnog metabolizma, čija osnovna uloga u biljkama je prilagođavanje i opstanak u uslovima spoljašnje sredine i odolevanje različitim faktorima abiotske i biotske prirode, predstavljaju dobar prirodni potencijal u kontroli biljnih patogena. Među njima izdvajaju se etarska ulja za koje je poznato da, pored drugih farmakoloških svojstava, poseduju antimikrobno i fungicidno dejstvo (Zambonelli i sar., 1996; Oxenham i sar., 2005).

Preliminarna ispitivanja uticaja etarskih ulja različitih biljnih vrsta na porast micelije *C. acutatum* po svojoj efikasnosti izdvojila su etarska ulja timijana, cimeta i karanfilića (Duduk i sar., 2008). Cilj ovog rada je bio utvrđivanje uticaja isparljivih komponenti ova tri etarska ulja, primenjenih u različitim koncentracijama u uslovima *in vitro*, na porast micelije *C. acutatum*.

MATERIJAL I METODE

Test organizam

U ogledu je korišćen izolat *C. acutatum* iz jagode gajene u Srbiji. Izolat je održavan na krompir-dekstroznoj podlozi (KDA) na 25°C.

Etarska ulja

Proučavan je uticaj isparljivih komponenti komercijalno dostupnih etarskih ulja timijana (*Thymus vulgaris*), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*) i karanfilića (*Syzygium aromaticum*) (BeoLab, Srbija) na *C. acutatum* u *in vitro* uslovima.

Antifungalno dejstvo

Fragmenti micelije gljive, prečnika 1 cm, uzeti su sa periferije 7 dana stare kulture i zasejani su u petri-kutije (88 x 11 mm; V=66 ml) na 15 ml KDA podloge. Različite količine koncentrovanih etarskih ulja (1-10 µl), ili razređenja u etanolu do finalne količine od 10 µl (0,001-0,9 µl), postavljene su pipetiranjem na središnji deo unutrašnje strane poklopca čime su dobijene koncentracije od 153, 107, 76, 46, 15, 14, 12, 11, 7,6, 3,82, 1,53, 0,153 i 0,0153 µl/l vazduha. Odmah po nanošenju kapi etarskog ulja, kutije su zatvorene parafilmom kako bi se sprečio gubitak pare i postavljene u obrnuti položaj. Svaki tretman postavljen je u 4 ponavljanja. Kontrolni tretman je sadržao etanol u istoj količini kao i etarsko ulje. Kulture su inkubirane na 25°C, a porast micelije je meren posle 7 dana inkubacije. Ako posle inkubacije nije zabeležen porast micelije patogena, fragment gljive je prebavio na KDA podlogu bez prisustva ulja gde je porast gljive ukazivao na fungistatičan efekat a odsustvo porasta na fungicidan uticaj etarskih ulja. Porast micelije izražen je kroz % inhibicije, poređenjem sa kontrolnim tretmanom. Statistička obrada dobijenih podataka urađena je analizom varijanse, a višestruko poređenje sredina tretmana i kontrola je urađeno primenom *t* testa (STATGRAPHICS Centurion, StatPoint, 2005). Najniže koncentracije ulja, čije dejstvo je potpuno inhibiralo porast micelije ili ispoljilo fungicidan efekat, označene su kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), odnosno minimalna fungicidna koncentracija (MFC).

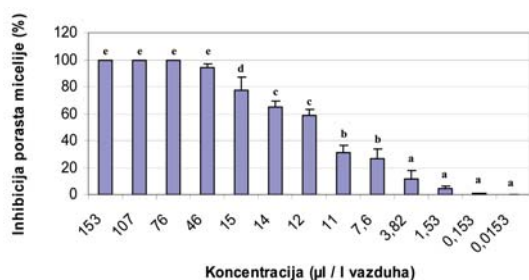
REZULTATI

Uticaj isparljivih komponenti etarskog ulja timijana na porast micelije *C. acutatum*

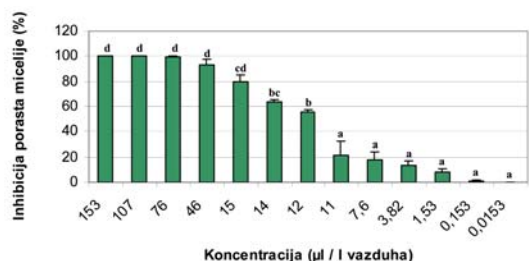
Sva ispitivana etarska ulja inhibirala su porast micelije *C. acutatum*. Procenat inhibicije zavisio je od primenjene količine etarskog ulja timijana (Slika 1). Jaka inhibicija porasta micelije uočena je pri koncentracijama 46 µl/l vazduha i višim (94,5-100%). Međutim, dejstvo etarskog ulja je bilo fungicidno ili fungistatično. MIC etarskog ulja timijana je pri koncentraciji 76 µl/l vazduha, a MFC pri koncentraciji 107 µl/l vazduha. Smanjivanjem koncentracije etarskog ulja opadao je i inhibitorni efekat. Etarsko ulje timijana izgubilo je antifungalno dejstvo pri koncentracijama 3,82 µl/l vazduha, i nižim, koje se statistički nisu razlikovale od kontrolne grupe.

Uticaj isparljivih komponenti etarskog ulja cimeta na porast micelije *C. acutatum*

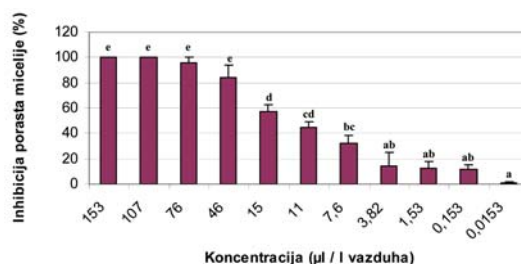
Isparljive komponente etarskog ulja cimeta inhibirale su porast micelije *C. acutatum* (Slika 2). Najjača inhibicija uočena je pri koncentracijama 46 $\mu\text{l/l}$ vazduha i višim (93,41-100%). Iako nije bilo statističke razlike između ovih koncentracija u % inhibicije, efekat etarskog ulja je bio različit. Isparljive komponente etarskog ulja cimeta inhibirale su porast micelije u potpunosti pri koncentraciji 107 $\mu\text{l/l}$ vazduha (MIC). Fungicidno dejstvo cimeta utvrđeno je pri koncentraciji 153 $\mu\text{l/l}$ vazduha (MFC). Antifungalno dejstvo etarskog ulja cimeta, koje se statistički nije razlikovalo od kontrole, prestalo je pri koncentracijama 11 $\mu\text{l/l}$ vazduha i nižim.



Slika 1. Uticaj različite koncentracije isparljive faze etarskog ulja timijana na porast micelije *C. acutatum* u uslovima *in vitro*. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Studentovim *t* testom ($P \leq 0.05$).



Slika 2. Uticaj različite koncentracije isparljive faze etarskog ulja cimeta na porast micelije *C. acutatum* u uslovima *in vitro*. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Studentovim *t* testom ($P \leq 0.05$).



Slika 3. Uticaj različite koncentracije isparljive faze etarskog ulja karanfilića na porast micelije *C. acutatum* u uslovima *in vitro*. Horizontalni bar predstavlja standardnu grešku sredine. Istim slovima označene su grupe između kojih nije uočena statistički značajna razlika Studentovim *t* testom ($P \leq 0.05$).

Uticaj isparljivih komponenti etarskog ulja karanfilića na porast micelije *C. acutatum*

Kao i sa etarskim uljima timijana i cimeta, isparljive komponente etarskog ulja karanfilića inhibirale su porast micelije *C. acutatum* (Slika 3). Jaka inhibicija uočena je pri koncentracijama 46 $\mu\text{l/l}$ vazduha i višim (83,86-100%), dok je antifungalno dejstvo prestalo pri koncentracijama 3,82 $\mu\text{l/l}$ vazduha i nižim. Potpuna inhibicija porasta zabeležena je pri koncentraciji 107 $\mu\text{l/l}$ vazduha (MIC). Etarsko ulja karanfilića je svojim parama u ispitivanim koncentracijama ispoljilo samo fungistatično dejstvo (107 i 153 $\mu\text{l/l}$ vazduha) na porast micelije *C. acutatum*.

DISKUSIJA

Mnoga ispitivanja pokazala su da etarska ulja različitih biljnih vrsta poseduju antimikrobna i antifungalna svojstva. Antifungalno dejstvo etarskog ulja timijana utvrđeno je na *Botrytis cinerea* (Wilson i sar., 1997; Bhaskara Reddy i sar., 1998; Daferera i sar., 2003; Tanović i sar., 2005), *Colletotrichum lindemuthianum* i zemljišne gljive rodova *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* i *Verticillium* (Zambonelli i sar., 1996; Tanović i sar., 2004). Takođe, zabeleženo je i antifungalno dejstvo etarskih ulja cimeta i karanfilića (Wilson i sar., 1997; Tanović i sar., 2005; Krishna Kishore i sar., 2007; Berrera Necha i sar., 2008).

Istraživanja uticaja etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na prouzrokovaoče antraknoze uglavnom se odnose na njihovo dejstvo na *C. lindemuthianum* (Zambonelli i sar., 1996), *C. gloeosporioides* (Berrera

Necha i sar., 2008) i *Colletotrichum* sp. (Szczerbanik i sar., 2007). Na prouzrokovača antraknoze jagode, *C. acutatum*, antifungalno dejstvo ispoljila su etarska ulja biljaka familije Asteraceae (Meepagala i sar., 2002; Demirci i sar., 2006; Tabanca i sar., 2007), Malveceae (Kobaisy i sar., 2004), Apiaceae (Wedge i sar., 2009) i Lamiaceae (Tabanca i sar., 2006). Međutim, i pored toga, nema dovoljno podataka o uticaju etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na *C. acutatum*.

Tokom ovog rada, etarska ulja timijana, cimeta i karanfilića ispoljila su inhibitorni efekat u uslovima *in vitro* na porast micelije *C. acutatum*. Sva tri etarska ulja ispoljila su jako inhibitorno dejstvo pri koncentracijama 46 µl/l vazduha i višim, ali se njihov inhibitorni efekat razlikovao između vrsta. Etarsko ulje timijana ispoljilo je inhibitorno dejstvo u nižim koncentracijama (MIC 76 µl/l vazduha, MFC 107 µl/l vazduha) u odnosu na etarska ulja cimeta (MIC 107 µl/l vazduha, MFC 153 µl/l vazduha) i karanfilića (MIC 107 µl/l vazduha). Dobijeni rezultati ukazuju da sva tri etarska ulja poseduju antifungalno dejstvo i da je etarsko ulje timijana najtoksičnije za *C. acutatum*. Ispitujući efekat različitih etarskih ulja na druge fitopatogene gljive, i drugi autori su zabeležili da timijan ima najjače antifungalno dejstvo (Zambonelli i sar., 1996; Wilson i sar., 1997; Tanović i sar., 2004, 2005).

Rezultati drugih autora takođe govore o izraženom dejstvu ulja cimeta, karanfilića i timijana na *C. gloeosporioides* (Berrera Necha i sar., 2008), dok je ulje timijana bilo efikasnije na *C. lindemuthianum* u odnosu na etarska ulja nane i lavande (Zambonelli i sar., 1996). Slične rezultate zabeležili su Duduk i saradnici proučavajući uticaj 18 etarskih ulja, dobijenih iz različitih biljaka, na *C. acutatum*, gde su se timijan, cimet i karanfilić izdvojili po svom antifungalnom dejstvu (Duduk i sar., 2008). Međutim, ispitivanjima uticaja različite koncentracije 3 ispitivana etarska ulja na *C. acutatum*, najtoksičnije dejstvo ispoljilo je etarsko ulje timijana, zatim cimeta i karanfilića. Prema istraživanjima Berrera Necha i saradnika (2008) najefikasnije dejstvo na *C. gloeosporioides* ispoljilo je etarsko ulje cimeta i karanfilića, dok je u poređenju sa njima ulje timijana imalo slabiji inhibitorni efekat. Različiti rezultati efikasnosti etarskih ulja mogu biti u vezi i sa različitim metodologijama primene etarskih ulja. Berrera Necha i saradnici (2008) su etarska ulja dodavali u podlogu, dok je u istraživanjima sprovedenim u ovom radu ispitivan uticaj isparljivih komponenti etarskih ulja. Etarska ulja se razlikuju u svojoj rastvorljivosti u podlozi i kontakno dejstvo se razlikuje od dejstva isparljivih komponenti.

Potencijal etarskih ulja u kontroli biljnih patogena ogleda se u dve osnovne karakteristike: prva je prirodno poreklo etarskih ulja koje ih čini manje štetnim za čoveka i životnu okolinu, a druga je mali rizik za razvoj rezistentnosti jer su po sastavu etarska ulja kompleks velikog broja jedinjenja sa različitim mehanizmima antimikrobnog dejstva (Daferera i sar., 2003). Zabeleženo antifungalno dejstvo etarskih ulja timijana, cimeta i karanfilića na prouzrokovača antraknoze jagode, *C. acutatum*, predstavlja prvi korak u novom pristupu kontroli ovog ekonomski štetnog patogena. Svakako, detaljnija ispitivanja su, takodje, neophodna i u cilju praktične primene etarskih ulja u kontroli prouzrokovača antraknoze jagode.

ZAHVALNICA

Istraživanja saopštena u ovom radu realizovana su u okviru projekta „Biolška zaštita kao alternativa hemijskim sredstvima za zaštitu bilja“ (TR 20062), koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

- Berrera Necha, L.L., Bautista-Baunos, S., Flores-Moctazuma, H.E. and Estudillo, A. R.:** Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). Plant Pathology Journal, 24: 1-5, 2008.
- Bhaskara Reddy, M.V., Angers, P., Gosselin, A. and Arul, J.:** Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry, 47: 1515-1529, 1998.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G.:** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection, 22: 39-44, 2003.
- Demirci, B., Baser, K.H.C., Tabanca, N. and Wedge, D.E.:** Characterization of volatile constituents of *Haplopappus greenei* and studies on the antifungal activity against phytopathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 3146-3150, 2006.
- Duduk N., Obradović A., Ivanović M., Antonijević D. i Stepanović M.:** Uticaj različitih etarskih ulja na porast micelije *Colletotrichum acutatum* prouzrokovača antraknoze jagode. Zbornik izvoda IX dani lekovitog bilja: Savremena fitoterapija – od sirovine do gotovog proizvoda, Kosmaj, 2008, str. 134-135.

- Ivanović, M., Ivanović, M., Duduk, B., Trkulja, V. i Stojanović, G.:** Antraknoza – nova bolest jagode u Srbiji. Zbornik rezimea VII savetovanja o zaštiti bilja, Soko Banja, 2005, str. 119-120.
- Kobaisy, M., Tellez, M.R., Webber, C.L., Dazan, F.E., Schrader, K.K. and Wedge, D.E.:** Phytotoxic and fungitoxic of the essential oil of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 3768-3771, 2004.
- Krishna Kishore, G., Pande, S. and Harish, S.:** Evaluation of essential oils and their components for broad spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot disease in peanut. Plant Disease, 91: 375-379, 2007.
- Mass, J.L.:** Compendium of Strawberry Diseases. American Phytopathological Society, USA, 1984.
- Meepagala, K.M., Sturtz, G. and Wedge, D.E.:** Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracuncululus* L. var. *dracuncululus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6989-6992, 2002.
- OEPP/EPPO:** Diagnostic protocols for regulated pests PM7/25. *Glomerella acutata*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34: 193-199, 2004.
- Oxenham, S.K., Svoboda, K.P. and Walters, D.R.:** Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Phytopathology, 153: 174-180, 2005.
- Szczerbanik, M., Jobling, J., Morris, S. and Holford, P.:** Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens. Australian Journal of Experimental Agriculture, 47: 103-109, 2007.
- Tabanca, N., Demirci, B., Baser, K.H.C., Aytac, Z., Ekici, M., Khan, S.I., Jacob, M.R. and Wedge, D.E.:** Chemical composition and antifungal activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 6593-6597, 2006.
- Tabanca, N., Demirci, B., Crockett, S.L., Baser, K.H.C., and Wedge, D.E.:** Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysanthamnus nauseosus* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 8430-8435, 2007.
- Tanović, B., Milijašević, S., Obradović, A., Todorović, B., Rekanović, E. i Milikić, S.:** *In vitro* efekti etarskih ulja iz začinskih i lekovitih biljaka koji se prenose zemljištem. Pesticidi i fitomedicina, 19: 233-240, 2004.
- Tanović, B., Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I. i Rekanović, E.:** Toksičnost etarskih ulja za *Botrytis cinerea* Pers. *in vitro*. Pesticidi i fitomedicina, 20: 109-114, 2005.
- Wedge, D.E., Klun, J.A., Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Baser, K.H.C., Liu, Z., Zhang, S., Cantrell, C.L. and Zhan, J.:** Bioactivity-guided fractionation and GC/MS fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* root components for antifungal and mosquito deterrent activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 464-470, 2009.
- Wharton, P.S. and Diegues Uribeondo, J.:** The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardín Botánico da Madrid, 61(1): 3-22, 2004.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A. and Wisniewski, M.E.:** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 81: 204-210, 1997.
- Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bianchi, A. and Albasini, A.:** Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. Journal of Phytopathology, 144: 491-494, 1996.

Effects of Essential Oils from Thyme, Cinnamon and Clove on Mycelial Growth of *Colletotrichum acutatum*

SUMMARY

Effects of the volatile phase of thyme, cinnamon and clove essential oils on *Colletotrichum acutatum* were investigated. Mycelial disc was placed in the center of the Petri dish (V=66 ml) containing PDA. Different volumes of either non- or ethanol-diluted essential oils were placed on the inner side of the dish cover to obtain final concentrations of 153, 107, 76, 46, 15, 14, 12, 11, 7.6, 3.82, 1.53, 0.153 and 0.0153 µl/L of air. The dishes were

sealed with Parafilm and incubated in up-side-down position. After 7 days of incubation, mycelial growth was recorded by measuring the colony diameter. If no mycelial growth was recorded, the disc was transferred to a new PDA plate in order to evaluate whether the activity was either fungistatic or fungicidal. Mean growth values were obtained and then converted to inhibition percentage of mycelial growth compared with the control treatment. All the tested essential oils inhibited mycelial growth of *C. acutatum* in the dose dependent manner. Mycelial growth was totally inhibited by thyme oil in the concentration of 76 µl/L of air. The same results were obtained by cinnamon and clove oil in the concentration of 107 µl/L of air. Thyme and cinnamon oil had fungicidal effect in concentrations of 107 and 153 µl/L respectively. The results obtained provide evidence on the antifungal *in vitro* effect of the tested essential oils as potential means for the control of *C. acutatum*.

Keywords: Essential oil; Thyme; Cinnamon; Clove; *Colletotrichum acutatum*; Antifungal effect