

Primjena mikročestica bakrovog alginata u suzbijanju fitopatogenih gljiva

Hazler, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:137510>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**PRIMJENA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA U
SUZBIJANJU FITOPATOGENIH GLJIVA**

DIPLOMSKI RAD

Laura Hazler

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Biljne znanosti

**PRIMJENA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA U
SUZBIJANJU FITOPATOGENIH GLJIVA**

DIPLOMSKI RAD

Laura Hazler

Mentor:

Prof. dr. sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Laura Hazler**, JMBAG 0178104847, rođena 10.09.1996. u Antwerpenu, Belgija, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PRIMJENA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA U SUZBIJANJU FITOPATOGENIH GLJIVA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana 30.09.2022.

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Laure Hazler**, JMBAG 0178104847, naslova

PRIMJENA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA U SUZBIJANJU FITOPATOGENIH GLJIVA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof.dr.sc. Marko Vinceković mentor

2. dr.sc. Dario Ivić član

3. izv.prof.dr.sc. Luna Maslov Bandić član

Zahvala

Zahvaljujem se svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Marku Vincekoviću, na pruženoj prilici, pomoći, susretljivosti i usmjeravanju tijekom izrade diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Adrijani Novak i dr. sc. Dariu Iviću na uloženom trudu tijekom istraživanja i pisanja rada, savjetima, nesebičnoj pomoći te uloženom vremenu.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori, strpljenju i povjerenju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CILJ ISTRAŽIVANJA	2
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. BAKRENI SPOJEVI U POLJOPRIVREDI	3
2.1.1. Povijest bakrenih spojeva u zaštiti bilja	3
2.1.2. Način djelovanja bakrenih spojeva.....	6
2.1.3. Upotreba bakrenih spojeva.....	8
2.1.4. Komercijalna sredstva na osnovi bakra na hrvatskom tržištu.....	11
2.2. FORMULACIJE SREDSTAVA ZA ZAŠTITU BILJA.....	14
2.2.1. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja.....	16
2.3. EKSPERIMENTALNI BILJNI PATOGENI	18
2.3.1. Botrytis cinerea	18
2.3.2. Cercospora beticola.....	20
2.3.3. Phytophthora ramorum	22
3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	27
3.1. PRIPREMA OTOPINA (NATRIJEV ALGINAT, BAKROV(II) SULFAT)	27
3.2. PRIPRAVA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA (2%, 3% I 4%)	28
3.3. PRIPRAVA HRANJIVIH PODLOGA I PATOGENA.....	31
3.4. PRIMJENA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA (2%, 3% I 4%) NA FITOPATOGENE GLJIVE	32
3.4.1. Utjecaj na klijanje konidija <i>Botrytis cinerea</i>	32
3.4.2. Utjecaj na rast <i>Cercospora beticola</i>	34
3.4.3. Utjecaj na zarazu listova <i>Rhododendron</i> sp. pseudogljivom <i>Phytophthora ramorum</i>	36
3.5. BIOTEST NA PLODOVIMA JABUKE	37
4. REZULTATI.....	40
4.1. UTJECAJ PRIMJENE MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA NA KLIJANJE <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	40
4.2. UTJECAJ PRIMJENE MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA NA RAST MICELIJA PATOGENA <i>CERCOSPORA BETICOLA</i>	47
4.3. UTJECAJ PRIMJENE MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA NA ZARAZU LISTOVA <i>RHODODENDRON</i> SP. S <i>PHYTOPHTHORA RAMORUM</i>	51
4.4. BIOTEST NA PLODOVIMA JABUKE	53
5. RASPRAVA.....	56
5.1. UTJECAJ PRIMJENE MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA (2%, 3% I 4%) NA KLIJANJE KONIDIJA <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	56
5.2. UTJECAJ PRIMJENE MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA (2%, 3% I 4%) NA RAST <i>CERCOSPORA BETICOLA</i>	57
5.3. UTJECAJ PRIMJENE MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA (2%, 3% I 4%) NA ZARAZU LISTOVA <i>RHODODENDRON</i> SP. S <i>PHYTOPHTHORA RAMORUM</i>	58

<u>6. ZAKLJUČAK.....</u>	<u>61</u>
<u>7. POPIS LITERATURE</u>	<u>62</u>
<u>Životopis.....</u>	<u>75</u>

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Laure Hazler**, naslova

PRIMJENA MIKROČESTICA BAKROVOG ALGINATA U SUZBIJANJU FITOPATOGENIH GLJIVA

Fitopatogene gljive ubrajaju se u žive uzročnike biljnih bolesti, koje uzrokuju oko 75% biljnih bolesti, što za posljedicu ima velike štete u poljoprivrednoj proizvodnji. Parazitiraju gotovo sve dijelove biljke pogotovo kada se nađu u povoljnim uvjetima za razvoj. Za istraživanje odabrane su dvije fitopatogene gljive, *Cercospora beticola* i *Botrytis cinerea* te pseudogljiva *Phytophthora ramorum*. Uspješna primjena sredstava na bazi bakra u suzbijanju fitopatogenih biljnih bolesti datira više od 100 godina unazad, što za posljedicu ima i nakupljanje bakra u tlu te negativne ekološke efekte. Zbog toga je potrebno koristiti nove tehnologije inkapsulacije u pripravi formulacija mikročestica na bazi bakrova(II) iona. U radu je prikazano djelovanje mikročestica bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) na odabrane vrste fitopatogenih gljiva. Pripravljene formulacije utjecale su na rast micelija *C. beticola* i stvaranje sporangija *P. ramorum*. Klijanje konidija *B. cinerea* nije zaustavljeno niti na jednoj od korištenih koncentracija.

Ključne riječi: fitopatogene gljive, bakrov alginat, mikročestice

Summary

Of the master's thesis – student **Laura Hazler**, entitled

APPLICATION OF COPPER ALGINATE MICROPARTICLES IN THE SUPPRESSION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Phytopathogenic fungi are among the living pathogens of plant diseases, causing about 75% of plant diseases and causing great damage to agricultural production. They parasitize almost all parts of plants, especially when moisture is elevated. Two phytopathogenic fungi, *Cercospora beticola* and *Botrytis cinerea*, and the pseudo-fungus *Phytophthora ramorum* were selected for research. Successful application of copper-containing agents to control phytopathogenic plant diseases dates back more than 100 years, resulting in accumulation of copper in the soil and negative ecological effects. Therefore, it is necessary to use new encapsulation technologies in the production of microparticle formulations based on copper(II) ions. The aim of this work is to study the influence of microparticles of copper alginate (2%, 3% and 4%) on selected genera of phytopathogenic fungi. The prepared formulations inhibit the growth of mycelia of *C. beticola* and *P. ramorum*, but not of *B. cinerea*. With further research, they can be used as natural, ecological fungicides in the process of protecting plant crops from diseases caused by phytopathogenic fungi.

Keywords: phytopathogenic fungi, copper alginate, microparticles

1. Uvod

Fitopatogene gljive još su i danas najbrojniji živi uzročnici bolesti biljaka. U biljke prodiru na tri načina: kroz prirodne otvore biljke, kroz nastale mehaničke ozlijeđe tkiva te izravno, prodiranjem kroz neozlijeđeno tkivo biljaka. Fitopatogene gljive svrstavaju se u skupinu parazita pošto im se prehrana temelji na uzimanju hrane domaćinu pri čemu mu štete. Prema potrebama za domaćinom, mogu biti obligatni ili fakultativni paraziti. Kroz evoluciju su se prilagodile različitim načinima rasprostranjivanja pa se tako mogu rasprostranjivati putem vjetra, vektorskih organizama, oruđa za obradu tla i na mnoge druge načine (Stazić, 2017.). Za njihovo suzbijanje koriste se razne agrotehničke i higijenske mjere te primjena sredstva za zaštitu bilja - fungicida.

Uporaba sredstva za zaštitu bilja (SZB) u poljoprivredi značajno utječe za okoliš, sigurnost hrane, a time i na zdravlje ljudi pošto su neki od njih postojani organski zagađivači. Određene agrokemikalije, koje su prisutne u okolišu u malim količinama, prenose se na velike udaljenosti zbog globalne cirkulacije te su prisutne i u područjima u kojima se nikada nisu koristile. Međutim, agrokemikalije su legitiman i koristan alat koji može imati značajne prednosti za naše društvo, stoga ih je potrebno koristiti na siguran i učinkovit način pošto pogrešna primjena može uzrokovati štetu za ljude i okoliš. Kako bi se smanjila ukupna izloženost SZB, uvode se uravnotežene agrotehničke mjere uz minimalnu uporabu agrokemikalija. To je potaklo razvoj novih generacija agroformulacija, od kojih treba posebno istaknuti agroformulacije s mikročesticama (Bedek, 2018.).

Korištenje agroformulacija s mikrokapsulama započelo je inkapsuliranjem pesticida i gnojiva. Inkapsulacija pesticida i gnojiva se ponajviše koristi za poboljšanje kontroliranog otpuštanja tvari, smanjenje količine pesticida i gnojiva za učinkovito korištenje, smanjenje učestalosti tretmana, a time i potrebnih radova za poljoprivrednika, te za smanjenje štetnosti na ljude i okoliš (Oxley, 2015.; Steinbrenner i Bratz, 2015.; Bedek, 2018.).

Bakar se primjenjuje kao fungicid u različitim oblicima kod suzbijanja biljnih bolesti već od 18. stoljeća (Morton i Staub, 2008.; Rolando i sur., 2019.). Razni oblici bakra korišteni su kod suzbijanja bolesti, poput bakrovog hidroksida $[Cu(OH)_2]$, bakrovog oksiklorida $[3Cu(OH)_2 \times CuCl_2]$, bakrovog sulfata $[CuSO_4 \times 5H_2O]$ i bakrovog oksida $[Cu_2O]$ (MacBean, 2016.; Rolando i sur., 2019.). Bakreni fungicidi su folijarno aktivni te pripadaju širokom spektru preventivnih fungicida koji su efektivni u suzbijanju širokog raspona bolesti, uključujući one čiji su uzročnici gljive, algašice i bakterije. Tijekom folijarne primjene bakrenog fungicida dolazi do solubilizacije u početku netopivog spoja bakra, što omogućuje kontakt iona bakra s klijajućim sporama, stvaranje enzimskih sustava koji uništavaju bakterije te sprečavanje daljnjeg razvoja stanica i micelija (Franich i Wells, 1975.; Rolando i sur., 2019.). Međutim, ioni bakra trebaju biti prisutni na usjevu prije nego patogen proдре u domaćina (MacBean, 2016.; Rolando i sur.,

2019.). Općenito, spojevi bakra se nakon aplikacije čvrsto pridržavaju za površinske dijelove biljke, čak i nakon kiše (Franich i Wells, 1975.; Rolando i sur., 2019.).

Prema mnogim istraživanjima dokazano je da je bakar učinkovit kao fungicid te da mikroinkapsulacija štiti tvari u minijaturnim, zapečaćenim kapsulama koje imaju sposobnost ispuštati svoj sadržaj kontroliranom brzinom u posebnim uvjetima. U ovom je radu istraženo djelovanje mikroinkapsuliranog bakra na rast i razvoj patogena *Cercospora beticola*, *Botrytis cinerea* i *Phytophthora ramorum*.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je testiranje efikasnosti bakrovog alginata (različitih koncentracija i veličina mikročestica) u obliku mikrokaspula kod suzbijanja fitopatogenih gljiva *Botrytis cinerea*, *Cercospora beticola* i pseudogljive *Phytophthora ramorum*.

2. Pregled literature

2.1. Bakreni spojevi u poljoprivredi

Bakar (Cu) je mikroelement neophodan za život koji sudjeluje u mnogim staničnim fiziološkim procesima, kao što su proizvodnja energije, sinteza fosfolipida i hemoglobina, apsorpcija i transport željeza te proizvodnja ribonukleinske kiseline (La Torre i sur., 2018.). Prisutan je gotovo u svim namirnicama, a većina ljudske prehrane uključuje 1 do 2 miligrama (mg) bakra po osobi dnevno (EFSA, 2018.; La Torre i sur., 2018.). Bakar je prisutan u ekosustavu te je njegov unos u tlo iz agrarnih izvora uglavnom vezan za stajnjak, kanalizacijski mulj, gnojiva i pesticide (Mantovi, 2003.; La Torre i sur., 2018.).

Bakar kao mikroelement utječe na karakteristike tla, koja su ujedno i njegov preliminarni izvor. Bakar dospijeva u tlo gotovo isključivo u dvovalentnom obliku (Cu^{2+} ioni) inkorporiran u mineralima, ali i vezan s organskom tvari tla (Rusjan, 2012.). Osim tla, značajni "izvori" bakra su poljoprivreda (prskanje, gnojidba), industrija (metalurgija, farmacija, rudarstvo itd.) te gradovi i ceste, koji se zajedno mogu označiti i kao zagađivači (Rusjan, 2012.).

Spektar djelovanja bakrenih spojeva uključuje mnoge fitopatogene mikroorganizme, čineći ovaj metal jednom od glavnih komponenti fungicidnih i baktericidnih formulacija diljem svijeta. Bakar ima ključnu ulogu u integriranom suzbijanju štetočinja te je neophodan za ekološku poljoprivredu, budući da upravljanje bolestima u ovom sustavu gotovo isključivo ovisi o njegovoj upotrebi (La Torre i sur., 2018.).

2.1.1. Povijest bakrenih spojeva u zaštiti bilja

Bakar je jedan je od rijetkih metala koji se u prirodi pojavljuje u elementarnom stanju te se pretpostavlja da je to prvi metal koji je čovjek koristio prije najmanje 10 000 godina u povijesti. Šira uporaba bakra započela je u bakrenom dobu (5. tisućljeće prije nove ere) te kroz antiku i srednji vijek do danas se smatra jednim od najvažnijih metala. Spojevi bakra se obično susreću u obliku soli Cu^{2+} , koje često daju plavu ili zelenu boju, stoga su se u prošlosti naširoko koristili kao pigmenti (Rusjan, 2012.).

Prve upotrebe fungicida sežu prije 400 godina kada su se jednostavne vodene otopine (soli) često koristile za tretiranje sjemena žitarica (Rusjan, 2012.). Naime, kao i kod mnogih izuma, "razvoj" prvog fungicida bio je rezultat dobrog zapažanja. Prva upotreba salamurenja žitarica sa slanom vodom uz postupak kalcifikacije provela se sredinom 17. stoljeća kako bi se suzbila smrdljiva snijeti pšenice, a uslijedila je nakon opažanja da sjeme pšenice spašeno iz mora nije razvilo takvu bolest (Morton i Staub, 2008.).

Prvi zapisi o poljoprivrednoj upotrebi bakrenih spojeva datiraju iz 1761. godine (god.), kada je otkriće antibakterijskih učinaka pripravaka na bazi bakrovog sulfata korištenih na sjemenu postavilo daljnje standarde u praksi uzgoja za sljedeća desetljeća (Rusjan, 2012.). Također, spojevi na bazi bakra su objavljeni kao jedni od prvih fungicida korištenih za upravljanje biljnim bolestima (Johnson, 1935.; Banik i Pérez-de-Luque, 2017.). Još 1807. god. B. Prévost otkrio je učinkovitost bakra za kontrolu smrdljive snijeti pšenice (Leadbeater, 2015.). Naime, radi se o antifungalnim svojstvima bakrovog sulfata kojim se tretiralo sjeme pšenice kako bi se zaštitilo od pojave smrdljive snijeti te kako bi se očuvalo drvo (Johnson, 1935.; Lamichhane i sur., 2018.). Međutim, zbog visoke topivosti u vodi i sposobnosti prodiranja iona bakra u aktivno rastuća biljna tkiva, bakrov sulfat bio je visoko fitotoksičan te neprikladan za zaštitnu primjenu na lišću i plodu. Tijekom pripreme bordoške juhe, jednog od prvih otkrivenih fungicida, reakcija kalcijevog hidroksida s bakrovim sulfatom rezultira stvaranjem koloidne plave suspenzije bakrovog hidroksida, praktički netopljive u vodi, stabilizirane adsorpcijom kalcijevog sulfata. U kompleksnom obliku bakar se ne apsorbira u biljno tkivo, što smanjuje rizik od fitotoksičnosti bordoške juhe i povećava upotrebljivost bakrovog sulfata u poljoprivredi (Lamichhane i sur., 2018.).

1880-ih otkriće "Bordeaux smjese" od strane francuskog znanstvenika Pierre-Marie-Alexisa Millardeta dovelo je do još jednog značajnog doprinosa poljoprivredi (McBride i sur., 1981.; Borkow i Gabbay, 2005.; La Torre i sur., 2018.). Naime, Millardet je u to vrijeme primijetio da vinova loza, koju su francuski uzgajivači u regiji Bordeaux premazali navedenom smjesom kako bi grožđe bilo neprivlačno za prolaznike i životinje, nije bila zaražena peronosporom, odnosno plamenjačom. Ta situacija ga je navela da izvede pokuse koji su konačno potvrdili da ova smjesa može učinkovito kontrolirati bolest plijesni uz vrlo nisku cijenu (Lamichhane i sur., 2018.). Bordeaux smjesa ili bordoška juha sa sastavom bakrovog sulfata, gašenog vapna i vode smatra se prvim otkrivenim fungicidom koji se koristi za suzbijanje peronospore vinove loze koju uzrokuje *Plasmopara viticola*, patogen oomicete (Millardet, 1886.; Banik i Pérez-de-Luque, 2017.). Također, uz bordošku juhu, nekoliko godina kasnije pojavila se i tzv. burgundska smjesa koja je sadržavala bakrov sulfat i natrijev karbonat (kristalna soda). U to vrijeme bordoška i burgundska smjesa postaju nezaobilazni fungicidi protiv raznih gljivičnih oboljenja biljaka, pri čemu prevencija uključuje odgovarajuće vrijeme i pravilnu primjenu fungicida (Rusjan, 2012.).

Da bi se izbjeglo dugotrajno otapanje modre galice u vodi, kao i priprema bordoške juhe, tvornice su na tržište plasirale sredstvo u obliku praha. Prah je sadržavao bakrov oksiklorid, rjeđe sulfat pomiješan sa spojem koji regulira kiselost pripravka. Između dva rata na hrvatsko tržište dolazili su fungicidi pod nazivima Urania, Wacker, Kupferkalk (bakrovo vapno), a nakon 1946. god. u Hrvatskoj je formuliran sličan proizvod pod nazivom Sfinks. Uslijedio je čitav niz industrijskih pripravaka na osnovi bakra, u početku bakrov oksiklorid i hidroksidi, a kasnije i bakaroksinat (1946.), bakrov oksid te bakrov karbonat (Bažok i sur., 2020.). Sve do 1940-ih

kemijska kontrola bolesti oslanjala se na anorganske kemijske pripravke koje je često pripremao sam korisnik (Morton i Staub, 2008.).

Proizvodnja bakrovog acetata prvi put se pojavila u Francuskoj, gdje se primijenio izraz „verdigris“ (*verte grez*). Bakreni acetati različitog kemijskog sastava čine zelene, zeleno-plave, plavo-zelene i plave pigmente (Rusjan, 2012.). Osnovni verdigris nastaje iz kombinacije zraka, vodene pare, pare octene kiseline i bakra ili mješavine bakrene legure. Formira čvrstu tvar od plavog ili plavo-zelenog materijala (Kühn, 1997.; Rusjan, 2012.). Kod prerade grožđa i proizvodnje vina korišteni su bakreni limovi čija bi se površina, koja se neko vrijeme izlagala zraku, obložila verdigrisom. Dobiveni produkt poznat je kao plavi verdigris te se u koncentraciji od 1 kg baznog acetata bakra u 500 litara vode koristio kao fungicid. Danas se priprema otapanjem bakrovog oksida ili bakrovog karbonata u octenoj kiselini, no može se proizvesti i obradom otopine bakrovog sulfata s olovnom acetatom ili reakcijom octene kiseline i bakra s naknadnom kristalizacijom (Rusjan, 2012.).

Sredinom 17. stoljeća Robert Boyle je prvi proizveo bakrov klorid iz živinog(II) klorida i metala bakra. Kasnije, Proust J.L. je dobio bakrov(I) klorid (CuCl), bijelu čvrstu tvar toplivu u koncentriranoj solnoj kiselini, zagrijavanjem bakrovog(II) klorida, CuCl_2 , na crvenoj vrućini u odsutnosti zraka, uzrokujući da izgubi polovicu svog kombiniranog klora, nakon čega je uslijedilo uklanjanje zaostalog CuCl_2 ispiranjem vodom te primjenom koja se široko koristila za grijanje i rasvjetu. Tijekom 19. i ranog 20. stoljeća kiselina otopina CuCl se koristila za analizu sadržaja ugljikovog monoksida u plinovima, primjerice u Hempelovom plinskom aparatu. Danas, bakrov(I) klorid se u glavnini upotrebljava u fitokemiji kao prekursor fungicida na bazi bakrovog oksiklorida (dibakrov klorid trihidroksid; $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$) (Rusjan, 2012.).

Glavni fungicidi korišteni do 1940. navedeni su u tablici 2.1.1.1. Općenito, kemijska kontrola bolesti bila je usmjerena na hortikulturene usjeve (voće i povrće), kao i na tretiranje sjemena.

Tablica 2.1.1.1. Fungicidi u upotrebi do 1940. godine

Godina	Fungicid	Primarna upotreba
1637.	Salamura	Tretiranje sjemena žitarica
1755.	Arsen	Tretiranje sjemena žitarica
1760.	Bakrov sulfat	Tretiranje sjemena žitarica
1824.	Sumpor (prašivo)	Pepelnica i drugi uzročnici bolesti
1833.	Vapneni sumpor	Široki spektar folijarnih patogena
1885.	Bordoška juha	Široki spektar folijarnih patogena
1891.	Živin klorid	Fungicid za travnjak
1900.	CuOCl ₂	Osobito za Phytophthora infestans
1914.	Fenil živin klorid	Tretiranje sjemena žitarica
1932.	Cu ₂ O	Široki spektar folijarnih bolesti i bolesti sjemena
1934.	Patentirani ditiokarbamati	Sredstva za zaštitu širokog spektra
1940.	Kloranil, diklon	Tretiranje sjemena (široki spektar)

Izvor: Russell P. E. (2005). A century of fungicide evolution. *Journal of Agricultural Science*, 143:11-25; Morton V. and Staub T. (2008). A Short History of Fungicides. Online, APSnet Features.

<https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx> - pristup 10.07.2022.

Dani procvata proizvodnje fungicida na bazi bakrenih spojeva bili su sredinom 20. stoljeća kada su se primjenjivale različite kemijske kombinacije s bakrom. Kao dokaz uspješne metode zaštite bilja do danas, godišnje se u poljoprivredi diljem svijeta koristi više tisuća tona bakra. Posljednjih desetljeća farmaceutske korporacije proizvode fungicide na bazi bakra u topivim oblicima sulfata, oksiklorida, acetata, karbonata, oleata, silikata, hidroksida itd. (Rusjan, 2012.).

2.1.2. Način djelovanja bakrenih spojeva

Bakar ima važnu ulogu u ljudskoj prehrani te je sa željezom ključan za crvenkastu boju hemoglobina u krvi. Neophodan je kod svih viših organizama (biljki, životinja), posebno u ciklusima i funkcijama rasta i razmnožavanja. Prosječni dnevni preporučeni unos bakra trebao bi biti 0,9 mg, a nedostatak toga često dovodi do povećanja razine kolesterola i koronarnih bolesti. Toksičnost bakra u smislu ljudskog zdravlja može se uočiti pri koncentracijama višim od 11,0 mg kg⁻¹, utječući na funkcije glavnih vitalnih organa. Dugotrajna izloženost toksičnim koncentracijama bakra dovodi do nepopravljivih oštećenja želuca, bubrega, jetre i mozga,

stoga svakodnevna prehrana treba biti pod stalnom sanitarnom (kemijskom) kontrolom (Rusjan, 2012.).

Bakar sudjeluje u brojnim fiziološkim i biokemijskim procesima, kao što su fotosinteza, respiracija, lignifikacija, metabolizam fenola, regulacija auksina, reprodukcija i sl., te je bitan kofaktor za mnoge metaloproteine. Međutim, višak bakra dovodi do problema u funkciji stanica i metabolizmu, budući da višak bakra inhibira rast biljaka i oštećuje važne stanične procese, kao što je fotosintetski prijenos elektrona (Rusjan, 2012.). Naime, bakar je normalno prisutan u tkivima mnogih biljnih vrsta u koncentracijama u rasponu od 1 do 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase (Beni i Rossi, 2009.; La Torre i sur., 2018.). Nedostatak bakra otkriva se ispod 2 - 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase, dok su prvi simptomi fitotoksičnosti bakra zabilježeni pri koncentracijama od 15 - 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhe mase (NAS, 1977.; Yruela, 2005.; Xiong i Wang, 2005.; La Torre i sur., 2018.). Biljke koje rastu na kontaminiranom tlu mogu akumulirati visoke koncentracije bakra u svojim tkivima (Bargagli, 1998.; La Torre i sur., 2018.). Glavni simptomi viška bakra su poremećeni rast korijena i izdanaka (Miotto i sur., 2014.; La Torre i sur., 2018.), nedostatak hranjivih tvari, kloroza i, u težim slučajevima, nekroza tkiva što dovodi do smrti biljke (Marschner, 1995.; Kopsell i Kopsell, 2007.; La Torre i sur., 2018.).

Većina spojeva bakra ima oksidacijska stanja Cu^+ i Cu^{2+} , koji su topljivi u vodi te pružaju antifungalno i antibakterijsko djelovanje (biostatički elementi) pri niskim koncentracijama, stoga je njihov doprinos u proizvodnji fungicida do danas nezamjenjiv. Njihova učinkovitost protiv gljivičnih i bakterijskih infekcija najviše se očituje u sposobnosti zadržavanja na površini biljke, ali ne i u broju primjena ili koncentraciji agensa u fungicidu. Spojevi bakra stvaraju zaštitnu barijeru na površini biljke i tako sprječavaju gljivice da uđu u biljku domaćina. Također, bakar je biostatičan što znači da se bakterije ne mogu razvijati na površinama tretiranim njime. Sav bakar koji iscuri u tlo oko biljaka je netoksičan i neće negativno utjecati na biljke ili ljude koji konzumiraju povrće i voće (Rusjan, 2012.).

Bakrov(II) ion (Cu^{2+}) je aktivni sastojak sredstava za zaštitu bilja te u prisutnosti kiše, rose, ugljičnog dioksida u zraku i drugih okolišnih čimbenika djeluje protiv oomiceta, gljivica i bakterija. Ioni bakra djeluju nespecifično na razini stanične membrane, dovodeći do denaturacije strukturnih i enzimskih proteina te mijenjajući polupropusnost membrane. Ioni bakra otopljeni u slojevima vode na površini biljke mogu ući u staničnu protoplazmu oomiceta, gljivica i bakterija. Četiri klase prijenosnika uključene su u prijenos bakra: COPT, ZIP, YSL i HMA (Williams i sur., 2000.; Burkhead i sur., 2009.; Aguirre i Pilon, 2016.; La Torre i sur., 2018.). Kad jednom uđu u stanice, ioni bakra ometaju brojne enzimske reakcije, blokirajući respiratornu aktivnost s posljedičnom inhibicijom klijanja spora. Bakar se koristi kao zaštitno sredstvo, što znači da ioni bakra moraju biti prisutni na površini biljaka prije nego što se pojave bolesti (La Torre i sur., 2018.).

Otpornost patogena na bakar vjerojatno se neće razviti zbog načina djelovanja bakrenih iona na više mjesta. Prema izvješću Odbora za djelovanje otpornosti na fungicide, oomicete i gljive nisu pokazale otpornost na različite spojeve bakra. Međutim, nekoliko bakterijskih patogena razvilo je otpornost na metal (La Torre i sur., 2018.).

Bakar se primjenjuje kao kontaktni zaštitni folijarni sprej te se taloži na površini lista pri čemu se ne apsorbira u biljno tkivo. Iz tog razloga, nakon primjene metal dospijeva u tlo mehaničkim djelovanjem vjetra ili nakon što ga ispere kiša ili navodnjavanjem. Budući da se bakar ne može razgraditi, a njegovo uklanjanje iz tla ispiranjem, otjecanjem ili unosom u biljke je zanemarivo, ovaj teški metal potencijalno može dugo ostati kao kontaminant u okolišu i uzrokovati bioakumulaciju i toksičnost (Flores-Vélez i sur., 1996.; Eisler, 1998.; Torres i Johnson, 2001.; Xiong i Wang, 2005.; Komárek i sur., 2010.; Mackie i sur., 2012.; Lamichhane i sur., 2018.; La Torre i sur., 2018.). Budući da je metalni element, bakar se ne razgrađuje i nastavlja kružiti u okolišu nakon otpuštanja (Eisler, 1998.; La Torre i sur., 2018.). Stoga, ponovljena uporaba baktericida i fungicida na bazi bakra, kako bi se suzbile biljne bolesti, dovodi do nakupljanja bakra u tlu (La Torre i sur., 2018.). Iako su granične vrijednosti bakra u tlu postavljene od 50 do 140 mg kg⁻¹ suhe tvari (Direktiva Vijeća 86/278/EEZ), teško je utvrditi koncentraciju bakra koja može izazvati toksičnost za biljke, jer to ne ovisi o ukupnom sadržaju bakra u tlu, nego o udjelu dostupnog bakra u tlu (oblici metala koji biljke mogu iskoristiti). Bakar se u tlu pojavljuje u različitim oblicima (ionski, kompleksan, istaložen) ovisno o karakteristikama tla, kao što su tekstura, organska tvar i pH. Ovi čimbenici variraju u okolišu, modulirajući dostupnost bakra te mogući nedostatak ili toksičnost (Flemming i Trevors, 1989.; La Torre i sur., 2018.).

2.1.3. Upotreba bakrenih spojeva

Bakar je važan metal, što može potvrditi njegova svjetska godišnja proizvodnja koja iznosi oko 5 milijuna tona (t). Mnoge grane suvremene tehnologije koriste i uključuju bakar u svoje proizvode, posebice u elektrotehničkoj, arhitektonskoj, kemijskoj industriji te medicini. Najveća nalazišta bakra nalaze se u Čileu, SAD-u, Indoneziji, Australiji i Kini, gdje je postao metal koji se najviše izvozi (Rusjan, 2012.).

U današnje vrijeme znatan broj fitokemijskih tvrtki nudi brojne i različite klase fungicida, gdje bakreni fungicidi zbog svojih antifungalnih i antibakterijskih učinaka igraju važnu ulogu (Rusjan, 2012.). U najvažnije prednosti bakrenih spojeva spadaju relativno visoka toksičnost za biljne patogene, a niska toksičnost za sisavce, niska cijena te kemijska stabilnost koja sprječava njihovo brzo ispiranje s biljnih površina i duga rezidualna razdoblja (Cha i Cooksey, 1991.; Lamichhane i sur., 2018.). Dokazano je da suspenzija fino usitnjenog bakra ima izraženo fungicidno djelovanje (Large, 1943.; Banik i Pérez-de-Luque, 2017.). Također, preporučuju se i naširoko koriste različiti bakreni spojevi za kontrolu biljnih bolesti uzrokovanih bakterijama

(Janse, 2005.; Banik i Pérez-de-Luque, 2017.). Ekološka poljoprivreda se još uvijek oslanja na bakar za kontrolu nekih bolesti (Dorn i sur., 2007.; Banik i Pérez-de-Luque, 2017.).

Prema Rusjanu (2012.), u spojeve bakra kao nesistemične fungicide spadaju bordoška juha, bakrov hidroksid, bakrov arsenat, bakrov karbonat, bakrov oksid, bakrov oksiklorid itd. Podjela bakrenih fungicida prema kemijskoj strukturi:

- bakrov sulfat (modra galica, bakrov(II) sulfat; CuSO_4),
- bakrov acetat (bakrov(II) acetat; $\text{Cu}(\text{OAc})_2$),
- bakrov oksid (bakrov(I) oksid; Cu_2O),
- bakrov klorid (bakrov(II) klorid; CuCl_2),
- bakrov oksiklorid (bakrov(II) oksiklorid; $\text{CuCl}_2 \times 3\text{Cu}(\text{OH})_2$),
- bakrov klorid (bakrov(I) klorid; CuCl),
- bakrov nitrat (bakrov(II) nitrat; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$),
- bakrov cijanid (bakar(I) cijanid; CuCN),
- bakreni sapun (otopina bakrenog oktanoata),
- bakrov naftenat.

Kako navodi Rusjan (2012.), bakrov(II) sulfat je vrlo svestran kemijski spoj sa širokom primjenom u industriji i hortikulturi. Najčešće je korišten oblik bakra u pesticidima protiv mnogih bolesti. Fungicid koji sadrži bakrov sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), pomiješan s hidratiziranim vapnom ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) naziva se bordoška juha ili, pomiješan s natrijevim karbonatom ($\text{Na}_2(\text{CO})_3$), Burgundska smjesa. Obje bakrene otopine koriste se već više od 200 godina, naročito u kontroli gljivičnih bolesti u hortikulturi (vinogradi, voćnjaci itd.).



Slika 2.1.3.1. Bakrov sulfat

Izvor: Clegg B. (2012). Copper sulfate. Royal Society of Chemistry. Chemistry world.

<https://www.chemistryworld.com/podcasts/copper-sulfate/3005745.article> - pristup 17.07.2022.

Bakrov(II) acetat poznat je i kao bakrov acetat s kemijskom formulom $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, gdje OAc^- označava acetat (CH_3COO^-). Od davnina se bakrovi acetati u određenom obliku koriste kao fungicidi (zelenkaste boje), a danas sve češće kao reagensi za sintezu mnogih anorganskih i organskih spojeva. Komercijalno dostupni bakrovi acetati su u hidratiziranim oblicima ($\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 199,67 \text{ g mol}^{-1}$) koji sadrže jednu molekulu vode za svaki atom Cu (Rusjan, 2012.).

Bakrov(I) oksid (Cu_2O ; $M_r = 143,08 \text{ g mol}^{-1}$) je u prirodi prisutan kao kuprit, tamnocrveni kristali ili zrnasti prah, formiran na bakru toplinom. Bakrov oksid se obično koristi kao pigment (bojanje porculana i stakla), fungicid (preljevi sjemena) i sredstvo za zaštitu od hrđe kod pomorskih boja (Rusjan, 2012.).

Prema Rusjanu (2012.), bakrov(II) klorid je svjetlosmeđi čvrsti kemijski spoj formule CuCl_2 i ima potencijal polagane apsorpcije vlage i stvaranja plavo-zelenog dihidrata. Poznato je nekoliko pripravaka bakrovog klorida koji se koriste kao fungicidi u poljoprivredi:

- kloriranje bakra: $\text{Cu} + \text{Cl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$;
- obrada Cu hidroksida, oksida ili Cu(II) karbonata klorovodičnom kiselinom;
- bezvodni CuCl_2 pripremljen izravno spajanjem bakra i klora;
- kristalizacijom vruće razrijeđene klorovodične kiseline, hlađenjem u CaCl_2 -ledenoj kupelji.

Bakrov oksiklorid je zeleni prah koji se koristi kao sredstvo za plavu boju i kao fungicid (u obliku praha, močivih prašiva i pasta) koji kontrolira širok raspon gljivičnih i bakterijskih bolesti voća, povrća i ukrasnog bilja. Također, sastavni je dio određenih herbicida i insekticida (Rusjan, 2012.).

Bakrov(II) nitrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) je u bezvodnom obliku plave boje, kristalan te se koristi za formuliranje fungicida i herbicida. Bakrov nitrat hidrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) pojavljuje se ili kao zeleni prah ili plavo kristaliziran, topiv je u vodi, a koristi se u galvanizaciji bakra na željezu, kao katalizator, nitrirajući agens u organskim reakcijama, fungicid, sredstvo za zaštitu drveta te kao pigment za keramiku (Rusjan, 2012.).

Bakrov naftenat je bakrena sol naftenske kiseline, koja je složena prirodna smjesa masnih kiselina te nusprodukt rafiniranja nafte. Tipični proizvod bakrovog naftenata pojavljuje se kao zelena tekućina s oko 19% bakrovog naftenata i 81% navedenih sastojaka. Naftenati se uglavnom primjenjuju za industrijsku upotrebu, uključujući proizvodnju sintetičkih deterdženata, maziva, inhibitora korozije, aditiva za goriva i ulja za podmazivanje i slično. Proizvodi od bakrovog naftenata vrlo su učinkoviti protiv fitopatogenih gljiva i insekata koji uništavaju drvo. Osim toga, vodootporna svojstva naftenata sprječavaju truljenje i produžuju životni vijek drva (Rusjan, 2012.).

Bakreni sapun, poznat i kao bakreni oktanoat ili oktanska kiselina (kao aktivna tvar u konc. oko 0,08 %), uglavnom se koristi za suzbijanje gljivičnih i bakterijskih bolesti biljaka (pepelnica, crna pjegavost, plamenjača, peronospora, siva plijesan i mnoge druge). Bakreni sapun nastaje kombiniranjem topljivog Cu gnojiva s prirodnom masnom kiselinom. Sapun se primjenjuje prskanjem svih biljnih površina dva tjedna prije zaraze i pojave bolesti. Primjenjuje se kod prvih znakova bolesti i ponavlja svakih 7 - 10 dana dok ne nestanu povoljni uvjeti za bolest (Rusjan, 2012.).

Bakar ima važnu ulogu ne samo u suzbijanju patogena već i u gnojidbi tla, hranidbi životinja itd. Preduga upotreba bakra u zaštiti bilja i u smislu gnojidbe u modernoj poljoprivredi dovodi do nakupljanja bakra u tlima, pri čemu nastaje višak bakra što utječe na fiziološke i biokemijske potrebe biljaka. Naime, konvencionalna poljoprivreda može koristiti različite vrste pesticida (kontaktne, citotropne, translaminarne, sistemske pesticide), dok ekološka poljoprivreda primarno koristi spojeve bakra za upravljanje bolestima, zbog nedostatka valjanih alternativa. Studije koje su ispitivale ekološke i konvencionalne vinograde u središnjoj Italiji otkrile su veće koncentracije bakra u tlima organskih vinograda u usporedbi s konvencionalnim vinogradima (Beni i Rossi, 2009.; La Torre i sur., 2018.). S druge strane, nedostatka bakra u tlu također može utjecati na prehrambeni status životinja te posljedično na njihov životni vijek (Rusjan, 2012.).

2.1.4. Komercijalna sredstva na osnovi bakra na hrvatskom tržištu

U Hrvatskoj se zakonskim odredbama uređuje sustav registracije i izdavanje rješenja o odobravanju stavljanja na tržište sredstava za zaštitu bilja, određuju uvjeti njihove primjene, ograničenja uporabe, uvjeti za distributere i korisnike, uvjeti za uređaje za primjenu pesticida, postregistracijska kontrola SZB, monitoring ostataka pesticida, inspeksijski nadzor te drugi zahtjevi vezani uz SZB i njihovu uporabu. Ministarstvo poljoprivrede periodično objavljuje Upisnik sredstava za zaštitu bilja u Narodnim novinama, najmanje jednom godišnje, na temelju zakonskih odredbi o sredstvima za zaštitu bilja (Matković, 2016.).

U Upisnik sredstava za zaštitu bilja RH upisana su ukupno 254 fungicida od 39 različitih proizvođača SZB, kombinirajući 74 aktivne tvari. Fungicidi čine 35% od ukupno upisanih SZB u Upisnik. Najveći broj upisanih fungicida sadrži samo jednu aktivnu tvar (61%), na drugom mjestu po brojnosti su fungicidi koji sadrže dvije, a na trećem fungicidi koji sadrže tri aktivne tvari. Najbrojniju skupinu čine fungicidi koji u sebi sadrže bakar (13%), zatim slijede fungicidi koji sadrže aktivnu tvar mankozeb (8%) te fungicidi koji u sebi sadrže sumpor (7%) ili folpet (7%). Upisani fungicidi nalaze se u 19 različitih formulacija, pri čemu je 51% fungicida u tekućem obliku, a 49% u krutom obliku. Najveći broj fungicida, čak 50%, u obliku je koncentrata za suspenziju (SC) ili močivog prašiva (WP). Fungicidi iz Upisnika registrirani su za primjenu na više od 100 različitih kultura, suzbijaju više od 100 različitih uzročnika bolesti,

odnosno registrirani su za više od 2 000 različitih namjena. Promatrajući spektar djelovanja, najveći broj fungicida je registriran za suzbijanje plamenjače/peronospore (43%) i pepelnice (36%). Na primjer, neki fungicidi su registrirani za primjenu u samo jednoj kulturi, dok drugi imaju dozvolu za primjenu i u više od 10 poljoprivrednih kultura. Najveći broj fungicida registriran je za primjenu kod vinove loze (57%), na jabuci (33%), krumpiru i pšenici (27%) te rajčici (26%), dok s druge strane najmanji broj fungicida ima dozvolu za primjenu kod određenih povrtnih kultura, kao što su blitva, cikla, kelj, korabica i dr. (Matković, 2016.).

Tablica 2.1.4.1. Popis registriranih sredstava za zaštitu bilja u RH na dan 24.08.2022. – registrirana SZB kojima je aktivna tvar bakar

Naziv SZB	Opis sredstva	Naziv aktivne tvari
Bordoška juha Caffaro 20 WP	Kontaktni preventivni fungicid za suzbijanje biljnih bolesti	Bordoška juha
Bordoška juha 20 WP – Manica	Kontaktni preventivni fungicid	Bordoška juha
Champion Flow SC	Preventivni kontakti fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, hmeljarstvu i povrćarstvu	Bakreni hidroksid
Champion WG 50	Preventivni kontakti fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu i povrćarstvu	Bakreni hidroksid
Cuprocaffaro 50 WP	Preventivni fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, hmeljarstvu i povrtlarstvu	Bakreni oksiklorid
Modro ulje	Insekticid, fungicid i akaricid za zaštitu nasada u mirovanju vegetacije	Parafinsko ulje, bakreni hidroksid
Neoram WG	Kontaktni preventivni fungicid za suzbijanje biljnih bolesti	Bakreni oksiklorid
Nordox 75 WG	Kontaktni preventivni fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu,	Bakreni oksid

	maslinarstvu, povrćarstvu i voćarstvu	
Amaline Flow	Fungicid namijenjen za suzbijanje plamenjače vinove loze	Zoksamid, tribazični bakreni sulfat
Optix R	Fungicid namijenjen suzbijanju plamenjače na vinovoj lozi	Fosetil, tribazični bakreni sulfat
Ridomil Gold R	Fungicid namijenjen suzbijanju biljnih bolesti u vinogradarstvu i povrćarstvu	Metalaksil-M, bakreni oksiklorid
Cyclo R Liquido	Fungicid namijenjen suzbijanju biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu i povrćarstvu	Bakreni hidroksid, metalaksil
Red Fox	Fungicid, insekticid i akaricid za suzbijanje biljnih bolesti i štetnika u vinogradarstvu, voćarstvu i maslinarstvu	Parafinsko ulje, bakreni oksid
Codimur SC	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, povrćarstvu i u proizvodnji ukrasnog bilja	Bakreni oksiklorid
Copper Key Flow	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, povrćarstvu i u proizvodnji ukrasnog bilja	Bakreni oksiklorid
Cupra	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, povrćarstvu i u proizvodnji ukrasnog bilja	Bakreni oksiklorid
Copper Key	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, povrćarstvu i u proizvodnji ukrasnog bilja	Bakreni oksiklorid
Codimur 50	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, povrćarstvu i u proizvodnji ukrasnog bilja	Bakreni oksiklorid

Copper Lainco	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu, voćarstvu, povrćarstvu i u proizvodnji ukrasnog bilja	Bakreni oksiklorid
Cuprablau Z 35 WG	Fungicid i baktericid koji se koristi za suzbijanje biljnih bolesti u voćarstvu, vinogradarstvu, povrćarstvu, ratarstvu i na ukrasnom bilju	Bakreni oksiklorid
Bordoflow	Fungicid namijenjen suzbijanju biljnih bolesti u vinogradarstvu i povrćarstvu	Bordoška juha
Airone SC	Fungicid i baktericid za suzbijanje biljnih bolesti u voćarstvu, povrćarstvu i ukrasnom bilju	Bakreni hidroksid, bakreni oksiklorid
Fantic A	Fungicid za suzbijanje biljnih bolesti u vinogradarstvu i povrćarstvu	Benalaksil M, bakreni hidroksid, bakreni oksiklorid
Copforce Extra	Fungicid namijenjen suzbijanju plamenjače na krumpiru	Cimoksanil, bakreni hidroksid

Izvor: <https://fis.mps.hr/trazilicaszb/#>

2.2. Formulacije sredstava za zaštitu bilja

Sredstva za zaštitu bilja se stavljaju na tržište kao posebno formulirani pripravci. Formulirani pripravci korisniku trebaju osigurati jednostavnu uporabu i rukovanje, manju izloženost primjenitelja aktivnoj tvari tijekom uporabe, učinkovitost aktivne tvari, ravnomjernu raspodjelu aktivne tvari tijekom primjene te stabilnost SZB na određeno razdoblje (tijekom skladištenja). Upravo zbog takvih razloga dolazi do razvoja i uporabe različitih formulacija. Danas je u svijetu prepoznato više od 90 vrsta formulacija za SZB. U Hrvatskoj se na tržištu nalazi više od 30 različitih vrsta formulacija SZB, a najzastupljenije su koncentracije za emulziju (EC), koncentracije za suspenziju (SC), močiva prašiva (WP), koncentracije za otopinu (SL) i samodispergirajuće mikrogranule (WG). Oko 80% registriranih SZB u Hrvatskoj je u pet navedenih formulacija (Bokulić i sur., 2015.).

Unatoč naizgled širokom rasponu fungicidnih proizvoda dostupnih na tržištu, postoji jasna potreba za novim i inovativnim fungicidima, potaknuta upravljanjem otpornošću, regulacijskim preprekama, sve većim očekivanjima kupaca, novim bolestima i njihovom

širenju. Učinkovito suzbijanje nekih biljnih bolesti (npr. *Pythium spp.*, *Fusarium* kod pšenice te razne bakterijske i virusne bolesti) s trenutnim proizvodima i dalje predstavlja izazov. Fungicidi s novim načinom djelovanja su od posebnog interesa, budući da igraju ključnu ulogu u kontroli bolesti i upravljanju otpornošću kod moderne prilagođene populacije biljnih patogena, ali jednako su važni i novi fungicidi s utvrđenim načinom djelovanja s poboljšanim karakteristikama, kao što su sistemičnost, ljekovitost i dugotrajnost kontrole bolesti (Leadbeater, 2015.).

Zbog visoke toksičnosti za sisavce i lošeg utjecaja na okoliš, znanstvena zajednica pristupila je razvoju novih molekula koje su lako biorazgradive, ciljano specifične s vrlo niskom toksičnošću za sisavce. Među znanstvenicima došlo je do podjele mišljenja te se trebalo odlučiti između proizvoda za zaštitu bilja na biološkoj osnovi ili sintetičkih kemikalija za zaštitu usjeva. Provedena su istraživanja kako bi se razvile sigurnije molekule koje bi mogle biti podvrgnute fotodegradaciji, mikrobnj degradaciji i kemijskoj degradaciji ostavljajući mnogo manje ostataka u okolišu. Glavni cilj je pružiti zaštitu usjevima zajedno sa sigurnošću za prirodne neprijatelje različitih štetnika kao i cjelokupnu sigurnost za okoliš (Bhattacharyya i sur., 2009.).

Inkapsulacija je definirana kao tehnologija za inkapsulaciju/zaštitu krutih, tekućih i plinovitih tvari u minijturnim, zapečaćenim kapsulama koje imaju sposobnost ispuštati svoj sadržaj kontroliranom brzinom u posebnim uvjetima. Inkapsulacija uključuje ugradnju bioaktivnih tvari, stanica ili drugih materijala u male kapsule (Lopez-Rubio i sur., 2006.; Usmiati i sur., 2014.). S obzirom na veličinu nastale čestice dijele se na: nanočestice (10 – 1000 nm), mikročestice (2 – 2000 µm) i makročestice (>2000 µm) (Singh i sur., 2010.; Bedek, 2018.). Čestice mogu biti pravilnog i nepravilnog oblika te se s obzirom na morfologiju mogu klasificirati kao: mononuklearne i polinuklearne kapsule i sfere (Gallo i Carbo, 2010.; Bedek, 2018.). Mononuklearne kapsule imaju jezgru okruženu membranom, polinuklearne imaju više jezgri unutar membrane, dok je sfera jezgra bez membrane ili bilo kojeg drugog vanjskog sloja. Uz ove tri osnovne klasifikacije, kapsule mogu biti i dvojezgrene i višeslojne mikrokapsule s jednom jezgrom ili mogu formirati skupinu kapsula (Kumar Das i sur., 2011.; Bedek, 2018.).

Tehnologija inkapsulacije se sve više razvija s ciljem zaštite nestabilnih spojeva od nepovoljnih uvjeta, osiguravanjem kontroliranog oslobađanja i isporuke bioaktivnih tvari na ciljno mjesto nakon primjene (de Vos i sur., 2010.; Usmiati i sur., 2014.). Inkapsulirane tvari mogu se zaštititi od vlage, topline ili drugih ekstremnih uvjeta, čime se poboljšava njihova stabilnost i postiže održivost (Jimenez i sur., 2004.; Usmiati i sur., 2014.). Drugim riječima, tehnologija inkapsuliranja omogućuje osjetljivim materijalima da se fizički obaviju zaštitnim materijalom, kako bi se aktivni sastojci zaštitili od neželjenih međudjelovanja, vremenskih utjecaja, gubitaka isparavanjem i sl. (Ferrándiz i sur., 2017.; Bedek, 2018.).

Postoje razne metode za pripremu mikročestica, a njihov odabir ovisi o karakteristikama materijala jezgre te svojstvima aktivnih sastojaka. Metode inkapsulacije se dijele na: fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, procesi koji koriste superkritične fluide), fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) i kemijske (granična polimerizacija, umrežavanje, *in situ* polimerizacija itd.) (Gallo i Carbo, 2010.; Teixeira da Silva i sur., 2014.; Bedek, 2018.).

Izbor metode inkapsulacije ovisi o primjeni mikročestica, vrsti i veličini aktivnih sastojaka, fizičkim i kemijskim karakteristikama jezgre i membrane, mehanizmu oslobađanja aktivnih sastojaka, okolinskim uvjetima te financijskim troškovima. Materijali mogu biti odabrani iz širokog raspona prirodnih i sintetičkih polimera, uključujući ugljikohidrate (škrob, modificirani škrob, saharoza, celuloza, dekstrin i kitozan), proteine (želatina, gluten, albumin, kazein), gume (karagenan, guma arabika, alginat), lipide (monogliceride i digliceride, parafin, vosak, hidrogenirana ulja i masti) ili anorganske materijale (kalcijev sulfat i silikati) (Teixeira da Silva i sur., 2014.; Ferrándiz i sur., 2017.; Bedek, 2018.). Kod pripreme kapsula vrlo je bitno odabrati materijal za oblaganje koji neće reagirati s aktivnim sastojcima i difundirati u jezgru, koji ima sposobnost pričvršćivanja i održavanja jezgre unutar kapsule te posjeduje sposobnost pružanja maksimalne zaštite jezgre (Teixeira da Silva i sur., 2014.; Singh i sur., 2010.; Bedek, 2018.).

2.2.1. Inkapsulacija metodom ionskog geliranja

Metoda inkapsulacije koristi odgovarajuće biopolimere za zaštitu bioaktivne tvari, koja je osjetljiva na ekstremne uvjete, te za vremensko oslobađanje tih bioaktivnih tvari (Usmiati i sur., 2014.). Jedna od takvih metoda, kojom se pripravljaju čestice na bazi polisaharida (i njihovih derivata) za inkapsulaciju funkcionalnih tvari makromolekula, je ionsko geliranje/kompleksacija polielektrolita (Racovića i sur., 2009.). Razni terapijski agensi, poput antibiotika, hormona, enzima i probiotika, ugrađeni su u zrnca određenih polisaharida kako bi se postigao sustav kontroliranog otpuštanja (Usmiati i sur., 2014.).

Mnogi polimeri su korišteni za pripremu mikrokapsula, no preferiraju se oni prirodnog podrijetla, biopolimeri, jer ispunjavaju uvjete biokompatibilnosti, biorazgradivosti i odsutnosti toksičnosti (Malafaya i sur., 2007.; Liu i sur., 2008.; Usmiati i sur., 2014.). Biopolimeri se nalaze u prirodi u velikim količinama, obnovljivi su i relativno jeftini. Također, njihovo vrlo važno svojstvo je visok sadržaj funkcionalnih skupina, kao što su hidroksi, amino i karboksilne skupine, koje omogućuju modificiranje njihovih karakteristika promjenom fizikalno-kemijskih uvjeta sredine (npr. sastav medija, pH i temperatura) (Usmiati i sur., 2014.).

Inkapsulacija metodom ionskog geliranja je metoda koja koristi vrlo blage uvjete, stoga ima opću sposobnost zaštite kapsuliranih molekula i zadržavanja njihove aktivnosti tijekom inkapsulacije (Usmiati i sur., 2014.). Osim toga, reverzibilnim fizičkim umrežavanjem polisaharidnih lanaca elektrostatskom interakcijom izbjegavaju se neželjeni učinci, poput korištenja toksičnih reagensa, što je posljedica kemijskog umrežavanja (Racovitā i sur., 2009.).

Polisaharidi (alginat, gellan guma, pektin i sl.) se u procesu ionskog geliranja otapaju u vodi ili slabo kiselom mediju (kitozan), pri čemu se otopina polisaharida istiskuje iglom ili mlaznicom, uz konstantno miješanje, u otopinu koja sadrži, najčešće, katione suprotnog naboja (Bedek, 2018.). Drugim riječima, inkapsulacija metodom ionskog geliranja podrazumijeva dodavanje otopine polisaharida kap po kap u različite otopine protuiona uz stalno miješanje te se na taj način dobiju polisaharidne sfere (Usmiati i sur., 2014.). Kako navode Racovitā i sur. (2009.; Bedek, 2018.), ioni suprotnog naboja, koji se koriste za ionsko geliranje, mogu se podijeliti u dvije glavne skupine:

1. Ioni niske molekulske mase (nastali disocijacijom soli: $MgCl_2$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ te pirofosfat, tripolifosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat i $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$,
2. Ioni visoke molekulske mase (npr. lauril sulfat, oktil sulfat, cetilstearil sulfat, heksadecil sulfat).

Otopina polisaharida se dodaje u otopinu gelirajućeg kationa koji se veže na lance polisaharida suprotnog naboja te dolazi do umrežavanja i taloženja okruglih čestica, kao npr. kod miješanja natrijevog alginata s kalcijevim kloridom, odnosno kalcijevim ionima. Nakon postupka mikročestice (mikrosfere) se odstrane filtriranjem, isperu destiliranom vodom i osuše (Racovitā i sur., 2009.; Bedek, 2018.).

Među već proučene i vrlo obećavajuće biomaterijale za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva spadaju: kitozan, karagenan, Gellan guma, pektin, alginat i polilaktična kiselina (PLA) (Lopez-Rubio i sur., 2006.; Usmiati i sur., 2014.). Ovi polisaharidi, odnosno biopolimeri, se dobivaju iz poljoprivrednih sirovina ili ljuska rakova (Racovitā i sur., 2009.).

Alginati su amonijeve i metalne soli alginske kiseline koja pripada skupini polisaharida prirodnog podrijetla, a dobiva se iz različitih smeđih morskih algi (*Phaeophyceae*) (Perinović Jozić, 2020.). Intenzivnim istraživanjima ovog biopolimera otkrivena su njegova svojstva zadržavanja vode, stvaranja filmova i gelova te sposobnost stabilizacije emulzija i disperzija (Draget i sur., 2005.; Mišić, 2017.). Prema tome, alginati imaju široku primjenu u kozmetici, medicini, farmaceutskoj industriji, biotehnologiji itd. Soli jednovalentnih kationa, kao što je natrijev alginat ($NaAlg$), lako su topljivi u vodi, dok su soli dvovalentnih kationa u njoj netopljive (Perinović Jozić, 2020.). Drugim riječima, alginati s monovalentnim kationima daju u vodi

topljive soli. dok u prisutnosti dvovalentnih (ili viševalentnih) kationa geliraju (Draget i sur., 2005.; Mišić, 2017.). NaAlg ima svojstva polielektrolita (Perinović Jozić, 2020.).

Alginati su linearni, nerazgranati polisaharidi čije građevne blokove čine dvije uronske kiseline povezane 1,4 glikozidnom vezom: β -D-manuronska kiselina (M) i njezin C-5 epimer α -L-guluronska kiselina (G). Građevni šećerni ostaci organizirani su u homopolimerne poli(β -D-manusiluronat) i poli(α -L-gulosiluronat) i heteropolimerne blokove (Draget i sur., 2005.; Mišić, 2017.). Ovisno o duljini, udjelu i raspodjeli ovih građevnih jedinica, razlikuju se fizička svojstva alginata. MM i MG građevni blokovi pridonose fleksibilnosti polisaharidnog lanca i to redom GG<MM<MG, dok se porastom udjela G blokova povećava sposobnost geliranja te čvrstoća samog gela (Murillo-Álvarez i Hernández-Carmona, 2007.; Mišić, 2017.). Viskoznost otopine najvećim je dijelom ovisna o duljini polimernog lanca, dok su imunogeničnost, gelirajuća svojstva i sposobnost vezivanja vode ovisni o udjelu α -L-guluronske kiseline (Ertesvåg i Valla, 1998.; Mišić, 2017.). Alginati s visokim sadržajem guluronske kiseline razvijaju čvršće, poroznije gelove koji su postojani, dok alginati bogati ostacima manuronske kiseline razvijaju mekše, manje porozne gelove koji se s vremenom raspadaju (Racovita i sur., 2009.; Bedek, 2018.).

U slučaju čestica pripremljenih od čistog natrijevog alginata, formiranje zrna se događa zbog ionotropnog geliranja sfernih kapi pomoću Mn^{2+} . Poliguluronatne jedinice u molekulama alginata tvore keliranu strukturu s metalnim ionima, nazvanu model „kutija za jaja“ („*eggbox*“), koja sadrži međuprostore u kojima se kationi mogu pakirati i koordinirati (Park i sur., 1993.; Racovita i sur., 2009.). Spoj između ovako formiranih lanaca kinetički je stabilan prema disocijaciji, dok polimanuronatne jedinice pokazuju normalne polielektrolitne karakteristike vezivanja kationa (Dambies i sur., 2001.; Racovita i sur., 2009.). Stoga, takve interakcije rezultiraju stvaranjem sfernih zrnaca, odnosno okruglih mikročestica (Racovita i sur., 2009.). Također, alginatne mikročestice mogu se dodatno omotati polukationskim polimerom, pošto elektrostatskim interakcijama između karboksilnih skupina alginata i polikationskog polimera dodatno zatvara jezgra, čime se poboljšava zadržavanje ili potencijalno oslobađanje aktivne tvari (Fujiwara i sur., 2013.; Bedek, 2018.).

2.3. Eksperimentalni biljni patogeni

2.3.1. Botrytis cinerea

Gljiva *Botrytis cinerea* jedan je od najčešćih i najpoznatijih biljnih patogena uopće. Parazitira na velikom broju biljaka domaćina. Bolest koju uzrokuje obično se naziva „siva plijesan“. Osobito štetnom smatra se na vinovoj lozi, jagodi, malini i kupini, rajčici, salati i brojnim cvjećarskim kulturama. *Botrytis cinerea* može zaraziti različite biljne organe, no najčešće napada zrele plodove. Izvrsno je prilagođena i saprofitskom i parazitskom načinu života.

Simptomi bolesti koje uzrokuje ovise o biljnoj vrsti i fazi bolesti. Gljiva može uzrokovati palež cvjetova, kod drugih može uzrokovati trulež stabljike, a najčešće uzrokuje trulež plodova. Karakterističan znak bolesti je pojava sivog, smeđeg ili sivo-smeđeg „maška“, nakupina micelija i spora koji se redovito javlja u uvjetima povišene vlažnosti zraka (Ivić i sur., 2019.). Siva plijesan je jedna od najštetnijih bolesti vinove loze u kontinentalnom dijelu Hrvatske i jadranskom dijelu Hrvatske (Maceljki i sur., 2006.; Bulović, 2019.). Za razvoj ove bolesti potrebna je visoka relativna vlažnost zraka i temperatura između 2 °C i 35 °C (optimum 20 do 25 °C). Također, na razvoj bolesti utječu svjetlost, kiselost sredine i starost konidija (Vranješ, 2017.).

Botrytis cinerea je svrstana u pododjel *Ascomycota*, razred *Discomycetes* te porodicu *Sclerotiniaceae* (Ainsworth, 1971.; Vranješ, 2017.). Naime, u epidemiologiji sive plijesni postoji spolni stadij (*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) u kojem se formiraju sklerociji, rijetko se pronalazi u prirodi i od manjeg je značaja od nespolnog stadija (*Botrytis cinerea* Pers.) u kojem patogen stvara konidiofore s konidijama (Jurković i sur., 2010.) Sklerociji se razvijaju unutar umirućih tkiva domaćina i predstavljaju važan mehanizam preživljavanja gljive, različitih su veličina i nisu lako vidljivi na svim zaraženim kulturama (Backhouse i Willets, 1984.; Bulović, 2019.). Najčešći put infekcije biljaka ovim patogenom je putem konidija (Doehlemann i sur., 2016.).



Slika 2.3.1.1. Siva plijesan vinove loze (*Botrytis cinerea*)

Izvor: Chromos Agro. Siva plijesan vinove loze (*Botrytis cinerea*).

<https://www.chromos-agro.hr/siva-plijesan-vinove-loze-botrytis-cinerea/> - pristup 1.7.2022.

Kao i u slučaju svih biljnih bolesti, suzbijanje sive plijesni najuspješnije je ako se provodi prema načelima integrirane zaštite bilja. Kao i većina biljnih patogena, gljiva *B. cinerea* za svoj razvoj traži visoku vlažnost. Sve mjere kojima se smanjuje vlažnost zraka u usjevu ili nasadu doprinose slabijoj pojavi i razvoju sive plijesni. U slučajevima osjetljive kulture, kritične fenofaze i

povoljnih uvjeta za razvoj bolesti, često su nužne kemijske mjere kako bi se spriječile značajne štete od sive plijesni. Iako su razvijeni različiti modeli prognoze, suzbijanje sive plijesni još se uvijek temelji na preventivnom tretiranju ili više tretiranja u pravilnim razmacima tijekom osjetljive faze razvoja kulture. Za suzbijanje sive plijesni u Hrvatskoj odobren je veći broj sredstava s različitim aktivnim tvarima. Mehanizmi djelovanja tih aktivnih tvari su različiti, što omogućava učinkovitu strategije sprječavanja pojave i razvoja rezistentnosti. Među odobrenim sredstvima, nekoliko njih ima vrlo izraženo djelovanje na *B. cinerea* i katkada se nazivaju „botriticidima“. To su sredstva na osnovi aktivnih tvari fludioksonila, fenheksamida, pirimetanila, boskalida ili fluopirama (Ivić, 2022.).

U proteklih nekoliko godina odobreno je nekoliko bioloških sredstava za zaštitu od sive plijesni, razvijenih od strane velikih kompanija. Ta sredstva kao aktivnu tvar sadrže antagonističke gljive ili bakterije, kao što su *Trichoderma atroviridae*, *Bacillus amyloliquifaciens* i *Pythium oligandrum*. U uvjetima povoljnima za razvoj antagonista i manje povoljnima za razvoj sive plijesni, ta sredstva pokazuju visoku učinkovitost. Uspješno se koriste u ekološkoj proizvodnji (Ivić, 2022.). Sveukupni globalni trošak suzbijanja sive plijesni (mjere kultiviranja, botriticidi, fungicidi širokog spektra, biokontrola) prelazi milijardu eura godišnje (Dean i sur., 2012.).

2.3.2. *Cercospora beticola*

Cercospora beticola Sacc. pripada rodu *Cercospora*, porodici *Mycosphaerellaceae*, redu *Capnodiales*, razredu *Dothideomycetes* i koljenu *Ascomycota* (CABI, 2022.). Pjegavost lista (CLS), koju uzrokuje *Cercospora beticola*, ima široku geografsku rasprostranjenost koja se podudara s rasprostranjenošću njenog glavnog domaćina, šećerne repe (Bleiholder i Weltzien, 1972.; Rossi i sur., 1995.; Cioni i sur., 2014.). Također, *C. beticola* uzrokuje pojavu pjegavosti na listu cikle i špinata. Razvoj takve bolesti lista izaziva smanjenje lisne površine, a time i smanjen intenzitet fotosinteze, što dovodi do smanjenja prinosa i sadržaja ugljikohidrata (Stazić, 2017.).

C. beticola je porijeklom iz srednje Europe i s Mediterana (Groenwald i sur., 2005.; Ćosić i sur., 2015.) te je prva opisana vrsta iz roda *Cercospora*. Kod razvoja ove gljive poznat je samo anamorfni stadij koji čine micelij, strome, konidiofori i konidije. Kod usjeva šećerne repe konidije se prenose kišom, vjetrom i insektima. Zaraza je izrazito značajna u toplim i vlažnim krajevima tijekom kasnog proljeća, ljeta i rane jeseni. Konidije kliju u širokom temperaturnom rasponu, između 7 i 34 °C, a optimalna temperatura klijanja kreće se od 25 do 32 °C. Optimalna relativna vlažnost zraka je između 98% i 100%, a do zaraza u polju ne dolazi ako je noćna temperatura niža od 16 °C i relativna vlažnost zraka ispod 90% (Ćosić i sur., 2015.).

Cercospora beticola Sacc. je uzročnik pjegavosti lista šećerne repe (CLS) i drugih uzgajanih biljaka iz roda *Beta*. Domaćini su joj i divlje vrste iz rodova *Beta*, *Atriplex*, *Cycholoma*,

Chenopodium, *Polygonum* i *Amaranthus* (Ivanović i Ivanović, 2004.; Ćosić i sur., 2015.). Izvori zaraze obuhvaćaju zaražene ostatke lišća, lisnih peteljki i glava šećerne repe iz prethodne vegetacije, korove iz porodice *Chenopodiaceae* i sjeme (Ćosić i sur., 2015.).

Prvi simptomi CLS-a se vide na lišću šećerne repe i na peteljkama, a kod sjemenske repe znakovi zaraze se mogu vidjeti i na sjemenskoj stabljici. *C. beticola* napada starije i srednje staro lišće, no kod jake zaraze pjege se mogu uočiti i na najmlađim listovima. Tipične pjege su gotovo potpuno okruglog oblika, veličine između 2 i 5 mm. Sredina pjega je sive do svjetlo smeđe boje, a rub je crveno smeđe boje. U sredini pjega nastaju tamne stromatične nakupine na kojima se tijekom vlažnog vremena formira siva do pepeljasta prevlaka konidiofora i konidija. Tkivo unutar pjega može ispadati pa dolazi do pojave šupljikavosti lista. Ako nastane veliki broj pjega na listovima i dođe do akumulacije fitotoksina, nastupa sušenje i propadanje listova (Weiland i Koch, 2004.; Ćosić i sur., 2015.) koji se ne odvajaju od biljke zbog lisnih peteljki koje nikada u potpunosti ne propadnu. Pjege na peteljkama listova i sjemenskim stabljikama su izdužene, veličine do 1 cm i ne spajaju se (Ćosić i sur., 2015.). *C. beticola* je odgovorna za značajno smanjenje prinosa korijena šećerne repe, koncentracije saharoze i šećera, dok povećava koncentraciju nečistoća što dovodi do viših troškova prerade (Cioni i sur., 2014.).



Slika 2.3.2.1. Pjegavost lista šećerne repe (CLS)

Izvor: Chromos Agro. Pjegavost lišća šećerne repe (*Cercospora beticola*).

<https://www.chromos-agro.hr/pjegavost-lisca-secerne-repe-cercospora-beticola/> - pristup 15.07.2022.

Suzbijanje pjegavosti lista šećerne repe provodi se u sklopu integrirane zaštite koja uključuje rotaciju usjeva bez usjeva domaćina, obradu tla, sadnju otpornih kultivara i primjenu fungicida (Cioni i sur., 2014.). S obzirom da su zaraženi ostatci šećerne repe i ostalih domaćina najznačajniji izvor zaraze, njihovim uništavanjem prekida se životni ciklus parazita i smanjuje

količina primarnog inokuluma, što predstavlja jednu od najznačajnijih preventivnih mjera zaštite od ove bolesti. Zaoravanjem zaraženih biljnih ostataka ubrzava se njihova razgradnja pod utjecajem vlage i zemljišnih mikroorganizama (Ćosić i sur., 2015.).

Kako navode Cioni i sur. (2014.), u današnje vrijeme fungicidi su nezaobilazan alat za stratešku zaštitu usjeva šećerne repe od pjegavosti lista. Međutim, njihova se uporaba mora smatrati dijelom integriranog sustava upravljanja usjevima, koji optimizira kontrolu bolesti i s ekonomskog i s ekološkog gledišta. Zbog toga se rokovi i broj primjena fungicida, kao i djelatne tvari koje se primjenjuju, ne mogu generalizirati, već se određuju za svako područje uzgoja šećerne repe na temelju određenih čimbenika: vremena i opsega pojave bolesti, prisutnosti sojeva gljiva otpornih na fungicide, pojave drugih bolesti lišća (poput pepelnice ili hrđe), korištenja otpornih sorti, prisutnosti vremenskih uvjeta pogodnih za razvoj bolesti te na temelju duljine sezone usjeva kada su biljke podložne zarazi. Kemijska kontrola trebala bi se temeljiti na kombinaciji fungicida različitog mehanizma djelovanja, prvenstveno aktivnih sastojaka s triazolima ili benzimidazolima. Konvencionalni fungicidi, kao što su bakrene soli, klorotalonil i mankozeb, pomažu u upravljanju pojave rezistentnosti patogena na određene skupine fungicida. Također, ponovno uvođenje metil benzimidazol karbamata (MBC) u program zaštite, fungicida koji je ponovno pokazao izvrsne rezultate u polju protiv pjegavosti lista, moglo bi pomoći u tom smjeru.

Redovita primjena fungicida ključna je za kontrolu bolesti kako bi se smanjila stopa širenja CLS-a. Strobilurin kao fungicid je najpoznatiji za kontrolu bolesti CLS u ranoj sezoni što obuhvaća četiri primjene strobilurina po sezoni (Pethybridge i sur., 2019.; Pethybridge i sur., 2020.). Međutim, otpornost na strobilurin unutar populacije *C. beticola* (Abawi i sur., 2014.; Vaghefi i sur., 2016.; Pethybridge i sur., 2019.; Pethybridge i sur., 2020.) i smanjena osjetljivost na inhibitor demetilacije, propikonazol (Fungicide Resistance Action Committee 2018.; Pethybridge i sur., 2020.), naglašava potrebu za alternativnim načinima djelovanja i pridržavanjem najboljih praksi za upravljanje otpornošću na fungicide (Pethybridge i sur., 2019.; Pethybridge i sur., 2020.).

2.3.3. *Phytophthora ramorum*

Phytophthora vrste spadaju među najozbiljnije patogene u biljnoj proizvodnji, a njihov utjecaj može uzrokovati razorne ekološke i gospodarske učinke (Guenther i sur., 2001.; Davis i sur., 2014.; Rolando i sur., 2019.). Ovisno o domaćinu, simptomi variraju od pjegavosti lista, plamenjače, odumiranja grančica, raka te, u konačnici, do smrtnosti biljaka (Heungens i sur., 2006.)

Phytophthora ramorum je filamentna, diploidna protozoa poznata pod nazivom vodena plijesan. Jedna je od 117 priznatih vrsta *Phytophthora* (Everhart i sur., 2014.) koja spada u

carstvo *Chromista*, koljeno *Oomycota*, razred *Oomycetes*, red *Peronosporales* i porodicu *Peronosporaceae* (EPPO, 2020.). Ova pseudogljiva je najbliže povezana sa zlatno-smeđim algama i diatomejama (Everhart i sur., 2014.).

Osnovne morfološke karakteristike *P. ramorum* su sporangiji, hlamidospore i formiranje oospora (spolni stadij). Formiranje oospora događa se isključivo sparivanjem A1 i A2 sparivajuća tipa, budući da je *P. ramorum* heterotalična vrsta (nema samooplodnje). Gotovo su svi europski izolati A1 tipa, za razliku od američkih kod kojih je većina A2 tipa (Tomić i Vukadin 2011.).

U prirodi, životni ciklus *P. ramorum* uključuje samo aseksualnu fazu, iako je spolna faza teoretski moguća. Aseksualni sporangiji nastaju iz zaraženog lisnog tkiva i klijaju izravno, stvarajući klicinu cijev i apresorij za inficiranje tkiva domaćina, ili neizravno, oslobađanjem bičastih zoospora u prisutnosti slobodne vode kada napadaju novog domaćina i započinju novu infekciju. *P. ramorum* vrlo lako proizvodi hlamidospore debelih stijenki koje mogu poslužiti i kao primarni inokulum te omogućiti preživljavanje u nepovoljnim uvjetima, kao što je suša. Kada se vrate povoljni uvjeti, hlamidospore će klijati izravno kako bi zarazile domaćina ili proizvele sporangije. *P. ramorum* se razlikuje od ostalih *Phytophthora* vrsta po formiranju izrazito velikih hlamidospora (Werres i sur., 2001.; Everhart i sur., 2014.). Kod inokulacije grančica rododendrona s *P. ramorum* uočeno je da su se prvi simptomi (promjena boje grančica) pojavili tri do sedam dana nakon inokulacije (Werres i sur., 2001.; EPPO, 2020.). Drugi način širenja ove pseudogljive može se odvijati unutar tla ili medija za uzgoj, što dovodi do infekcije korijena koja je praćena kolonizacijom vaskularnih tkiva i širenjem u stabljiku (Parke i Lewis, 2007.; Grünwald i sur., 2008.; EPPO, 2020.).

Do sada je poznato da se *P. ramorum* pojavljuje u Europi, Sjevernoj Americi i dijelovima Azije (EPPO, 2020.). Gljiva je prvi put otkrivena 1990-ih u Sjevernoj Americi i Europi (Werres i sur., 2001.; Rizzo i sur., 2002.; EPPO, 2020.). Naime, 1993. god. pronađena je nova vrsta *Phytophthora* odgovorne za agresivnu plamenjaču na grančicama i listovima rododendrona te plamenjaču viburnuma u njemačkim i nizozemskim rasadnicima (Werres i Marwitz, 1997.; Werres i sur., 2001.; Heungens i sur., 2006.). Počevši od 1995. god., u Kaliforniji i u jednom dijelu Oregona dogodila se velika smrtnost autohtonih vrsta hrasta, kao što su tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) i obalni hrast (*Quercus agrifolia*), uzrokovanih bolešću zvanom iznenadna smrt hrasta (SOD – *Sudden Oak Death*) (Goheen i sur., 2002.; Rizzo i sur., 2002.; Heungens i sur., 2006.). Utvrđeno je da je ova nova vrsta *Phytophthora* odgovorne za bolesti na europskim ukrasnim biljkama odgovorna i za SOD. Od tada je označena kao *Phytophthora ramorum* (Werres i sur., 2001.; Heungens i sur., 2006.).

Iznenadna smrt hrasta (uključujući iznenadnu smrt ariša) karakterizirana je smrtonosnim ranama. Na deblu oboljelih stabala pojavljuju se rak rane ili mrlje, uglavnom u donjem dijelu,

ali u nekim slučajevima i do visine od 20 m. Začepljenje žila uzrokovano *P. ramorum* često rezultira venućem lišća ili iglica (bez preranog opadanja lišća ili bacanja iglica) i na kraju smrtnosti stabla (Hansen i sur., 2002.; EPPO 2006.; Parke i sur., 2007; Webber i sur., 2010.; EPPO, 2020.).

U SAD-u identificirano je više od 30 prirodnih domaćina *P. ramorum*, koji se uglavnom nalaze u prirodnim okruženjima (APHIS, 2004.; Heungens i sur., 2006.). Međutim, u Europi je patogen pronađen gotovo isključivo u rasadnicima i vrtnim centrima (EPPO, 2005.; Heungens i sur., 2006.). Određen broj nalaza zabilježen je na stablima u Engleskoj i Nizozemskoj, ali svaki put je pronađen u blizini zaraženih biljaka rododendrona (DEFRA, 2003.a; DEFRA 2003.b; PD Nederland, 2003.; Heungens i sur., 2006.).

Otkrivanje *P. ramorum* u sve većem broju europskih zemalja i potencijalna opasnost od širenja iz rasadnika među prirodne populacije hrasta i bukve potaknuli su Europsku Uniju (EU) na uvođenje hitnih fitosanitarnih mjera (smjernice 2002/757/EU i 2004/426/EU). Ove mjere uključuju preglede svih rasadnika u kojima se uzgajaju rododendron, viburnum ili kamelija (Heungens i sur., 2006.).

Najvažniji domaćin *P. ramorum* u Europi je rododendron. Utjecaj mjera EU-a na industriju flamanskih rododendrona je značajan jer je Flandrija (sjeverni dio Belgije) jedno od najvećih područja za proizvodnju rododendrona u Europi. U sklopu hitnih fitosanitarnih mjera EU (2002/757/EU i 2004/426/EU) svi komercijalni prostori za uzgoj rododendrona ispitani su na *P. ramorum*. Otkrivanje ove pseudogljive dovodi do mjera karantene, uključujući uništavanje biljaka, što može dovesti do znatne financijske štete za uključene tvrtke. Uzgajivači poduzimaju sve moguće mjere kako bi izbjegli *P. ramorum*, uključujući preventivne tretmane fungicidima (Heungens i sur., 2006.).

P. ramorum i druge *Phytophthora* vrste na grmovima rododendrona uzrokuju nekrozu (posmeđenje), odumiranje izboja te pojavu smeđih pjega na listu. Ova pseudogljiva najčešće zarazi vrh lista, gdje se najduže zadržava voda, a zatim se širi uz središnju nervaturu lista do petljke te kroz nju prodire u izboj. Također, zaraza može kretati od izboja prema vrhu lista. Bolest se brzo širi i izaziva sušenje dijela stabljika na grmu rododendrona, međutim može doći i do potpunog sušenja biljke. Identifikacija ovog patogena na osnovi simptoma je nemoguća zbog identičnih simptoma na listovima i izbojima koje uzrokuju određene fitopatogene gljive, poput *Phomopsis* spp., *Pestalotiopsis* spp. i dr. (Tomić i sur., 2010.; Tomić i Vukadin 2011.).



Slika 2.3.3.1. Jedinstveni kultivar rododendrona, uzgojen u rasadniku, s nekrotičnim pjegama duž rubova lišća uzrokovan napadom *P. ramorum*. Fotografirala Jennifer Parke, 2003.

Izvor: Pacific Northwest Pest Management Handbooks. Rhododendron-Ramorum Leaf Blight and Shoot Dieback. Plant Disease. Host and Disease Descriptions.

<https://pnwhandbooks.org/plantdisease/host-disease/rhododendron-ramorum-leaf-blight-shoot-dieback> - pristup 18.8.2022.

Kod *Camelia* i *Viburnum* vrsta (najčešćih domaćina u Europi nakon rododendrona) simptomi su slični. Kod kamelije se šteta od napada svodi na defolijaciju, dok se kod *Viburnum* spp. često zaraza ostvari na korijenovom vratu što izaziva potpuno sušenje stabljike. Karakteristični simptomi za stabla, poput hrasta i bukve, mogu se uočiti na deblu. Micelij *P. ramorum* prodire u unutarnju koru i kambij gdje se brzo širi. Na površini debla su vidljive tamne, vlažne mrlje – tekline, a u unutarnjoj kori i u kambiju se razvijaju smeđe nekroze tkiva. Kad micelij poraste, a nekroza tkiva (canker) zaokruži deblo, dolazi do naglog sušenja stabla (Tomić i Vukadin 2011.).

Sprječavanje unošenja *P. ramorum* i njezinog širenja unutar EU cilj je aktualnih europskih fitosanitarnih mjera. Prevencija širenja putem zaraženih biljaka djelomično se postiže sustavom izdavanja biljnih putovnica koji uključuje preglede, iskorjenjivanje zaraženih biljaka u radijusu od 2 m i mjere karantene za preostale biljke u radijusu od 10 m. Potencijalna prijetnja od *P. ramorum* i utjecaj karantenskih mjera naveli su uzgajivače da poduzmu i preventivne inicijative. Nastoje spriječiti unošenje i širenje unutar svog rasadnika sanitacijom, smanjenjem uvjeta pogodnih za bolesti, kao što su ranjavanje i uvjeti visoke vlažnosti, izbjegavanjem ili zaštitom osjetljivih sorti te preventivnom primjenom fungicida. Prema fitosanitarnim mjerama EU-a nije dopuštena primjena kurativnih fungicida ili aplikacija u karantenskoj zoni od 10 metara. Podaci potvrđuju da je eradikacija kurativnom primjenom fungicida iznimno teška u optimalnim uvjetima za razvoj patogena. Međutim, preventivna

uporaba odabranih fungicida je vrlo učinkovita te se može potaknuti kao zaštitna mjera (Heungens i sur., 2006.).

Phytophthora patogeni nisu prave gljive, no o osjetljivosti *Phytophthora* vrsta na bakrene fungicide postoji više izvještaja. Bakar je korišten u suzbijanju mnogih bolesti koje su povezane s *Phytophthora* vrstama, s primarnim uspjehom u kontroli folijarne zaraze. Također, nekoliko istraživanja dokazalo je da bakar inhibira rast micelija roda *Phytophthora* kod uzgoja *in vitro*. Dokazano je da ioni bakra koncentracije 10^{-7} M djeluju inhibirajuće na proizvodnju sporangija kod *Phytophthora* i zoospora (Coelho i sur., 2005.; Rolando i sur., 2019.).

3. Materijali i metode istraživanja

3.1. Priprema otopina (natrijev alginat, bakrov(II) sulfat)

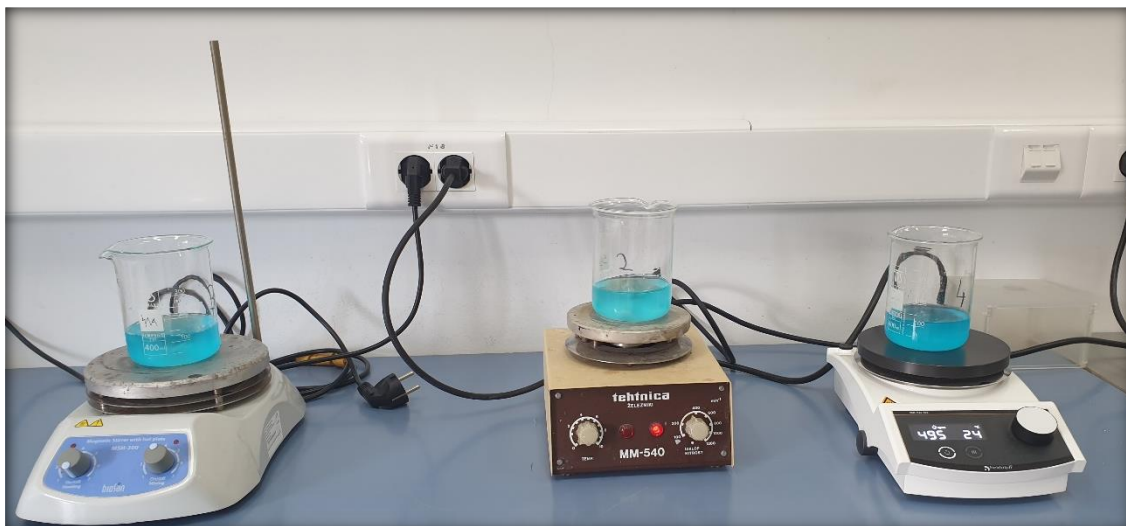
U istraživanju je korišten natrijev alginat niske viskoznosti (CAS broj: 9005-38-3; Sigma Aldrich SAD). Bakrov(II) sulfat pentahidrat p.a. (CAS broj: 7758-99-8) u pakiranju od 1000 grama proizveden je u tvrtki Gram-Mol d.o.o. sa sjedištem u Zagrebu.

Prvi korak istraživanja podrazumijevao je pripremu otopine 1,5%-tnog natrijevog alginata jedan dan prije izrade mikročestica bakrovog alginata. Otopina je pripravljena otapanjem 9 g natrijevog alginata u 591 ml vode uz miješanje na miješalici (MSH-300, Biosan, Latvija) pomoću magneta obloženim plastikom (mješača). Pri miješanju temperatura je iznosila 40 °C, a broj okretaja magneta iznosio je 800 u minuti.

2%-tne, 3%-tne i 4%-tne otopine bakrovog(II) sulfata su pripravljene otapanjem 2, 3 i 4 g bakrovog(II) sulfat pentahidrata (modra galica) $[\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}]$ u 100 ml destilirane vode. Pripravljena otopina natrijevog alginata je filtrirana tri puta pomoću vakuumske pumpe (Rocker 300, Tajvan) korištenjem filter papira i Büchnerovog lijevka.



Slika 3.1.1. Filtracija pomoću vakuumske pumpe i Büchner lijevka



Slika 3.1.2. Miješanje otopina modre galice

3.2. Priprava mikročestica bakrovog alginata (2%, 3% i 4%)

Nakon postupka filtracije slijedio je proces inkapsulacije postupkom ionskog geliranja kojim su pripravljene mikrosfere, odnosno mikročestice bakrovog alginata (ALG/Cu) pri sobnoj temperaturi. U svaku laboratorijsku čašicu, koja je sadržavala po 100 ml 2%-tne, 3%-tne i 4%-tne otopine bakrovog(II) sulfata, dokapavalo se po 100 ml 1,5%-tnog natrijevog alginata inkapsulatorom Büchi – Encapsulator B-390 (BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska). Otopina natrijevog alginata propuštala se kroz diznu veličine 80 μm pri frekvenciji vibracija (f) od 2000 Hz i tlaku (p) od 555 mbar-a (Encapsulator Büchi-B390, BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska). Također, ista otopina propuštala se kroz diznu veličine 120 μm pri frekvenciji od 1200 Hz i tlaku od 276 mbar-a. Tijekom postupka inkapsulacije, mikročestice u nastajanju su se istovremeno miješale na magnetnoj miješalici (IKA topolino, SAD).

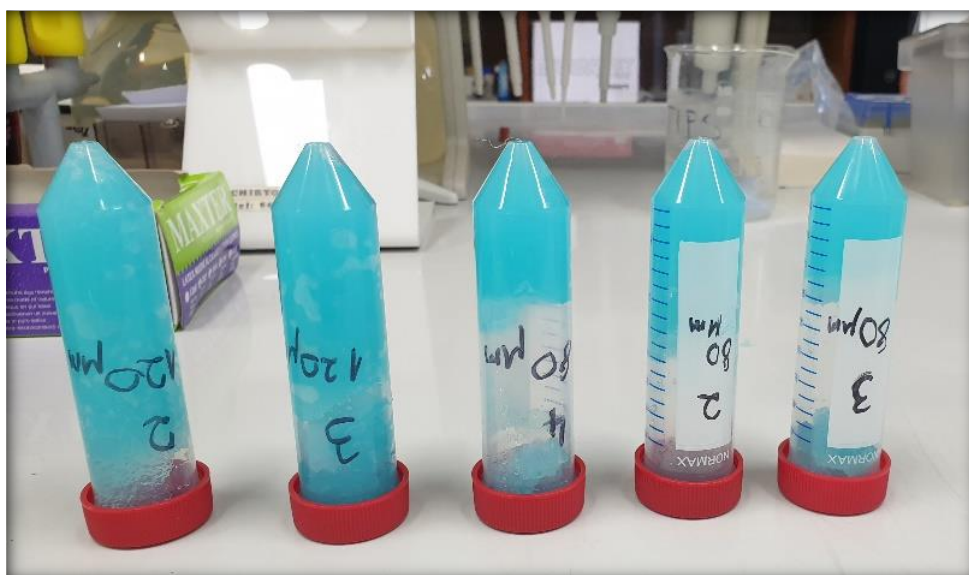


Slika 3.2.1. Inkapsulacija

Nakon izrade, mikročestice bakrovog alginata su se miješale na magnetnim miješalicama (MSH-300, Biosan; MM-540, Tehnica, Železniki, Slovenija; Hei-Tec, Heidolph, Njemačka) oko 30 min kako bi dodatno očvrstnule. Potom su se filtrirale kroz jednoslojni muslin i ispirale 3x s destiliranom vodom kako bi se isprao suvišak bakrovog(II) sulfata te su se pohranile u Falcon tubice od 50 ml.



Slika 3.2.2. Odvajanje mikročestica bakrovog alginata od tekuće faze



3.2.3. Falcon tubice ispunjenje mikročesticama bakrovog alginata različitih koncentracija i veličina

3.3. Priprava hranjivih podloga i patogena

Preduvjet za izolaciju patogena je priprema odgovarajuće hranjive podloge. U ovom istraživanju korištene su dvije hranjive podloge: PDA (krumpir-dekstrozni agar) i CPA (podloga od mrkve).

Potato dextrose agar (PDA) – krumpir dekstrozni agar

- 42 g PDA firme Liofilchem
- 1000 ml destilirane vode

U staklenu bocu od litre ulivena je hladna destilirana voda i dodan je PDA. U svrhu homogenizacije u bocu je stavljen magnetič za miješanje. Sve je zagrijano do vrenja i autoklavirano na 121 °C 15 minuta.

Carrot piece agar (CPA) – podloga od mrkve

- 50 g sitno narezane mrkve
- 22 g agara firme Sigma Aldrich
- 1000 ml destilirane vode

U staklenu bocu od litre ulivena je hladna destilirana voda i dodani su agar i mrkva. U svrhu homogenizacije u bocu je stavljen magnetič za miješanje. Sve je zagrijano do vrenja i autoklavirano na 121 °C 15 minuta.

Ohlađene podloge su izlivena u laminaru u plastične, sterilne petrijeve zdjelice bez oduška, promjera 90 ili 60 mm. Pripremljene podloge su pohranjene u laboratorijskom hladnjaku.

Za pripremu kultura fitopatogenih organizama korišteni su izolati iz mikološke zbirke Laboratorija za mikologiju, Centra za zaštitu bilja: BC/7/19 (*B. cinerea*), CB/16/19 (*C. beticola*) i PR/1/18 (*P. ramorum*). Iz svakog izolata, sterilnim skalpelom izrezan je pravokutni isječak micelija gljive i prebačen na sredinu pripremljene hranjive podloge. Izolati *Botrytis cinerea* i *Cercospora beticola* precijepljeni su na PDA podlogu, dok je izolat *Phytophthora ramorum* precijepljen na mrkvin agar. Petrijeve zdjelice s *B. cinerea* i *C. beticola* odložene su u komoru rasta na 20 °C. Petrijeve zdjelice s *P. ramorum* odložene su u drugu komoru rasta na temperaturu od 15 °C. Nakon sedam do deset dana izolati su bili spremni za pokus.

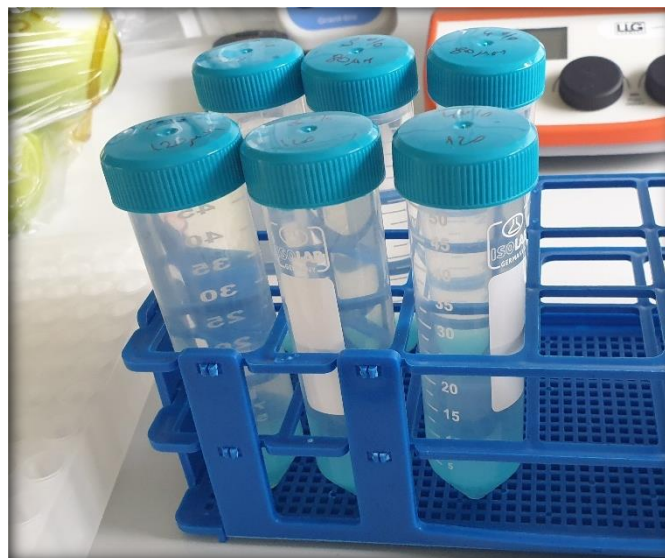
Obzirom da je *Phytophthora ramorum* regulirani karantenski štetni organizam, nakon završetka pokusa sav se biljni i potrošni materijal autoklavirao i odložio u posebni otpad kako ne bi došlo do širenja zaraze u prirodni okoliš.

3.4. Primjena mikročestica bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) na fitopatogene gljive

3.4.1. Utjecaj na klijanje konidija *Botrytis cinerea*

Pripravljene su smjese mikročestica bakrovog alginata, veličina 80 i 120 μm u koncentracijama 2%, 3% i 4%, i vode.

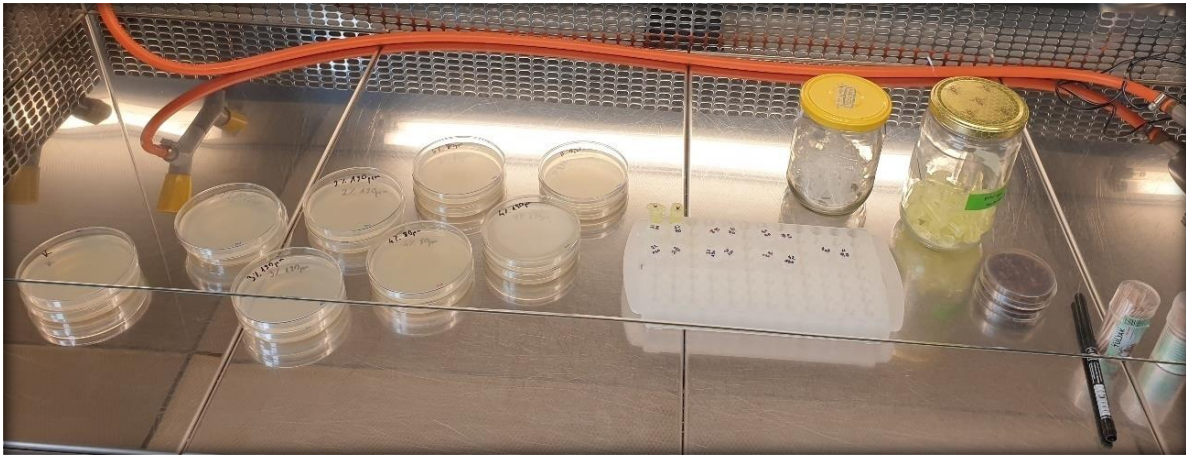
Po 1 ml smjese mikročestica bakrovog alginata i vode otpipetiran je u Eppendorf tubicu od 2 ml. Na svaku tubicu označena je veličina mikročestica i koncentracija. Svaka koncentracija i veličina mikročestica bakrovog alginata pripravljene su u tri ponavljanja. U pokus je bio uključen i standardni fungicid Neoram u koncentraciji od 0,5% kao i kontrola.



Slika 3.4.1.1. Smjese mikročestica bakrovog alginata i vode

Sa sporulirajućih kolonija izolata *B. cinerea* konidije su ostrugane sterilnom čačalicom te su prenesene u pripremljene i označene Eppendorf tubice s bakrovim alginatom. Isto je učinjeno i s tubicama koje su sadržavale samo sterilnu vodu te su korištene kao kontrola, kao i s tubicama s Neoramom. Po 1 ml pripremljene suspenzije ravnomjerno je izliven na čisti krumpir dekstrozni agar (PDA). Petrijeve zdjelice postavljene su u komoru rasta na inkubaciju pri 20 °C i 60% relativne vlage. Klijanje i izduživanje klične cijevi očitavalo se svjetlosnim mikroskopom Olympus BX53 18 h nakon inkubacije. Za svaku koncentraciju i veličinu mikročestica bakrovog

alginata, Neoram i kontrolu provedeno je po 30 mjerenja kličnih cijevi. Mjerenja su provedena pomoću programa CellSens Dimension, Olympus.



Slika 3.4.1.2. Potreban materijal i pribor za provedbu pokusa

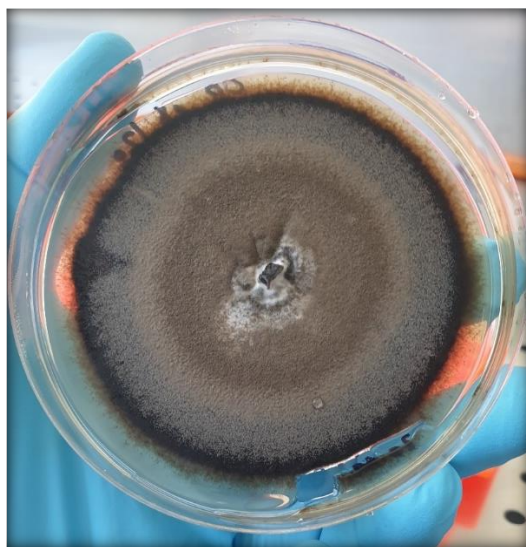


Slika 3.4.1.3. Struganje konidija sterilnom čačalicom

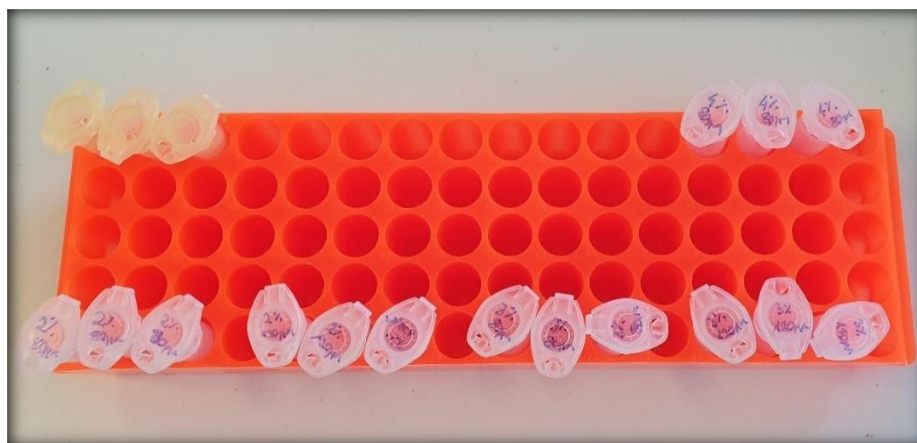
Analizom varijance usporedile su se prosječne vrijednosti duljina kličnih cijevi između kontrole, standardnog pripravka Neorama (0,5%-tni) i određenih koncentracija mikročestica bakrovog alginata. Za provedbu ANOVA-e koristio se program Microsoft Excel.

3.4.2. Utjecaj na rast *Cercospora beticola*

Suspenzija konidija fitopatogene gljive *C. beticola* pripravljena je na način kako je opisano kod *B. cinerea*. U ovom pokusu nisu korištene 4%-tne mikročestice bakrovog alginata veličine 120 μm .



Slika 3.4.2.1. *Cercospora beticola*



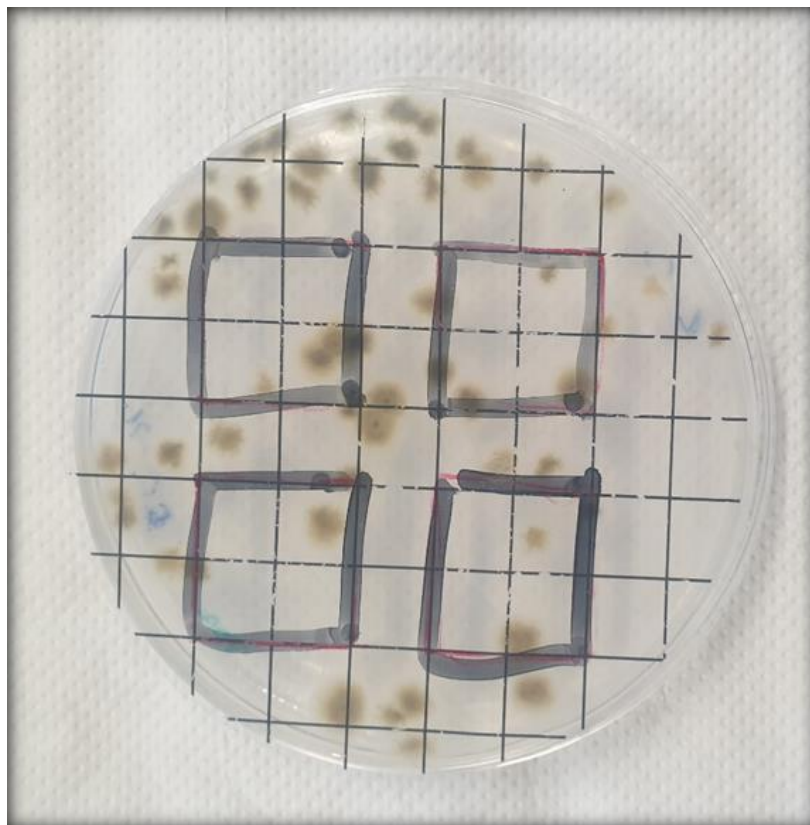
Slika 3.4.2.2. Eppendorf tubice suspenzija konidija, sterilne vode i ispitivanih koncentracija (2%, 3% i 4%) mikročestica bakrovog alginata

Broj razvijenih kolonija očitao se pomoću milimetarske mrežice podijeljene u 4 kvadrata nakon 7 dana inkubacije pri 28 °C i 80% relativne vlage (Slika 3.4.2.3. i Slika 3.4.2.4.). Relativni postotak razvijenih kolonija izračunao se na temelju odnosa između broja kolonija na kontroli i broja kolonija na mikročesticama bakrovog alginata. Na temelju rasta kolonija na različitim

koncentracijama mikročestica bakrovog alginata izračunala se EC_{50} vrijednost za svaku koncentraciju određene veličine mikročestica u programu Microsoft Excel.



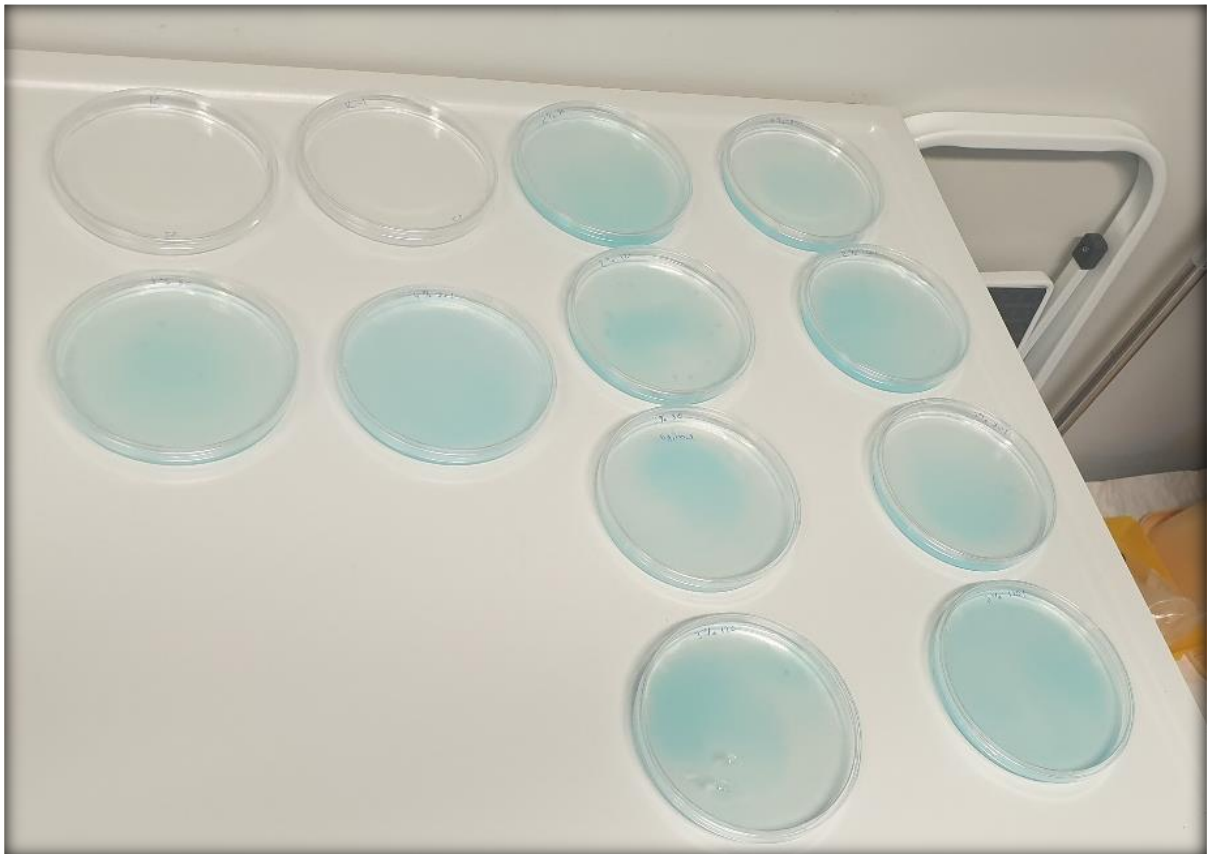
Slika 3.4.2.3. Inkubacija pri 28 °C i 80% relativne vlage



Slika 3.4.2.4. Očitavanje broja razvijenih kolonija pomoću milimetarske mrežice

3.4.3. Utjecaj na zarazu listova *Rhododendron* sp. pseudogljivom *Phytophthora ramorum*

Po 10 g mikročestica bakrovog alginata koncentracije 2% i 3% i veličine od 80 i 120 μm postavljeno je u Petrijeve zdjelice promjera 120 mm. Koncentracija bakrovog alginata od 4% postavljena je samo za veličinu čestica od 80 μm . U svaku Petrijevu zdjelicu dodano je 100 ml izvorske vode, dva isječka micelija *P. ramorum* s mrkvinog agara i po dva lista *Rhododendron* sp. Petrijeve zdjelice koje su predstavljale kontrolu sadržavale su po 100 ml izvorske vode, dva isječka micelija *P. ramorum* s mrkvinog agara i po dva lista *Rhododendron* sp. Pokus je postavljen 05.05.2021. u dvije repeticije na sobnoj temperaturi. Vizualna opažanja i rezultati očitani su 17.05.2021. Mikroskopom Olympus BX53 pregledani su listovi rododendrona u vodi u cilju potvrde prisustva sporangija i zoospora.



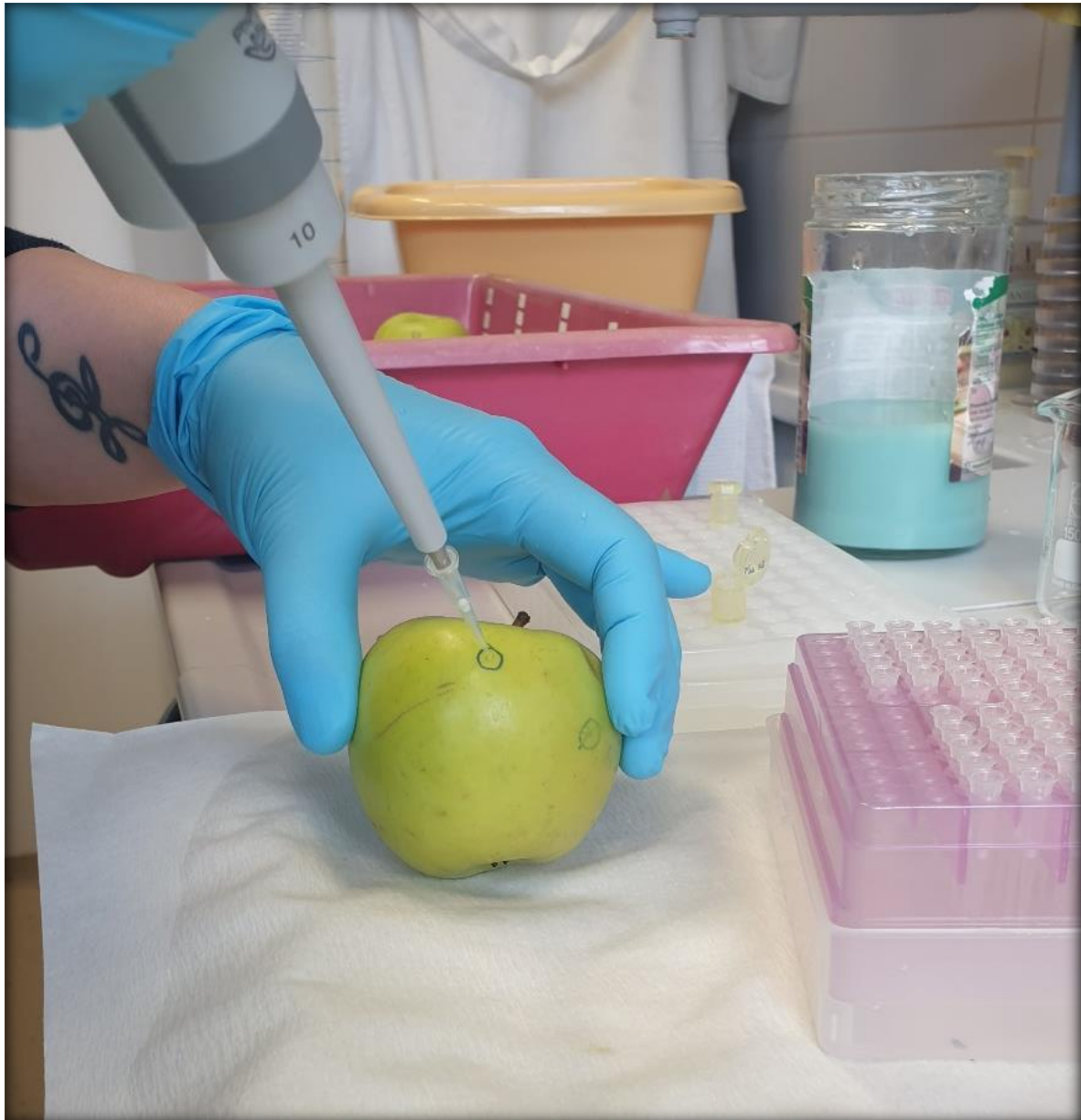
Slika 3.4.3.1. Petrijeve zdjelice koje predstavljaju kontrolu i različite veličine mikročestica bakrovog alginata različitih koncentracija



Slika 3.4.3.2. Postavljen pokus mikročestica bakrovog alginata (80 μm , 4% bakra) s 2 isječka *P. ramorum* s mrkvinog agara i 2 lista rododendrona

3.5. Biotest na plodovima jabuke

Plodovi jabuke sorte Granny Smith isprane su vodom i alkoholom te su osušene. Za svaku koncentraciju, standardni pripravak Neoram (0,25%-tni i 0,5%-tni) i kontrolu korištena su po 2 ploda jabuke. Prije zaraze jabuke su umočene dvije minute u pripremljene koncentracije i standardni pripravak te ostavljene da se osuše. Za to vrijeme pripravljena je suspenzija spora patogena *Botrytis cinerea*. Četiri Eppendorf tubice od 2 ml ispunjene su sterilnom vodom. Sterilnom čačalicom ostrugane su konidije patogena i prenesene u Eppendorf tubice. Po 2 μl suspenzije pipetom se nanijelo na 3 mjesta po plodu jabuke.



Slika 3.5.1. Provođenje zaraze na plodu jabuke s pripremljenom suspenzijom spora

Plodovi jabuke postavljeni su 4 – 5 dana u komoru rasta na 20 °C pri 60 % vlage te su očitani rezultati mjerenjem promjera pjega na jabukama.

Postavila su se dva pokusa s različitim veličinama mikročestica bakrovog alginata. U prvom pokusu (12.05.2021.) su se pripremile mikročestice bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) veličine 80 μm , dok su u drugom pokusu (24.05.2021.) bile primjenjene mikročestice bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) veličine 120 μm .



Slika 3.5.2. Postavljen prvi pokus



Slika 3.5.3. Postavljen drugi pokus

4. Rezultati

4.1. Utjecaj primjene mikročestica bakrovog alginata na klijanje *Botrytis cinerea*

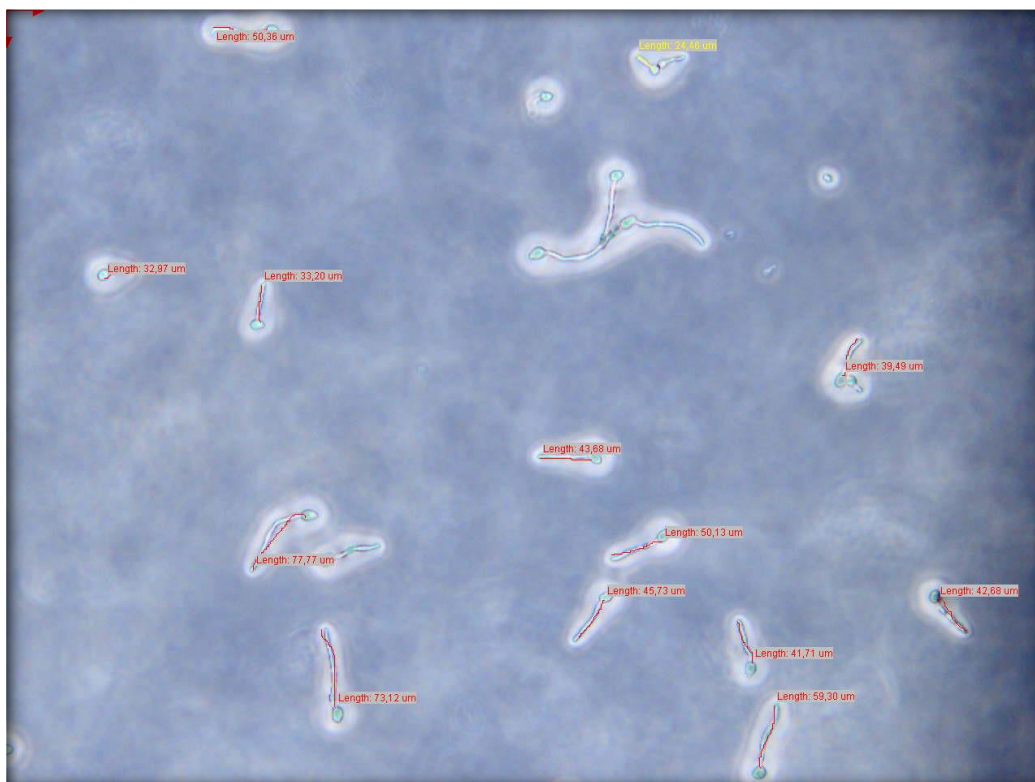
U tablici 4.1.1. prikazani su rezultati mjerenja dužine klične cijevi konidija *Botrytis cinerea*. Ukupno je izmjereno 240 kličnih cijevi. Niti jedan od ispitivanih pripravaka nije spriječio ili usporio klijanje konidija *Botrytis cinerea*.

Analizom varijance (ANOVA), izračunatom u programu Microsoft Excel, usporedile su se prosječne vrijednosti duljina kličnih cijevi između kontrole, standardnog pripravka Neorama (0,5%-tnog) i određenih koncentracija. Nije bilo statistički opravdane razlike u duljini kličnih cijevi između kontrole i ispitivanih pripravaka.

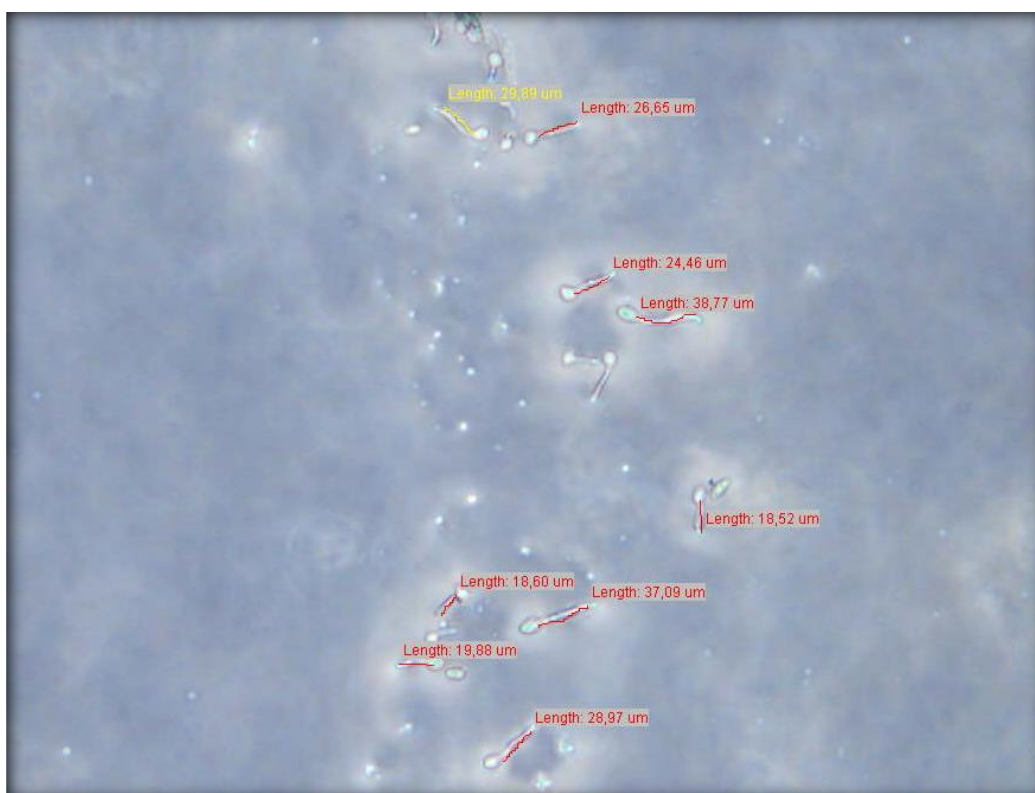
Tablica 4.1.1. *B. cinerea* – duljina kličnih cijevi – podaci potrebni za analizu varijance (ANOVA); Microsoft Excel

Redni broj	Kontrola (K)	2% 80µm (a)	2% 120µm (b)	3% 80µm (c)	3% 120µm (d)	4% 80µm (e)	4% 120µm (f)	Neoram 0,5% (g)	Ukupna suma
1	32,70	54,38	16,32	60,16	54,55	35,13	41,21	40,81	
2	56,20	62,74	13,64	75,36	24,39	68,35	24,96	39,78	
3	27,36	84,19	40,99	33,01	64,84	24,05	30,29	76,43	
4	35,85	85,43	18,81	55,22	25,84	17,37	8,25	6,80	
5	27,61	35,65	3,40	49,39	33,66	49,41	55,42	53,57	
6	42,81	17,00	54,56	64,95	21,08	52,77	9,89	27,31	
7	16,88	47,06	19,78	82,69	26,33	8,09	8,16	45,10	
8	38,99	6,00	30,33	20,68	51,07	44,26	17,88	26,62	
9	31,15	26,89	19,72	76,57	30,92	8,36	23,80	23,94	
10	66,73	56,91	8,88	55,70	32,33	45,41	14,49	26,81	
11	54,25	72,79	11,37	78,27	55,29	25,57	52,46	31,25	
12	15,04	55,26	38,08	93,18	33,26	13,60	16,25	21,17	
13	33,01	45,90	38,15	18,13	67,43	31,94	6,00	42,59	
14	77,46	39,70	32,68	73,05	46,33	20,29	25,86	19,49	
15	16,88	36,55	24,70	96,87	15,12	71,55	22,37	45,90	
16	50,36	44,57	11,44	80,72	35,85	14,32	15,73	59,02	
17	24,46	40,57	82,32	99,72	50,10	32,70	10,20	16,93	
18	32,97	29,97	63,17	76,83	46,83	13,76	18,54	23,41	
19	33,20	37,06	48,29	75,07	31,79	44,52	23,65	50,34	
20	39,49	39,46	108,87	76,30	4,96	11,56	16,29	26,72	
21	43,68	27,88	48,03	51,65	66,35	51,09	9,40	16,88	
22	77,77	57,28	36,13	57,59	37,77	16,89	29,89	52,15	
23	73,12	17,88	19,52	51,62	20,44	10,92	26,65	38,75	
24	50,13	64,45	22,18	7,48	19,24	18,92	24,46	37,10	
25	45,73	7,25	31,25	9,61	42,06	29,61	38,77	30,22	
26	41,71	8,84	55,40	42,22	62,78	20,85	18,52	31,47	
27	59,30	10,88	11,44	13,73	41,11	12,92	18,60	19,69	
28	42,68	45,52	21,34	11,44	79,34	7,48	37,09	38,73	
29	91,29	45,21	42,08	50,56	44,75	45,14	19,88	29,34	
30	61,76	51,97	48,30	73,31	21,40	19,65	28,97	44,36	
suma	1340,57	1255,24	1021,17	1711,08	1187,21	866,48	693,93	1042,68	9118,36
n	30	30	30	30	30	30	30	30	240
prosjeak	44,69	41,84	34,04	57,04	39,57	28,88	23,13	34,76	38,46

n – veličina uzorka



Slika 4.1.1. Kontrola – duljina kličinih cijevi; povećanje mikroskopa – 20x



Slika 4.1.2. Mikročestice (4%-Cu²⁺) veličine 120 µm – duljina kličinih cijevi; povećanje mikroskopa – 20x

Nulta hipoteza u ovoj analizi varijance glasi: $H_0 : \mu_k = \mu_a = \mu_b = \mu_c = \mu_d = \mu_e = \mu_f = \mu_g$. Ukoliko je H_0 točna, tada varijabilnost između uzoraka nije veća od varijabilnosti unutar uzoraka.

U sljedećem koraku analize varijance provedena je raščlamba varijabilnosti, odnosno procjena varijabilnosti (sume kvadrata - SS):

$$SS_{\text{UKUPNO}} = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$$

$$(\sum x)^2/n = \text{C.F.}$$

$$SS_{\text{IZMEĐU UZORAKA}} = (\sum x_1)^2/n_1 + (\sum x_2)^2/n_2 + \dots + (\sum x_k)^2/n_k - \text{C.F.}$$

$$SS_{\text{UNUTAR UZORAKA}} = SS_{\text{UKUPNO}} - SS_{\text{IZMEĐU UZORAKA}}$$

Tablica 4.1.2. Procjena sume kvadrata (SS)

SS_{UKUPNO} =	112518,54
SS_{IZMEĐU UZORAKA} =	22641,76
SS_{UNUTAR UZORAKA} =	89876,78

Iz tablica 4.1.3. i 4.1.4. zaključuje se da je $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ uz 99% sigurnosti ($p = 1\%$) te se H_0 odbacuje. Uzorci ne pripadaju istim koncentracijama, stoga se dolazi do zaključka da se uzorci značajno razlikuju. Međutim, kako bi se usporedile pojedinačne prosječne vrijednosti uzoraka, potrebno je uraditi dodatne testove – testove višestrukih usporedbi.

Tablica 4.1.3. Tablica ANOVA-e

Izvori varijabilnosti	df	SS	S ²	F _{exp}	F _{tab}	
Ukupno	ukupan broj svih varijanata u pokusu - 1	$SS_{UKUPNO} = \sum x^2 - (\sum x)^2/n$			F _p = 0.05	F _p = 0.01
Između uzoraka	broj analiziranih uzoraka - 1	$SS_{IZMEĐU\ UZORAKA} = (\sum x_1)^2/n_1 + (\sum x_2)^2/n_2 + \dots + (\sum x_k)^2/n_k - C.F.$	SS _{između} /df	S ² _{između} / S ² _{unutar}	Iščitati iz F-tablice	
Unutar uzoraka	df _{ukupno} - df _{između}	$SS_{UNUTAR\ UZORAKA} = SS_{UKUPNO} - SS_{IZMEĐU\ UZORAKA}$	SS _{unutar} /df			

df – broj stupnjeva slobode, odnosno broj slobodnih varijanata

s² – varijanca; prosječno kvadratno odstupanje svake varijante od prosjeka uzorka

F_{exp} – F eksperimentalni faktor; broj koji pokazuje koliko je puta varijanca u brojniku veća od varijance u nazivniku

F_{tab} – F tablični faktor; kritična vrijednost – broj koji pokazuje koliko najmanje puta varijanca u brojniku treba biti veća od varijance u nazivniku da bi se smatrale značajno različitim; F_{tab} = (n₁ – 1) varijance u brojniku → stupac / (n₂ – 1) varijance u nazivniku → red

Izvor: Osnove biometrike. Sustav za e-učenje Merlin, 2019/2020. Srce, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računski centar.

<https://moodle.srce.hr/2019-2020/course/view.php?id=47809> – pristup 23.07.2021.

Tablica 4.1.4. Tablica ANOVA; Microsoft Excel

Izvori varijabilnosti	df	SS	s ²	F _{exp}	F _{tab} p=5%	F _{tab} p=1%
Ukupno	239	112518,54				
Između uzoraka	7	22641,76	3234,54	8,35	2,05	2,72
Unutar uzoraka	232	89876,78	387,40			

Prema prethodnoj analizi varijance i provedbi višestrukih usporedbi (Tablica 4.1.5.) zaključuje se da uzorak c [mikročestice bakrovog alginata (3%) veličine 80 μm] ima najveću prosječnu vrijednost, značajno veću u odnosu na uzorke e [mikročestice bakrovog alginata (3%) veličine 120 μm] i f [mikročestice bakrovog alginata (4%) veličine 120 μm], koji se međusobno ne razlikuju značajno.

Tablica 4.1.5. Provedba t-testa za usporedbu parova; Microsoft Excel

	K-a	K-b	K-c	K-d	K-e	K-f	K-g
D_{exp}	2,84	10,65	12,35	5,11	15,80	21,55	9,93
S_D	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
t_{exp}	0,56	2,09	2,43	1,01	3,11	4,24	1,95

	a-b	a-c	a-d	a-e	a-f	a-g
D_{exp}	7,80	15,19	2,27	12,96	18,71	7,09
S_D	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
t_{exp}	1,54	2,99	0,45	2,55	3,68	1,39

	b-c	b-d	b-e	b-f	b-g	c-d	c-e	c-f	c-g
D_{exp}	23,00	5,53	5,16	10,91	0,72	17,46	28,15	33,91	22,28
S_D	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08
t_{exp}	4,53	1,09	1,02	2,15	0,14	3,44	5,54	6,67	4,39

	d-e	d-f	d-g	e-f	e-g	f-g	t _{tab}
D_{exp}	10,69	16,44	4,82	5,75	5,87	11,63	p=5% 1,97
S_D	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	5,08	p=1% 2,60
t_{exp}	2,10	3,24	0,95	1,13	1,16	2,29	

D_{exp} – razlika između dvije prosječne vrijednosti

S_D – broj koji označava procjenu pogreške pri provođenju višestrukih t-testova nakon F-testa u analizi varijance

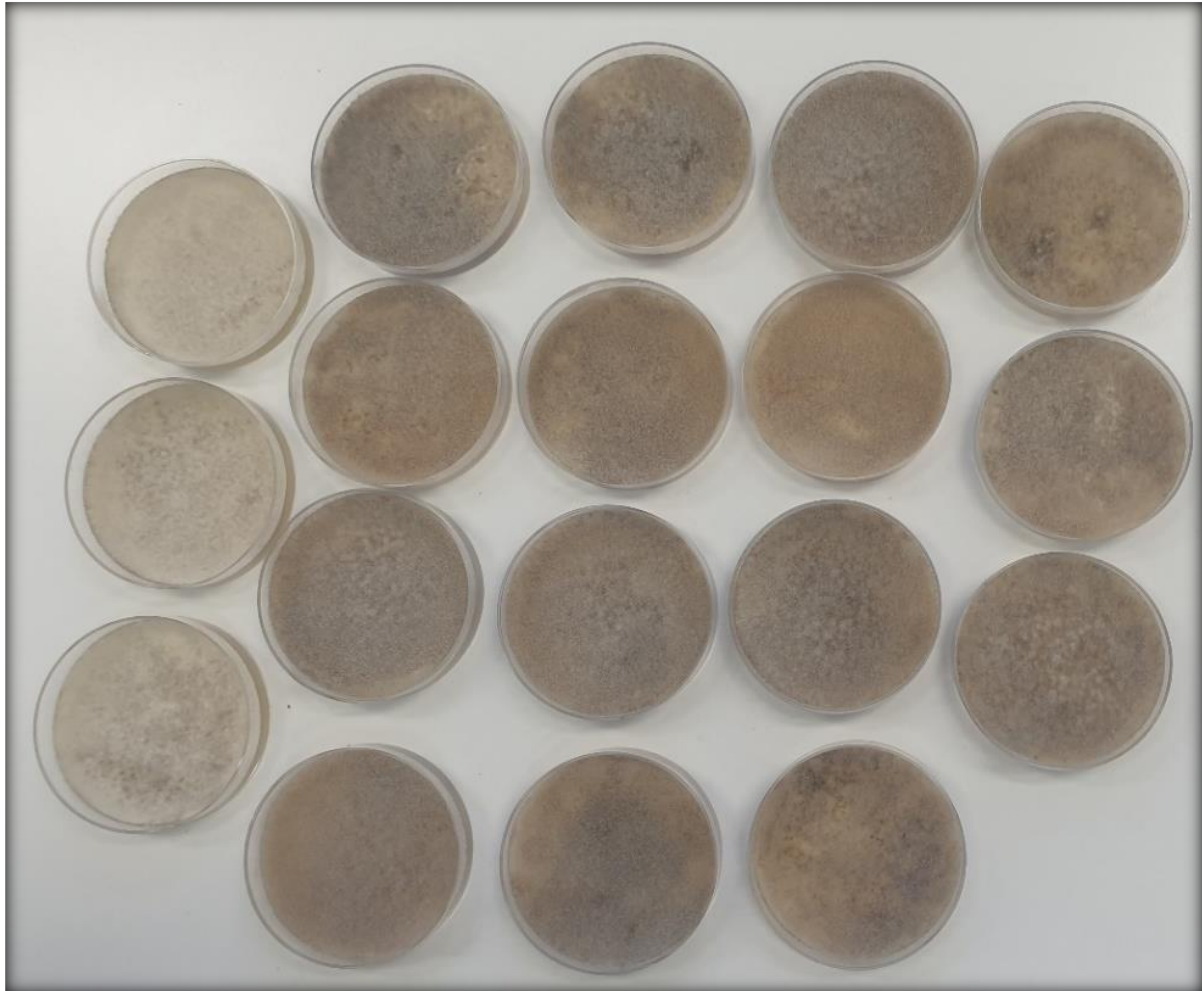
$$S_d = \sqrt{s_{ost}^2 + (n_2 + n_1 / n_1 * n_2)}$$

T_{exp} – eksperimentalni t faktor; broj koji pokazuje koliko je puta razlika veća od svoje pogreške

T_{tab} – tablični t faktor; broj koji pokazuje koliko najmanje puta razlika treba biti veća od svoje pogreške da bi se smatrala značajnom, odnosno signifikantnom; t_{tab} iz n – 1 ostatka (unutar uzorka)

Poželjan rezultat ovog istraživanja je manja duljina kličnih cijevi kod mikročestica bakrovog alginata (2%, 3%, 4%) od duljine kod kontrole (K) te spriječen razvoj ove gljive djelovanjem bakra, no rezultatom ovog pokusa (kao što se može vidjeti na Slici 4.1.3.) te analizom varijanci

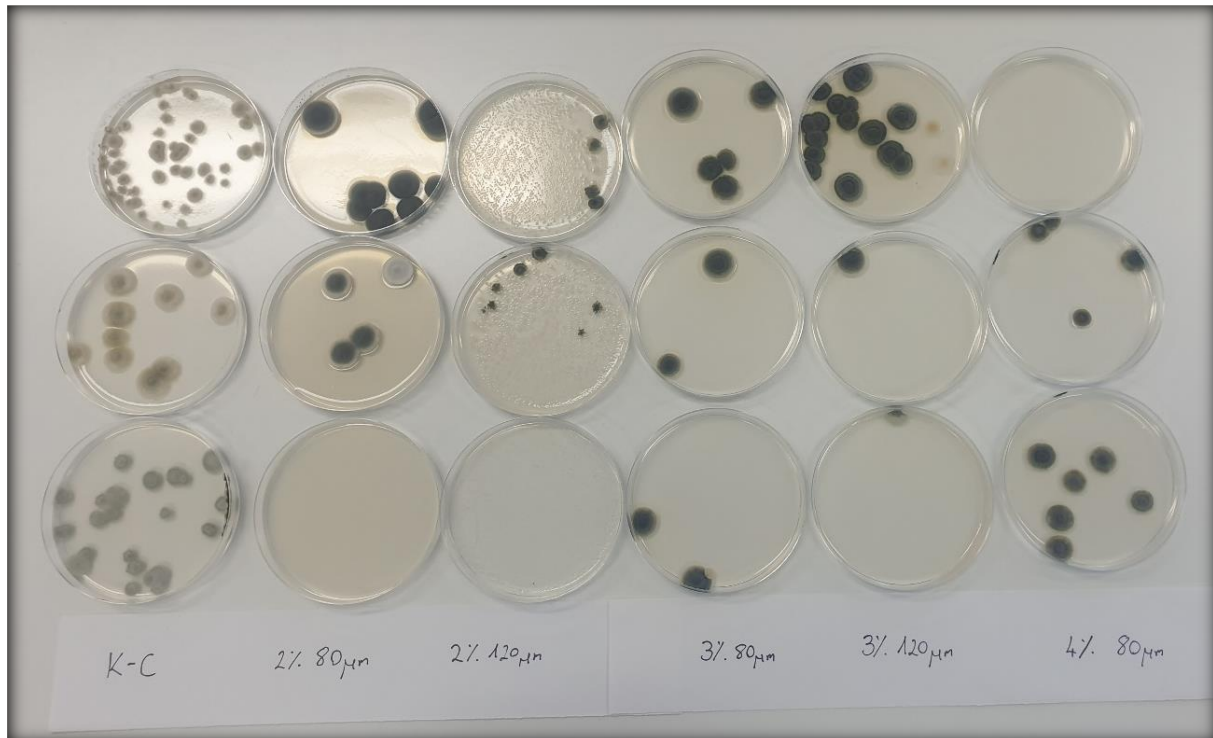
utvrđeno je da mikročestice bakrovog alginata ne suzbijaju rast i razvoj fitopatogene gljive *Botrytis cinerea*. Pretpostavlja se da je prisutna manja osjetljivost ove vrste na bakrene spojeve.



Slika 4.1.3. *B. cinerea* - razvijen micelij nakon 7 dana

4.2. Utjecaj primjene mikročestica bakrovog alginata na rast micelija patogena *Cercospora beticola*

Kao što je prikazano na Slici 4.2.1., može se uočiti da se kod kontrole razvio veći broj kolonija nego kod mikročestica bakrovog alginata.



Slika 4.2.1. Razvoj kolonija kod kontrole te različitih koncentracija i veličina mikročestica bakrovog alginata

Tablica 4.2.1. *C. beticola* - prosječni broj kolonija kod kontrole i mikročestica bakrovog alginata različitih koncentracija i veličina

Redni broj	Oznaka	Broj kolonija				Prosjek na 2cm ²
1.	K	2	2	1	0	1,25
2.	K	2	2	0	2	1,50
3.	K	3	3	1	0	1,75
4.	2% 80 μm	1	0	0	2	0,75
5.	2% 80 μm	1	0	0	2	0,75
6.	2% 80 μm	0	0	0	0	0,00
7.	2% 120 μm	1	1	0	0	0,50
8.	2% 120 μm	1	2	0	0	0,75
9.	2% 120 μm	0	0	0	0	0,00
10.	3% 80 μm	1	0	0	3	1,00
11.	3% 80 μm	1	0	0	0	0,25
12.	3% 80 μm	1	0	0	0	0,25
13.	3% 120 μm	1	3	2	1	1,75
14.	3% 120 μm	0	0	0	0	0,00
15.	3% 120 μm	0	0	0	0	0,00
16.	4% 80 μm	0	0	0	0	0,00
17.	4% 80 μm	1	0	0	0	0,25
18.	4% 80 μm	1	1	1	1	1,00

Relativni postotak razvijenih kolonija (postotak inhibicije) izračunao se na temelju odnosa između kontrole i mikročestica bakrovog alginata. Postotak inhibicije se računao prema Abbotu (1925.): $\frac{X-Y}{X} \times 100$ gdje je:

X = prosječan broj kolonija na kontroli

Y = prosječan broj kolonija na mikročesticama bakrovog alginata

Na temelju rasta kolonija kod različitih koncentracija mikročestica bakrovog alginata izračunala se EC₅₀ vrijednost za određene veličine mikročestica, što se može vidjeti u Tablici

4.2.2. Ta vrijednost predstavlja srednju učinkovitu koncentraciju, odnosno koncentraciju koja inhibira 50% rasta gljive *C. beticola*. EC₅₀ koncentracija za 80 µm iznosi 0,562%, dok EC₅₀ koncentracija za 120 µm iznosi 1,3%.

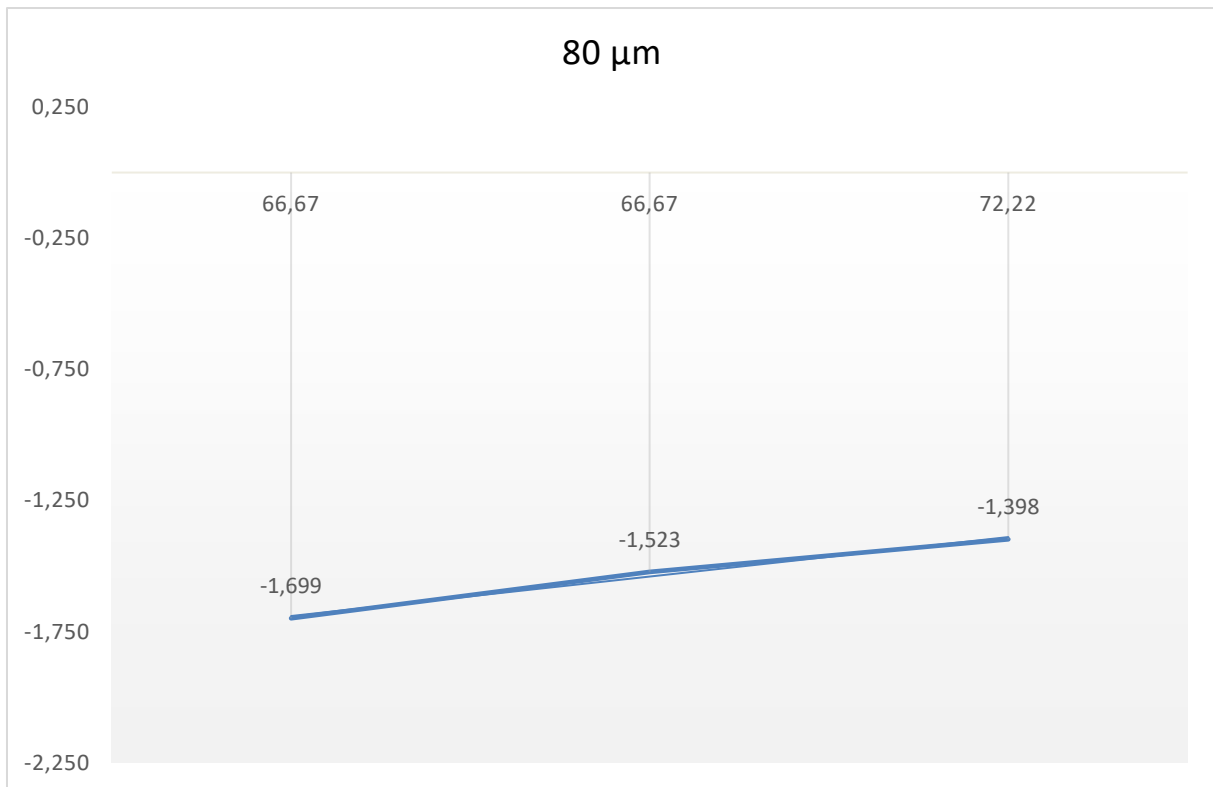
Tablica 4.2.2. *C. beticola* – izračunata EC₅₀ vrijednost u programu Microsoft Excel

inhibicija %	2% 80 µm	66,67	2% 120 µm	61,11
	3% 80 µm	66,67	3% 120 µm	72,22
	4% 80 µm	72,22		

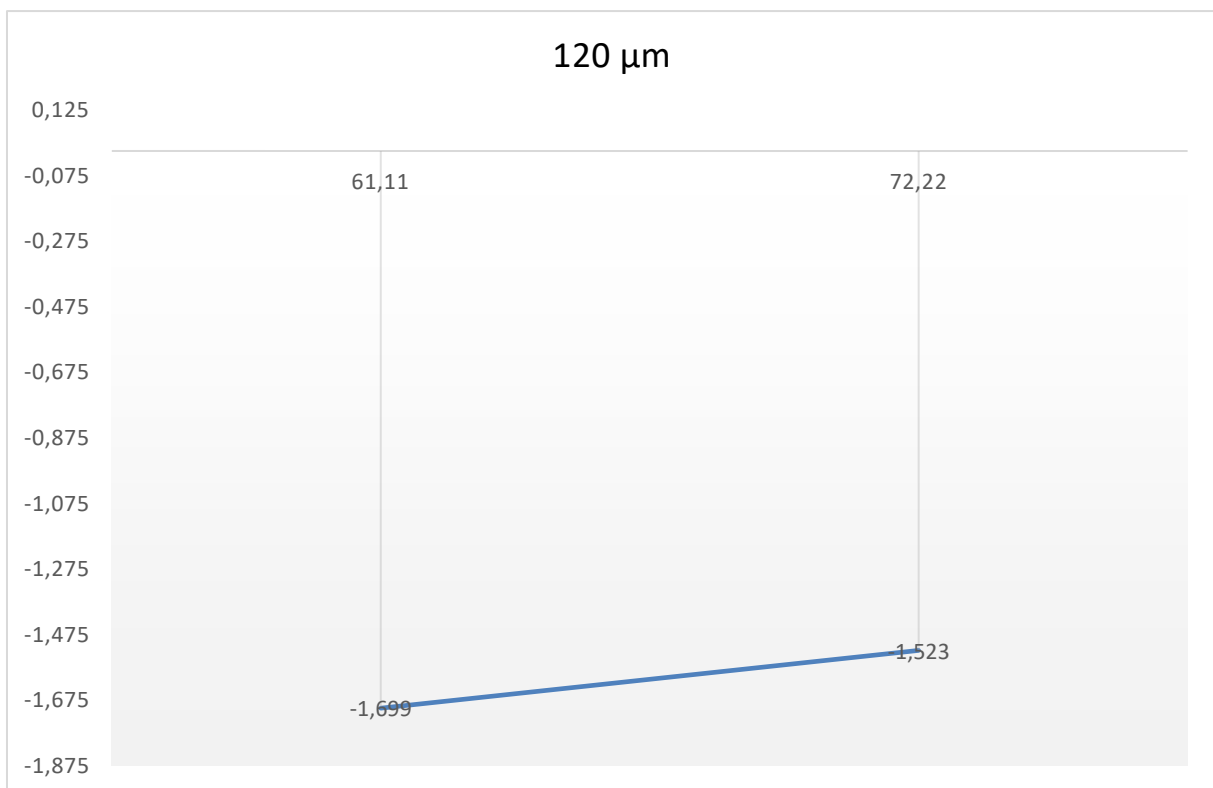
LOG (0,02)	-1,699
LOG (0,03)	-1,523
LOG (0,04)	-1,398

	-2,250	-1,875
EC50	0,562%	1,3%

Na grafu s x,y (Graf 4.2.1. i Graf 4.2.2.) osi, postotak inhibicije postavljen je na x os, dok su logaritmirane vrijednosti koncentracija postavljene na y os. Iscrtan je prosječni pravac. Na y osi je očitana vrijednost 50% inhibicije. Za izračun je korištena Excel formula koja predviđa vrijednost na y osi za vrijednost na x osi = 50 (EC₅₀)=FORECAST(50;vrijednosti na x osi;vrijednosti na y osi). Za dobivenu vrijednost je izračunat antilogaritam kako bi se dobila koncentracija.



Graf 4.2.1. Graf s x,y osi – veličina čestica 80 μm



Graf 4.2.2. Graf s x,y osi – veličina čestica 120 μm

Prema podacima se može zaključiti da su mikročestice bakrovog alginata od 120 μm imale jači utjecaj na rast micelija nego mikročestice od 80 μm . Bakar u obliku mikročestica je učinkovit u sprječavanju rasta micelija gljive *C. beticola*.

4.3. Utjecaj primjene mikročestica bakrovog alginata na zarazu listova *Rhododendron* sp. s *Phytophthora ramorum*

Vizualnim pregledom utvrđeno je da je došlo do promijene boje otopine koja je bila najizraženija na kontroli. Slabija promijena boje uočena je u petrijevkama s mikročesticama 4%-tnog bakrovog alginata veličina 80 μm , a zatim i u petrijevkama s 2%-tnim mikročesticama. Pregledom listova rododendrona s kontrole uočeni su simptomi zaraze karakteristični za *Phytophthora ramorum*. Na listovima 4%-tnih mikročestica bakrovog alginata zaraza se blago počela širiti po listu, dok su simptomi kod 2%-tnih mikročestica zamijećeni samo na peteljcima.

Mikroskopom je na kontroli potvrđeno prisustvo micelija i velikog broja sporangija i zoospora. Pojava sporangija uočena je i na koncentraciji od 2 i 4%, međutim bilo ih je u vrlo malom broju i uglavnom prazni ili deformirani. Micelij je bio puno slabije i nježnije strukture nego na kontroli. Na ostalim koncentracijama nije došlo da razvoja micelija, sporangija i zoospora. Vizualna zapažanja prikazana su na slikama 4.3.1., 4.3.2. i 4.3.3. Rezultati ovog pokusa upućuju na mogućnost suzbijanja ovog patogenog organizma primjenom mikročestica bakrovog alginata.



Slika 4.3.1. *P. ramorum* – rezultati



Slika 4.3.2. *P. ramorum* – kontrola promatrana mikroskopom – razvoj micelija



Slika 4.3.3. *P. ramorum* i listovi rododendrona – rezultati

4.4. Biotest na plodovima jabuke

Slike 4.4.1. i 4.4.2. prikazuju zarazu kod gotovo svih plodova jabuke, stoga se može zaključiti da mikročestice bakrovog alginata veličina 80 μm i 120 μm , u koncentracijama 2%, 3% i 4%, te standardni pripravak Neoram ne sprječavaju zarazu i ne suzbijaju rast fitopatogene gljive *Botrytis cinerea* na plodovima jabuke.



Slika 4.4.1. *B. cinerea* – 1. pokus – izgled plodova jabuke nakon 5 dana od postavljanja biotesta



Slika 4.4.2. *B. cinerea* – 2. pokus – izgled plodova jabuke nakon 4 dana od postavljanja biotesta

U Tablici 4.4.1. i Tablici 4.4.2. prikazane su veličine promjera krugova zaraze kod svih uzoraka i kontrole oba pokusa. Promjeri krugova zaraze gotovo su identični kod svih ispitivanih pripravaka i kontrole. Pokusom je utvrđeno da testirani pripravci nemaju učinak na *B. cinerea*. Oba pokusa potvrđuju *in vitro* rezultate, odnosno potvrđuju tezu da *B. cinerea* nije osjetljiva na bakrene spojeve.

Tablica 4.4.1. Biotest 1 - promjer krugova zaraze na plodovima jabuke

Pripravak	promjer u cm	promjer u cm	promjer u cm
<i>KONTROLA 1</i>	3,5 x 4,0	2,0 x 3,5	3,5 x 4,0
<i>KONTROLA 2</i>	1,3 x 1,5	1,6 x 1,5	0
<i>2% 80 μm 1</i>	1,5 x 1,5	2,0 x 1,5	2,5 x 3,0
<i>2% 80 μm 2</i>	2,0 x 2,3	2,0 x 1,5	0
<i>3% 80 μm 1</i>	1,5 x 1,5	1,5 x 1,2	0
<i>3% 80 μm 2</i>	1,8 x 1,5	0	0
<i>4% 80 μm 1</i>	0	0	0
<i>4% 80 μm 2</i>	3,5 x 4,0	0	0
<i>Neoram 0,25% 1</i>	3,5 x 3,0	2,5 x 2,5	0
<i>Neoram 0,25% 2</i>	3,0 x 2,0	1,3 x 2,0	0
<i>Neoram 0,5% 1</i>	0	0	1,1 x 1,5
<i>Neoram 0,5% 2</i>	0	0	1,0 x 1,0

Tablica 4.4.2. Biotest 2 - promjer krugova zaraze na plodovima jabuke

Pripravak	promjer u cm	promjer u cm	promjer u cm
<i>KONTROLA 1</i>	2,5x2,0	2,5x3,0	2,5x2,0
<i>KONTROLA 2</i>	2,5x2,0	2,3x2,0	2,7x2,0
<i>2% 120 μm 1</i>	2,5x1,5	1,5x1,0	1,5x1,0
<i>2% 120 μm 2</i>	2,5x2,5	2,5x2,0	2,5x2,0
<i>3% 120 μm 1</i>	2,0x1,8	2,0x1,3	2,0x1,7
<i>3% 120 μm 2</i>	2,5x2,0	2,5x2,0	1,8x1,0
<i>4% 120 μm 1</i>	1,8x1,3	1,5x2,0	1,8x1,3
<i>4% 120 μm 2</i>	2,5x2,0	2,5x2,5	2,5x2,0
<i>Neoram 0,25% 1</i>	2,5x1,8	2,5x1,5	2,0x2,0
<i>Neoram 0,25% 2</i>	2,0x1,3	1,2x1,0	2,5x2,0
<i>Neoram 0,5% 1</i>	2,3x1,4	1,8x1,8	1,4x1,3
<i>Neoram 0,5% 2</i>	1,4x1,3	2,0x1,8	2,0x2,0

5. Rasprava

5.1. Utjecaj primjene mikročestica bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) na klijanje konidija *Botrytis cinerea*

Poznato je da je bakar toksičan metal, no i vrlo bitan nutrijent za žive stanice pošto je sastavni dio mnogih metaloenzima, kao što je citokrom c oksidaza (Lontie, 1984.; Saitoh i sur. 2009.; Judet-Correia i sur., 2011.). Bakar je aktivna komponenta vodenih herbicida, baktericida i fungicida koji se koriste u poljoprivredi (Judet-Correia i sur., 2011.). U vinogradima se protiv peronospora (*Plasmopara viticola*) i gljive *Botrytis cinerea* koriste bordoška juha te burgundska smjesa pripremljena od bakrenog sulfata i natrijevog karbonata (Borkow i Gabbay, 2005.; Judet-Correia i sur., 2011.). Prisutnost visokih koncentracija bakrenih iona u okolišu može navesti plijesni da razviju posebne mehanizme otpornosti (Cervantes i Gutierrez-Corona. 1994.; Judet-Correia i sur., 2011.).

Kemikalije na bazi bakra učinkovito se koriste kao antimikrobna sredstva u poljoprivredi. Međutim, za primjenu bakra u obliku nanočestica postoji ograničen broj studija. Prema istraživanju Banika i Pérez-de-Luquea (2017.), provedena su *in vitro* ispitivanja djelovanja nanočestica bakra (CuNP) na fitopatogene gljive, oomicete, bakterije, korisne mikrobe (*Trichoderma harzianum* i *Rhizobium* spp.) te na sjeme pšenice. Fitopatogene gljive pokazale su različite odgovore na inhibiciju i poticanje rasta pomoću CuNP-a, bakrenog oksiklorida koji nije u obliku nanočestica (CoC-a) i njihovih kombinacija. Kod gljive *B. cinerea* uočeno je smanjenje rasta, ali na niskoj razini (manje od 10%).

Prema istraživanju Kovačec i sur. (2017.), dvije fitopatogene gljive, *Botrytis cinerea* i *Alternaria alternata*, izolirane iz usjeva, izložile su se bakru u ionskom obliku (Cu^{2+}), obliku mikročestica (CuO MP) i nanočestica (Cu ili CuO NP), u čvrstom i tekućem mediju za uzgoj kako bi se ispitao gljivični odgovor i toksični učinci navedenih spojeva za potencijalnu upotrebu kao fungicida. *B. cinerea* je pokazala izraženiji rast i nižu razinu peroksidacije lipida u usporedbi s *A. alternata*. Veća otpornost/tolerancija gljive *B. cinerea* uglavnom se pripisuje biotransformaciji CuO i Cu NP i CuO MP u plavi spoj na sučelju gljiva/medija za uzgoj, koji je prepoznat kao Cu-oksalatni kompleks pomoću Cu K-edge EXAFS analize. Izražena aktivnost siderofora kateholnog tipa i izlučivanje organske kiseline kod *B. cinerea* inducira ispiranje i mobilizaciju Cu^{2+} iz čestica te njihovo daljnje kompleksiranje s izvanstanično izlučenom oksalnom kiselinom. Sposobnost ove gljive da biotransformira CuO MP i NP otežava njihovu upotrebu kao fungicida. Međutim, rezultati pokazuju da *B. cinerea* ima potencijal za korištenje u razgradnji Cu(O) nanočestica u okolišu, ekstrakciji bakra i tehnikama pročišćavanja.

Ovo istraživanje je potvrdilo rezultate prethodno spomenutih istraživanja, odnosno pokazalo da bakar u formulaciji mikročestica nema gotovo nikakav utjecaj na suzbijanje gljive *Botrytis cinerea* te se pretpostavlja da je razlog tomu razvoj otpornosti prema bakru kao fungicidu.

5.2. Utjecaj primjene mikročestica bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) na rast *Cercospora beticola*

Prakse integriranog upravljanja bolestima kao što je rotacija usjeva, obrada tla za smanjenje razine inokuluma i upotreba tolerantnih kultivara od ključne su važnosti za upravljanjem bolesti pjegavosti lista uzrokovane gljivom *Cercospora* (CLS). Također, fungicidi se koriste u velikoj količini, mijenjaju se prema načinu djelovanja te se često koriste u mješavinama za najbolju učinkovitost i smanjenje razvoja otpornosti kod patogena (Khan i Hakk, 2015.; Mickelson i Nielsen, 2015.). Fungicidi specifičnog načina djelovanja imaju visok rizik za razvoj otpornosti kod patogena. To je slučaj za fungicide koji se obično koriste za suzbijanje CLS-a s učestalošću opažene rezistencije koja raste na poljima uzgajivača (Secor i sur., 2015.; Mickelson i Nielsen, 2015.). Fungicidi za višestruko djelovanje ili fungicidi koji nisu specifični za ciljano mjesto uključuju EBDC (etilenbisditiokarbamat, mankozeb) i bakrene fungicide (Fungicide Resistance Action Committee, 2015.; Mickelson i Nielsen, 2015.). Njihovo djelovanje je nesistemske, djeluju preventivno. Za ove fungicide se ne očekuje razvoj otpornosti ili će trebati dosta vremena da se ona postigne. Općenito, fungicidi se koriste u mješavinama za poboljšanje kontrole bolesti, povećanje sigurnosti kontrole kada je prisutna otpornost na fungicide i za pomoć u odgađanju razvoja otpornosti kod patogena (Karadimos i Karaoglanidis, 2006.; Mickelson i Nielsen, 2015.).

Formulacije bakra su nesistemske, preventivni fungicidi koji stvaraju zaštitnu barijeru na površini biljke inhibirajući razvoj patogena prije prodiranja u tkivo. Oni stupaju u interakciju s biokemijskim putovima u patogenu na nespecifičan način, utječući na mnoge biokemijske korake. Spojevi bakra u fungicidima imaju relativno nisku topljivost u vodi (Gisi i Sierotzki, 2008.; Mickelson i Nielsen, 2015.). Na lišću se ioni bakra postupno oslobađaju iz spojeva, obično svakim vlaženjem lista. Slobodni ioni bakra denaturiraju proteine, čime uništavaju enzime i zauzvrat ubijaju žive stanice (Mickelson i Nielsen, 2015.).

Prema istraživanju Alkolaly i sur. (2022.), na području poljoprivredne istraživačke stanice Sakha, Kafr El-Sheikh Governorate, Egipat, gdje su postavljena pokusna polja, CLS je najvažnija folijarna bolest šećerne repe. Epidemije bolesti obično započinju tijekom prosinca i završavaju sredinom veljače, kada niže temperature zaustavljaju razvoj bolesti. Ozbiljnost bolesti u pokusnim poljima općenito je bila visoka tijekom dvije sezone istraživanja. Sva tri tretmana Montoro, Plco-free (prirodna komponenta) i CuNP (nanočestice bakra) značajno su suzbila CLS u usporedbi s netretiranim parcelama.

Uspoređujući istraživanje Alkolaly i sur. s ovim radom, potvrđen je pozitivan učinak mikročestica bakrovog alginata kod suzbijanja gljive *C. beticola*. Postoji potencijal u korištenju ispitivanih formulacija u suzbijanju pjegavosti lista šećerne repe. Pjegavost se suzbija višestrukom primjenom fungicida. Formulacije se mogu koristiti samostalno ili kao dodatak organskim sistemskim fungicidima. Postoje potencijalne prednosti formulacija, a najveće od njih su sporo ispuštanje bakra te potencijalno dulje djelovanje. Rokovi između tretiranja i broj tretmana bi se mogli skratiti, a zaštita bi mogla biti dulja. Naravno, bilo bi svakako uputno usporediti „poljsko“ djelovanje formulacija s registriranim bakrenim fungicidima na tržištu.

5.3. Utjecaj primjene mikročestica bakrovog alginata (2%, 3% i 4%) na zarazu listova *Rhododendron* sp. s *Phytophthora ramorum*

Phytophthora ramorum je opći patogen koji može zaraziti više od 100 biljnih domaćina u divljini i u komercijalnim rasadnicima (USDA-APHIS, 2007.; Garbelotto i sur., 2009.). Općenito, infekcija nekoliko vrsta hrasta (*Quercus*) i srodnih tanoaka (*Lithocarpus densiflorus*) rezultira velikim smrtonosnim lezijama koje opasuju floem i začepuju vanjski ksilem glavnog stabla, a naziva se iznenadna smrt hrasta (SOD) (Garbelotto i sur., 2001.; Rizzo i sur., 2002.; Garbelotto i sur., 2009.). Bolesti *Phytophthora* često se kontroliraju kemijskim tretmanima, s uspješnim rezultatima u komercijalnim rasadnicima i u prirodnim ekosustavima. Naravno, na učinkovitost kemijskih sredstava za kontrolu utječu varijacije u njihovoj postojanosti tijekom vremena, u njihovom ponašanju na različitim biljkama domaćinima te u osjetljivosti između različitih genotipova patogena (Garbelotto i sur., 2009.).

Aktivni sastojci većine *oomycete* fungicida na belgijskom tržištu ispitani su na njihov *in vitro* učinak na rast micelija četiri izolata *P. ramorum*. Metalaksil, dimetomorf i bentiavalikarb-izopropil pokazali su potpunu inhibiciju rasta micelija pri 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ili manje, dok su cimoksanil, etridiazol i mankozeb uzrokovali potpunu inhibiciju rasta pri 1 do 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Međutim, fungicidi koji pokazuju najbolji učinak na biljkama su metalaksil, cijazofamid i bentiavalikarb-izopropil. Tri najučinkovitija fungicida u ovim pokusima (metalaksil, cijazofamid, bentiavalikarb-izopropil) su jednociljani fungicidi, što ukazuje na veći rizik za razvoj rezistencije. Iako je većina njih komercijalizirana u mješavini s fungicidom širokog spektra, poput mankozeba, vrlo je preporučljivo njihovo naizmjenično korištenje (Heungens i sur., 2006.). Također, poznato je da metalaksil i dimetomorf u kombinaciji s bakrom imaju učinkovito fungicidno djelovanje, stoga bi takve mješavine u određenoj formi mogle doprinijeti suzbijanju *P. ramorum*.

Zaštitni učinci su najbolji kada je donja površina lista prekrivena fungicidom, što je u skladu s opažanjem da se infekcija neoštećenih listova inokuliranih zoosporama odvija uglavnom kroz donju površinu listova. U rasadnicima se fungicidi obično primjenjuju preko nadzemnih sustava za navodnjavanje. Metode primjene koje pomažu dosegnuti donju stranu lista, kao što

je primjena višeg tlaka ili primjena uz potporu zrakom, mogu potencijalno povećati zaštitni učinak. Primjena preko korijena dala je manji zaštitni učinak od očekivanog dok su kurativni tretmani fungicidima 2 dana nakon inokulacije zoosporama bili mnogo manje učinkoviti od zaštitnih tretmana (1 dan prije inokulacije zoosporama). Istraživanje pokazuje da zaštitna primjena specifičnih fungicida može doprinijeti učinkovitim strategijama suzbijanja *P. ramorum* na rododendronu (Heungens i sur., 2006.).

Početa istraživanja Garbelottoa i sur. (2002.; Sansford i Woodhall, 2007.) ukazuju na učinkovitost metalaksa, bakrovog sulfata i fosetil-aluminija protiv *P. ramorum* pošto su snažno inhibirali rast micelija u testovima *in vitro*. Međutim, istraživanja Heungensa i sur. (2005.; Sansford i Woodhall, 2007.), kojima su testirali različite kemikalije koristeći testove na agar ploči, su pokazala da bakrov oksiklorid i još neki određeni spojevi nisu u potpunosti inhibirali rast pseudogljive *P. ramorum*, čak ni pri 100 µg/ml.

Wagner i sur. (2007.; Sansford i Woodhall, 2007.) otkrili su da su dimetomorf, bakrov oktanoat i mankozeb s fenamidonom najučinkovitije kemikalije koje su testirali, pokazujući potpunu inhibiciju rasta micelija i klijanja zoospora pseudogljive *P. ramorum*.

Istraživanja u SAD-u procijenila su učinkovitost različitih kemikalija u kontroli bolesti na drveću. Garbelotto i sur. (2002.; Sansford i Woodhall, 2007.) testirali su nekoliko kemikalija na 3 do 5 m visokim sadnicama oblanog hrasta (*Quercus agrifolia*) inokuliranih s *P. ramorum*. Sve su mladice inokulirane dva puta, u razmaku od približno 11 tjedana. Tri dana nakon druge inokulacije, kemikalije su ubrizgane u svaku mladicu. Otkrili su da su mladice tretirane fosetil-aluminijem, metalaksilom i fosfornom kiselinom imale znatno manje rane od netretiranih mladica ili onih kojima je ubrizgan bakrov sulfat pentahidrat. Međutim, prema istraživanju Garbelottoa i sur. iz 2009., sposobnost metalaksil-M-a, fosfonske kiseline u obliku fosfonata, i bakrenog hidroksida da inhibiraju različite faze u životnom ciklusu pseudogljive *Phytophthora ramorum*, uzročnika iznenadne smrti hrasta (SOD), ispitana je *in vitro* korištenjem 12 izolata iz sjevernoameričke šumske loze. Osim toga, eksperimenti su provedeni među biljkama kako bi se proučila sposobnost ubrizgavanja fosfonske kiseline i natapanjem metalaksil-M-om za kontrolu rasta patogena na mladicama kalifornijskog obalnog hrasta (*Quercus agrifolia*), i sposobnosti prskanja lišća bakrenim hidroksidom za kontrolu infekcije kalifornijskog lovora (*Umbellularia californica*). *P. ramorum* pokazala je samo umjerenu osjetljivost na fosfonsku kiselinu *in vitro*, ali je bila vrlo osjetljiva na bakreni hidroksid. Pokusi na biljkama ukazali su na široku učinkovitost injekcija fosfonske kiseline i prskanja bakrenim hidroksidom u sprječavanju rasta *P. ramorum* kod hrasta, odnosno lovora.

U ovom istraživanju su mikročestice bakrovog alginata spriječile razvoj *P. ramorum*, kao i kod istraživanja Wagnera i sur. gdje je bakrov oktanoat inhibirao rast micelija i klijanje zoospora ove pseudogljive, što pokazuje očiglednu osjetljivost *P. ramorum* prema bakru. Međutim,

određene formulacije i spojevi bakra kod pojedinih prethodno spomenutih istraživanja nisu bili uspješni u sprječavanju razvoja pseudogljive. Naravno, postoji potencijal u korištenju ispitivanih formulacija u suzbijanju bolesti koje uzrokuje *P. ramorum*. Kao što je već spomenuto kod gljive *C. beticola*, formulacije se mogu koristiti samostalno ili kao dodatak organskim sistemičnim fungicidima. Neke od potencijalnih prednosti formulacija su sporo otpuštanje bakra i potencijalno dulje djelovanje. Rokovi između tretiranja i broj tretmana bi se mogli skratiti, a zaštita bi mogla biti dulja. Bilo bi svakako uputno usporediti „poljsko“ djelovanje formulacija s registriranim bakrenim fungicidima na tržištu.

6. Zaključak

- Uspoređujući prethodno provedena istraživanja i ovo istraživanje, može se zaključiti da mikročestice bakrovog alginata oslabljeno djeluju na gljivu *B. cinerea* te da ova gljiva pokazuje manju osjetljivost na bakrene spojeve. Također, biotest na jabukama potvrdio je tezu *in vitro*, odnosno učinak ispitivanih formulacija u biotestu s *B. cinerea* na jabukama je bio gotovo nikakav. Poznato je da se *B. cinerea* smatra visokorizičnim patogenom za razvoj otpornosti na fungicide što bi moglo ukazati na problem u ovom istraživanju.
- Mikročestice bakrovog alginata pokazale su učinkovitost u sprječavanju razvoja kolonija *C. beticola*. Dokazano je da mikročestice bakrovog alginata od 120 μm imaju jači utjecaj na suzbijanje rasta gljive nego mikročestice od 80 μm , što znači da su veličina čestica i bakreni spojevi učinkoviti u sprječavanju razvoja kolonija gljive *C. beticola*.
- Postoji potencijal u korištenju ispitivanih formulacija u suzbijanju pjegavosti lista šećerne repe. Pjegavost se suzbija višestrukom primjenom fungicida. Formulacije se mogu koristiti samostalno ili kao dodatak organskim sistemskim fungicidima. Postoje potencijalne prednosti formulacija mikročestica, a najveća prednost je sporo ispuštanje bakra i potencijalno dulje djelovanje. Rokovi između tretiranja bi se mogli skratiti, zaštita bi mogla biti dulja, a broj tretiranja bi se mogao smanjiti. Naravno, bilo bi svakako uputno usporediti „poljsko“ djelovanje formulacija s registriranim bakrenim fungicidima na tržištu.
- Mikročestice bakrovog alginata pokazale su visoku učinkovitost u sprječavanju razvoja pseudogljive *P. ramorum*. Pokus je pokazao da ova pseudogljiva niti nakon 12 dana nije zarazila listove rododendrona te je time ukazano na to da je *P. ramorum* osjetljiv na bakar. Postoji potencijal u korištenju ispitivanih formulacija u suzbijanju bolesti koje uzrokuje *P. ramorum*.

7. Popis literature

1. Abawi G.S., Kikkert J.R., Muktan K., Lange H.W., Smart C.D. (2014). First report of resistance to Quadris among populations of *Cercospora beticola* causing leaf spot of table beet in New York State. (Abstr.) Phytopathology. Vol. 104.
2. Abbott W.S. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. Journal of Economic Entomology. 18: 265-267.
doi: 10.1093/jee/18.2.265a [online]
https://archive.org/details/cbarchive_102510_amethodofcomputingtheeffective1987/page/n1/mode/2up - pristup 13.08.2021.
3. Aguirre G., Pilon M. (2016). Copper Delivery to Chloroplast Proteins and Its Regulation. Frontiers in Plant Science. 6: 1250.
4. Ainsworth G. C. (1971). Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK.
5. Alkolaly A.M., Ghazy N.A., Hassan R.A. (2022). EVALUATION OF THE EFFICACY OF NATURAL COMPOUND AND CUPPER NANO PARTICLE COMPOUNDS IN CONTROLLING CERCOSPORA LEAF SPOT DISEASE OF SUGAR BEET. International Journal of Advanced Research and Review. Giza, Egypt. 7(7): 42-52.
<https://www.ijarr.in/Admin/pdf/EVALUATION-OF-THE-EFFICACY-OF-NATURAL-COMPOUND-AND-CUPPER-NANO-PARTICLE-COMPOUNDS-IN-CONTROLLING-CERCOSPORA-LEAF-SPOT-DISEASE-OF-SUGAR-BEET-2.pdf> - pristup 19.05.2022.
6. APHIS (2004). *Phytophthora ramorum*. <http://www.aphis.usda.gov/ppq/ispm/sod>
7. Backhouse D., Willets H.J. (1984). A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. Canadian Journal of Microbiology. 30: 171-178.
8. Banik S., Pérez-de-Luque A. (2017). In vitro effects of copper nanoparticles on plant pathogens, beneficial microbes and crop plants. Spanish Journal of Agricultural Research. 15(2): e1005. doi: 10.5424/sjar/2017152-10305 [online]
https://www.researchgate.net/publication/317370581_In_vitro_effects_of_copper_nanoparticles_on_plant_pathogens_beneficial_microbes_and_crop_plants - pristup 15.05.2022.
9. Bargagli R. (1998). Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer, Berlin. p. 324.

10. Bažok R., Cvjetković B., Ostojić Z., Barić K. (2020). Revolucija i evolucija kemijske metode zaštite bilja. *Glasilo biljne zaštite*, Vol. 20, Br. 3. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. <https://hrcak.srce.hr/file/344463> – pristup 14.05.2022.
11. Bedek M. (2018). Fizikalno-kemijska karakterizacija i mehanizmi otpuštanja *Trichoderma viride* spora i kalcijevih iona iz mikrosfera kalcijevog alginata. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
12. Beni C., Rossi G. (2009). Conventional and organic farming: estimation of some effects on soil, copper accumulation and wine in a Central Italy vineyard. *Agrochimica -Pisa-*. 53(3): 145–159.
13. Bhattacharyya A., Barik S.R., Ganguly P. (2009). New pesticide molecules, formulation technology and uses: Present status and future challenges. *The Journal of Plant Protection Sciences*. Department of Agricultural Chemicals, BCKV, Mohanpur-741252, West Bengal. 1(1) : 9-15.
<http://www.aappbckv.org/journal/archive/Chapter%202.pdf> – pristup 17.05.2022.
14. Bleiholder H., Weltzien H.C. (1972). Beiträge zur epidemiologie von *Cercospora beticola* Sacc. an Zuckerrübe. III. Geopathologische untersuchungen. *Journal of Phytopathology*. 73(2): 93-114.
15. Bokulić A., Budinščak Ž., Čelig D., Deždek B., Hamel D., Ivić D., Novak M., Mrnjavčić Vojvoda A., Nikl N., Novak N., Novaković V., Pavunić Miljanović Z., Peček G., Poje I., Prpić I., Rehak T., Ševar M., Šimala M., Turk R. (2015). Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja. Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu – Zavod za zaštitu bilja, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Savjetodavna služba. Zagreb.
<https://www.vup.hr/Data/Files/prirucnikszb.pdf> - pristup 07.05.2022.
16. Borkow G., Gabbay J. (2005). Copper as a Biocidal Tool. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 2163–2175.
17. Bulović M. (2019). Morfološke karakteristike fitopatogene gljive *Botritis cinerea* i učinak boskalida na porast izolata iz vinogorja Srijem i Erdut. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
18. Burkhead J.L., Reynolds K.A., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Pilon M. (2009). Copper homeostasis. *New Phytologist*. 182: 799–816.

19. CABI (2022). *Cercospora beticola* (*cercospora* leaf spot of beets). Invasive Species Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/12191> - pristup 16.07.2022.
20. Cervantes C., Gutierrez-Corona F. (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiology Reviews. 14: 121–138.
21. Cha J.S., Cooksey D.A. (1991). Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88(20): 8915–8919.
22. Cioni F., Maines G., Kempl F. (2014). SENSITIVITY AND RESISTANCE OF CERCOSPORA BETICOLA TO DIFFERENT FUNGICIDES, NEW STRATEGIES IN CLS CONTROL IN ITALY AND AUSTRIA. 74th IIRB Congress, Dresden.
https://www.researchgate.net/publication/270788134_SENSITIVITY_AND_RESISTANCE_OF_CERCOSPORA_BETICOLA_TO_DIFFERENT_FUNGICIDES_NEW_STRATEGIES_IN_CLS_CONTROL_IN_ITALY_AND_AUSTRIA - pristup 13.08.2022.
23. Coelho V., Coutinho S., Gouveia M.E. (2005). Sensitivity to copper and phosphite of *Phytophthora* species associated with ink diseases of chestnut. Acta Horticulturae. 693: 641-644.
24. Ćosić J., Vrandečić K., Jurković D. (2015). *Cercospora beticola* Sacc. – uzročnik pjegavosti šećerne repe. Pregledni rad. Glasnik zaštite bilja 4.
<https://hrcak.srce.hr/file/239509> - pristup 02.05.2022.
25. Dambies L., Vincent T., Domard A., Guibal E. (2001). Biomacromolecules. 2: 1198-1205.
26. Davis R.A., Valentine L.E., Craig M.D., Wilson B., Bancroft W.J., Mallie M. (2014). Impact of *Phytophthora*-dieback on birds in Banksia woodlands in south west Western Australia. Biological Conservation. 171: 136-144.
27. De Vos P., Faas M.M., Spasojevic M., Sikkema J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components: a review. International Dairy Journal. 20(4): 292–302.
28. Dean R., Van Kan J.A., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology. 13: 414–430.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6638784/> - pristup 15.07.2022.

29. DEFRA (2003a). First infected oak found in Sussex.
<http://www.defra.gov.uk/news/2003/031105b.htm>
30. DEFRA (2003b). *Phytophthora ramorum*: more resources and new disease confirmations.
<http://www.defra.gov.uk/news/2003/031204c.htm>
31. Doehlemann G., Ökmen B., Zhu W., Sharon A. (2017). Plant pathogenic fungi. Microbiology Spectrum. Vol. 5, No. 1.
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016> - pristup 10.07.2022.
32. Dorn B., Musa T., Krebs H., Fried P.M., Forrer H.R. (2007). Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. European journal of plant pathology. 119: 217-240.
33. Draget K.I., Smidsrød O., Skdustryjåk-Bræk G. (2005). Alginates from algae. U: Pollysaccharides and Plyamides in the Food In. Properties, Production, and Patents. Steinbuchel A., Rhee S.K. WILEY-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA. Weinheim, Germany. 1–30 ref. many.
34. EFSA (European Food Safety Authority), Arena M., Auteri D., Barmaz S., Bellisai G., Brancato A., Brocca D., Bura L., Byers H., Chiusolo A., Court Marques D., Crivellente F., De Lentdecker C., Egsmose M., Erdos Z., Fait G., Ferreira L., Goumenou M., Greco L., Ippolito A., Istace F., Jarrah S., Kardassi D., Leuschner R., Lythgo C., Magrans J.O., Medina P., Miron I., Molnar T., Nougadere A., Padovani L., Parra Morte J.M., Pedersen R., Reich H., Sacchi A., Santos M., Serafimova R., Sharp R., Stanek A., Streissl F., Sturma J., Szentés C., Tarazona J., Terron A., Theobald A., Vagenende B., Verani A., Villamar-Bouza L. (2018). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds copper(I), copper(II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture. EFSA Journal. 16(1): 5152–5175.
35. Eisler R. (1998). Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S., Geological Survey. Biological Resources Division, Biological Science Report USGS/BRD/BSR-1997-0002. Washington, DC. p. 98.
36. EPPO (2005). *Phytophthora ramorum*.
http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/fungi/oak_death.htm

37. EPPO (2006). EPPO Standards PM 7/66 Diagnostics. *Phytophthora ramorum*. EPPO Bulletin. 36: 145-155.
38. EPPO (2020). *Phytophthora ramorum*.
<https://gd.eppo.int/taxon/PHYTRA/datasheet> - pristup 18.07.2022.
39. Ertesvåg H., Valla S. (1998). Biosynthesis and applications of alginates. Polymer Degradation and Stability. 59(1-3): 85–91.
40. Everhart S., Tabima J., Grü N. (2014). *Phytophthora ramorum*.
https://www.researchgate.net/publication/269574914_Phytophthora_ramorum - pristup 05.05.2022.
41. Ferrándiz M., Capablanca L., García D., Bonet M.Á. (2017). Application of Antimicrobial Microcapsules on Agrotexiles. Journal of Agricultural Chemistry and Environment. 6: 62-82.
42. Flemming C.A., Trevors J.T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. Water, Air, and Soil Pollution. 44: 143–158.
43. Flores-Vélez L.M., Ducaroir J., Jaunet A.M., Robert M. (1996). Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. European Journal of Soil Science. 47: 523–532.
44. Franich R.A., Wells L.G. (1975). The Chemistry of Weathering of Copper Fungicide on *Pinus radiata* Foliage and the Fungitoxicity of Copper Residues to *Dothistroma pini*. New Zealand Institute of Forest Research, Rotorua, New Zealand.
45. Fujiwara G.M., Campos R., Klocker Costa C., Gaspari Dias J.F., Obdulio Gomes M., Marilis Dallarmi M., Assis Marques F., Warumby Zanin S.M. (2013). Production and characterization of alginate-starch-chitosan microparticles containing stigmasterol through the external ionic gelation technique. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science.
46. Fungicide Resistance Action Committee (2015). FRAC Code List 2015: Fungicides sorted by mode of action. Croplife International, Brussels, Belgium.
47. Fungicide Resistance Action Committee (2018). FRAC code list: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC code numbering). <http://www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf>. Accessed 20 November 2019.

48. Gallo M., Corbo M.R. (2010). Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. U: Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability. Bentham Science Publisher. pp.188-195.
49. Garbelotto M., Svihra P., Rizzo D.M. (2001). Sudden oak death syndrome fells 3 oak species. California Agriculture. 55: 9–19.
50. Garbelotto M., Rizzo D.M., Marais L. (2002). *Phytophthora ramorum* and Sudden Oak death in California: IV. Preliminary studies on chemical control. In: Standiford R.B.; McCreary D.; Purcell K.L. (technical coordinators). Proceedings of the fifth symposium on oak woodlands: oaks in Californias' changing landscape. San Diego, CA. October 22-25, 2001. General Technical Reports. PSW-GTR-184, Albany, CA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station. pp.811-817
51. Garbelotto M., Harnik T., Schmidt D. (2009). Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* *in vitro* and *in planta*. Plant Pathology. 58: 111-119. doi.10.1111/j.1365-3059.2008.01894.x. [online] <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2008.01894.x> - pristup 19.05.2022.
52. Gisi U., Sierotzki H. (2008). Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. European Journal of Plant Pathology. 122(1): 157-167.
53. Goheen E.M., Hansen E.M., Kanaskie A., McWilliams M.G., Osterbauer N., Sutton W. (2002). Sudden oak death caused by *Phytophthora ramorum* in Oregon. Plant Disease. 86: 441.
54. Groenewald M., Groenewald J.Z., Crous P.W. (2005). Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. Phytopathology. 95(8): 951-959.
55. Grünwald N.J., Goss E.M., Press C.M. (2008). *Phytophthora ramorum*: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals. Molecular Plant Pathology. 9(6): 729-740.
56. Guenther J.F., Michael K.C., Nolte P. (2001). The economic impact of potato late blight on US growers. Potato Research. 44: 121-125.
57. Hansen E., Sutton W., Parke J., Linderman R. (2002). *Phytophthora ramorum* and Oregon forest trees – one pathogen, three diseases. In: Sudden Oak Death Science Symposium, University of California, Monterey, USA. Vol. 78.

58. Heungens K., De Dobbelaere I., Maes M. (2005). Fungicide Control of *Phytophthora ramorum* on *rhododendron*. Sudden Oak Death Science Symposium II, Monterey, California, 18.-21. January 2005.
59. Heungens K., De Dobbelaere I., Maes M. (2006). Fungicide control of *Phytophthora ramorum* on *rhododendron*. In: Frankel S.J., Shea P.J., Haverty M.I., tech. coords. Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our knowledge. General Technical Reports PSW-GTR-196. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture. pp.241-257.
60. Ivanović S.M., Ivanović M.D. (2001). Mikoze i pseudomikoze biljaka. Beograd.
61. Ivić D. (2022). Program monitoringa rezistentnosti štetnih organizama na sredstva za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2018. – 2020. Završno izvješće. Program financiran od strane Ministarstva poljoprivrede.
62. Ivić D., Novak A., Šajbić L., Fazinić T. (2019). Osjetljivost *Botrytis cinerea* na neke fungicide. Letak u sklopu projekta Monitoring rezistentnosti štetnih organizama na sredstva za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj (2018. – 2020.).
63. Janse J.D. (2005). Phytobacteriology: Principles and Practices. CABI. Wallingford, UK. p. 360.
64. Jimenez M., Garcia H.S., Beristain C.I. (2004). Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. European Food Research and Technology. 219: 588-592.
65. Johnson G.F. (1935). The early history of copper fungicides. Agricultural History. 9: 67-79.
66. Judet-Correia D., Charpentier C., Bensoussan M., Dantigny P. (2011). Modelling the inhibitory effect of copper sulfate on the growth of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. Letters in Applied Microbiology. 53(5): 558-564.
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765x.2011.03149.x> - pristup 16.05.2022.
67. Jurković D., Ćosić J., Vrandečić K. (2010). Bolesti cvijeća i ukrasnog bilja. Poljoprivreda, Vol. 16, Br. 1. Sveučilišni udžbenik. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

68. Karadimos D.A., Karaoglanidis G.S. (2006). Comparative efficacy, selection of effective partners, and application time of strobilurin fungicides for control of cercospora leaf spot of sugar beet. *Plant disease*. 90: 820-825.
69. Komárek M., Čadková E., Chrastný V., Bordas F., Bollinger J.C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*. 36: 138–151.
70. Kopsell D.E., Kopsell D.A. (2007). Copper. In: *Handbook of plant nutrition* (Barker A.V., D.J. Pilbeam, ed.). Taylor and Francis Group. pp.293–328.
71. Kovačec E., Regvar M., van Elteren J.T., Arčon I., Papp T., Makovec D., Vogel-Mikuš K. (2017). Biotransformation of copper oxide nanoparticles by the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Chemosphere*. 180: 178-185.
<http://real.mtak.hu/55577/1/1-s2.0-S0045653517305453-main.pdf> - pristup 18.05.2022.
72. Kumar Das S., Nakka David S. R., Rajabalaya R., Mukhopadhyay Kumar H., Halder T., Palanisamy M., Khanam J., Nanda A. (2011). Microencapsulation techniques and its practice. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2: 1-23.
73. La Torre A., Iovino V., Caradonia F. (2018). Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*. 57(2): 201-236.
74. Lamichhane J.R., Osdaghi E., Behlau F., Kohl J., Jones J.B., Aubertot J.N. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 38: 28. doi: 10.1007/s13593-018-0503-9 [online] <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-018-0503-9> - pristup 10.04.2022.
75. Large E.C. (1943). Control of potato blight (*Phytophthora infestans*) by spraying with suspensions of metallic copper. *Nature*. 151: 80-81.
76. Leadbeater A. (2015). Recent Developments and Challenges in Chemical Disease Control. *Plant Protection Science*. 51: 163-169. doi: 10.17221/83/2015-PPS [online] https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/83_2015-PPS.pdf - pristup 12.05.2022.
77. Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 1650–1662.
78. Lontie R. (1984). *Copper Proteins and Copper Enzymes*. Boca Raton, FL: CRC Press.

79. Lopez-Rubio A., Gavara R., Lagaron J.M. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*. 17: 567-575.
80. Khan M.F.R., Hakk P.C. (2015). Efficacy of Fungicides for Controlling *Cercospora* Leaf Spot on Sugarbeet. *2014 Sugarbeet Resources and Reports*. 45: 126-129.
81. Kühn H. (1997). Verdigris in Copper Resinate. In: *Artists' Pigments: A Handbook of Their History and Characteristics Interaction with Art and Antiquities*. Ashok R. (Ed.). University Press, ISBN 0894682601, Oxford, England. pp.131-158.
82. MacBean C. (2016). *The Pesticide Manual*. 16th ed. British Crop Protection Council, Hampshire, UK.
83. Maceljiski M., Cvjetković B., Ostojić Z., Barić B. (2006). Štetočinje vinove loze. Zrinski d.d., Čakovec.
84. Mackie K.A., Müller T., Kandeler E. (2012). Remediation of copper in vineyards – a mini review. *Environmental Pollution*. 167: 16–26.
85. Malafaya B.M., Silva A.G., Reis R.L (2007). Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59: 207–233.
86. Mantovi P. (2003). Rischi di accumulo del rame nei terreni. *L'Informatore Agrario*. 59: 67–72.
87. Marschner H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic, San Diego.
88. Matković K. (2016). Analiza primjene fungicida i insekticida u Osječko-baranjskoj županiji. Specijalistički rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. <https://core.ac.uk/download/pdf/199865688.pdf> - pristup 04.05.2022.
89. McBride M., Tiller K., Merry R. (1981). *Copper in Soils and Plants*. Academic Press, Sydney.
90. Mickelson H., Nielsen J. (2015). EFFICACY OF EBDC AND COPPER FUNGICIDES FOR CONTROL OF *CERCOSPORA BETICOLA* IN SUGARBEET. University of Minnesota, Northwest Research and Outreach Center, Crookston, MN. <https://www.sbreb.org/wp-content/uploads/2018/02/EBDCCercosporaMichelson2015.pdf> - pristup 18.05.2022.

91. Millardet A. (1886). Traitement du mildiou et du rot par le mélange de chaux et sulfate de cuivre. Masson, Feretetfils, Paris.
92. Miotto A., Ceretta C.A., Brunetto G., Nicoloso F.T., Girotto E., Farias J.G., Tiecher T.L., De Conti L., Trentin G. (2014). Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant Soil*. 374: 593–610.
93. Mišić J. (2017). Predformulacijska ispitivanja u razvoju alginatnih mikročestica pripremljenih metodom sušenja raspršivanjem. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.
94. Morton V., Staub T. (2008). A short history of fungicides. APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308 [online] <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx> - pristup 17.05.2022.
95. Murillo-Álvarez J.I., Hernández-Carmona G. (2007). Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico. *Journal of Applied Phycology*. 19: 545-548.
96. NAS (National Academy of Sciences) (1977). Copper. Committee on Medical and Biologic effects of environmental pollutants. National Research Council. National Academy of Science, Washington D.C. p.124.
97. Oxley J. (2015). Microencapsulation: Guide to industrial applications. U: Bioencapsulation innovations. Bioencapsulation Research Group. pp.16-17.
98. Parke J.L., Lewis C. (2007). Root and stem infection of *Rhododendron* from potting medium infested with *Phytophthora ramorum*. *Plant Disease*. 91: 1265-1270.
99. Parke J.L., Oh E., Voelker S., Hansen E.M., Buckles G., Lachenbruch B. (2007). *Phytophthora ramorum* colonizes tanoak xylem and is associated with reduced stem water transport. *Phytopathology*. 97(12): 1558-1567.
100. PD Nederland (2003). *Phytophthora ramorum* in Amerikaanse eik. Persmededeling Plantenziektenkundige Dienst. Wageningen: Plantenziektenkundige Dienst.
101. Park K., Sharaby W.S.W., Park H. (1993). Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery. Technomic Publishing, Lancaster P.A. pp.99-140.

102. Perinović Jozić S., Sesar A., Grubac Z., Andričić B. (2020). Utjecaj natrijeva alginata na svojstva poli(etilen-oksida) kao matrice za pripravu čvrstih polimernih elektrolita. *Kemija u industriji*. 69: 503-514.
103. Pethybridge S.J., Sharma S., Hansen Z.R., Vaghefi N., Hanson L.E., Kikkert J.R. (2019). Improving fungicide-based management of *Cercospora* leaf spot in table beet in New York, USA. *Canadian Journal of Plant Pathology*. Vol. 42, No. 3.
104. Pethybridge S.J., Sharma S., Hansen Z., Kikkert J.R., Olmstead D.L., Hanson L.E. (2020). Optimizing *Cercospora* Leaf Spot Control in Table Beet Using Action Thresholds and Disease Forecasting. *Plant Disease*. 104(6): 1831-1840. doi: 10.1094/PDIS-02-20-0246-RE [online] <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-02-20-0246-RE> - pristup 14.05.2022.
105. Racovită Ş., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009). Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie*. 54(9): 709–718.
106. Rizzo D.M., Garbelotto M., Davidson J.M., Slaughter G.W., Koike S.T. (2002). *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease*. 86: 205-214.
107. Rolando C., Somchit C., Bader M. K-F., Fraser S., Williams N. (2019). Can Copper Be Used to Treat Foliar *Phytophthora* Infections in *Pinus radiata*? *Plant Disease*. Vol. 103, No. 8. doi: 10.1094/PDIS-07-18-1247-RE [online] <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-07-18-1247-RE> – pristup 20.05.2022.
108. Rossi V., Racca P., Giosué S. (1995). Geophytopathological analysis of *Cercospora* leaf spot on sugar beet in the Mediterranean area. *Phytopathologia Mediterranea*. 34(2): 69-82.
109. Rusjan D. (2012). Copper in Horticulture. doi: 10.5772/26964 [online] https://www.researchgate.net/publication/221922217_Copper_in_Horticulture - pristup 30.04.2022.
110. Saitoh Y., Izumitsu K., Tanaka C. (2009). Phylogenetic analysis of heavy-metal ATPases in fungi and characterization of the copper-transporting ATPase of *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*. 113: 737–745.

111. Sansford C.E., Woodhall J. (2007). Datasheet for *Phytophthora ramorum*. Forest Research.
https://www.mattilsynet.no/planter_og_dyrking/planteskadegiorere/soppsjukdommer/ramorum_greinvisning_phytophthora_ramorum/defra_uk_risikovurdering_av_phytophthora_ramorum.7565/binary/DEFRA%20UK%20-%20Risikovurdering%20av%20Phytophthora%20ramorum – pristup 09.05.2022.
112. Secor G.A., Rivera V., Bolton M., Khan M.F.R. (2015). Sensitivity of *Cercospora beticola* to foliar fungicides in 2014. 2014 Sugarbeet Resources and Reports. 45: 130-137.
113. Singh M.N., Hemant K.S.Y., Ram M., Shivakumar H.G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. Journal of Research in Pharmaceutical Sciences. 5(2): 65–77.
114. Stazić L. (2017). Fitopatogene gljive. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju.
<https://repozitorij.biologija.unios.hr/islandora/object/bioos%3A230/datastream/PDF/view> - pristup 14.04.2022.
115. Steinbrenner U., Bratz M. (2015). Challenges for microencapsulated formulations in agriculture. U: Bioencapsulation innovations. Bioencapsulation Research Group. pp.14-15.
116. Teixeira da Silva P., Martins Fries L.L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C.L., Wigmann É.F., De Oliveira Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. Ciência Rural.
117. Tomić Ž., Vukadin A., Levatić B. (2010). Prvi nalazi *Phytophthora ramorum* S. Werres, A.W.A.M. de Cock & W.A. Man in't Veld – u Hrvatskoj. Glasilo biljne zaštite br. 5/2010.
118. Tomić Ž., Vukadin A. (2011). Venuće i sušenje drvenastog bilja – *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock & Man in 't Veld. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu – Zavod za zaštitu bilja.
119. Torres K.C., Johnson M.L. (2001). Bioaccumulation of metals in plants, arthropods, and mice at a seasonal wetland. Environmental Toxicology and Chemistry. 20: 2617–2626.

120. USDA-APHIS (2007). *Phytophthora ramorum*; quarantine and regulation. Federal Register. 72(38): 8585–604.
121. Usmiati S., Richana N., Mangunwidjaja D., Noor E., Prangdimurti E. (2014). The Using of Ionic Gelation Method Based on Polysaccharides for Encapsulating the Macromolecules– A Review. International Conference on Food Security and Nutrition. 67: 79-84.
122. Vaghefi N., Hay F.S., Kikkert J.R., Pethybridge S.J. (2016). Genotypic diversity and resistance to azoxystrobin of *Cercospora beticola* on processing table beet in New York. Plant Disease. 100: 1466-1473.
123. Wagner S., Kaminski K., Werres S. (2007). Evaluation of fungicides for control of *Phytophthora ramorum*. Sudden Oak Death Science Symposium III, Santa Rosa, California, 5.-9. March 2007.
124. Webber J.F., Mullet M., Brasier C.M. (2010). Dieback and mortality of plantation Japanese larch (*Larix kaempferi*) associated with infection by *Phytophthora ramorum*. New Disease Reports. 22: 19.
125. Weiland J., Koch G. (2004.). Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). Molecular Plant Pathology. 5(3): 157-166.
126. Werres S., Marwitz R. (1997). Triebsterben an rhododendron: unbekante *Phytophthora*. Deutscher Gartenbau. 21: 1166-1168.
127. Werres S., Marwitz R., Man in 't Veld W.A., De Cock A.W., Bonants P.J.M., De Weerd M., Themann K., Ilieva E., Baayen R.P. (2001). *Phytophthora ramorum* sp. nov.: a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. Mycological Research. 105(10): 1155-1165.
128. Williams L.E., Pittman J.K., Hall J.L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. Biochimica et Biophysica Acta. 1465: 104–126.
129. Xiong Z.T., Wang H. (2005). Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). Environmental toxicology. 20: 188–194.
130. Yruela I. (2005). Copper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17: 145–156.

Životopis

Laura Hazler rođena je 10.09.1996. godine u Anterwpenu u Belgiji.

Pohađala je Osnovnu školu Pirovac od 2003. do 2011. godine, osnovnu Glazbenu školu Ivana Lukačića od 2005. do 2011. godine u Šibeniku te Medicinsku školu u Šibeniku, smjer farmaceutski tehničar, od 2011. do 2015. godine. Upisala je 2015. godine preddiplomski studij Biljne Znanosti na Agronomskom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu, koji je završila 2019. godine, a zatim je nastavila školovanje na diplomskom studiju Biljne Znanosti.

Uz Hrvatski jezik, razumije (B2), govori(B1) i piše (B1) engleski jezik.

Poznaje osnove rada na računalu te rad u MS Office-u. Svira klarinet u Puhačkom orkestru Pirovac od 2006. godine te u Puhačkom orkestru Željezničar od 2019. godine. Laura Hazler je 2016. godine postala članica udruge IAAS Hrvatska – Hrvatskog udruženja studenata agronomije i srodnih znanosti, te je 2019. godine imenovana potpredsjednicom za projekte u udruzi. Aktivno je sudjelovala u organizacijama i provedbi brojnih projekata.