

# Baktericidni i fungicidni učinak fenilboronske kiseline na patogene u uzgoju rajčice

---

**Martinko, Katarina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**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:204:533644>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-28**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

Katarina Martinko

**BAKTERICIDNI I FUNGICIDNI UČINAK  
FENILBORONSKE KISELINE NA  
PATOGENE U UZGOJU RAJČICE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB FACULTY OF AGRICULTURE

Katarina Martinko

**ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL  
ACTIVITY OF PHENYLBORONIC ACID  
ON TOMATO PLANT PATHOGENS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

Katarina Martinko

**BAKTERICIDNI I FUNGICIDNI UČINAK  
FENILBORONSKE KISELINE NA  
PATOGENE U UZGOJU RAJČICE**

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Edyta Đermić  
dr. sc. Damir Đermić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB FACULTY OF AGRICULTURE

Katarina Martinko

**ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL  
ACTIVITY OF PHENYLBORONIC ACID  
ON TOMATO PLANT PATHOGENS**

DOCTORAL THESIS

Ph.D. Edyta Đermić, Full Professor  
Ph.D. Damir Đermić, Senior Research Associate

Zagreb, 2022

## BIBLIOGRAFSKI PODACI

- Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: Poljoprivreda (agronomija)
- Znanstvena grana: Fitomedicina
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
- Voditelji doktorskog rada: prof. dr. sc. Edyta Đermić redoviti profesor i dr. sc. Damir Đermić, viši znanstveni suradnik
- Broj stranica:
- Broj tablica:
- Broj slika:
- Broj tablica:
- Broj priloga:
- Broj literaturnih referenci:
- Datum obrane doktorskog rada:
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada: doc. dr. sc. Joško Kaliterna, izv. prof. dr. sc. Božidar Benko, izv. prof. dr. sc. Boris Lazarević, izv. prof. dr. sc. Marko Vinčeković i dr. sc. Siniša Ivanković

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p 550, 10 000 Zagreb, Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 29.09.2020. te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 08.12.2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA O IZVORNOSTI**

Ja, **Katarina Martinko**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod naslovom:

**BAKTERICIDNI I FUNGICIDNI UČINAK FENILBORONSKE KISELINE NA PATOGENE  
U UZGOJU RAJČICE**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga doktorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristila drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

Zagreb, 24. 4. '22. godine

*Katarina Martinko*

---

**Potpis doktorandice**

# OCJENA DOKTORSKOG RADA

Datum obrane doktorskog rada:

Članovi Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

doc. dr. sc. Joško Kaliterna

*Kaliterna*

izv. prof. dr. sc. Božidar Benko

*Benko*

izv. prof. dr. sc. Boris Lazarević

*Boris Lazarević*

izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković

*Marko Vinceković*

dr. sc. Siniša Ivanković, znanstveni savjetnik

*Siniša Ivanković*



# INFORMACIJE O MENTORIMA

## Mentor: prof. dr. sc. Edyta Đermić

Datum i mjesto rođenja: 19. srpnja 1972. Bjelovar, Hrvatska

Matični broj znanstvenika: **225544**

**2019.** Redoviti profesor, Sveučilište u Zagrebu (SuZg) Agronomski fakultet (znanstveno područje - Biotehničke znanosti, polje - Poljoprivreda (agronomija), grana - Fitomedicina)

**2013.-2019.** Izvanredni profesor, SuZg Agronomski fakultet;

**2009.-2015.** Predstojnik Zavoda za fitopatologiju, SuZg Agronomski fakultet

**2008.-2013.** Docent, SuZg Agronomski fakultet

**2007.** Doktor znanosti - SuZg Agronomski fakultet (znanstveno područje - Biotehničke znanosti, polje – Poljoprivreda (agronomija), grana - Fitomedicina)

**2002.** Magistar znanosti - Sveučilišni znanstveni poslijediplomski studij na SuZg Agronomskom fakultetu (znanstveno područje - Biotehničke znanosti, polje – Poljoprivreda (agronomija), grana - Fitomedicina)

**Od 1997.** Sudjelovanje u izvođenju nastave na dodiplomskim, preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima na SuZg Agronomskom fakultetu

**1997.** Dipl. ing. biol. – SuZg Prirodoslovno-matematički fakultet, studij Biologije (inženjerski profil, usmjerenje Molekularna biologija)

**Mentorstva:** 2 doktorska rada; 40 diplomskih/završnih radova; član povjerenstva u obrani više diplomskih/završnih i doktorskih radova kao i njihovih ocjena tema, voditeljica više studentskih stručnih projekata i praksi te studentskih vannastavnih aktivnosti.

**Znanstveni interesi:** istraživanje patogenih i benefitnih celularnih i acelularnih mikroorganizama – njihova dijagnostika, diverzitet, fiziologija, epidemiologija, genomika i strategije suzbijanja

**Projekti:** "Prirodni bioaktivni spojevi kao izvor potencijalnih antimikrobnih tvari u suzbijanju bakterijskih i drugih gljivičnih patogena masline" (HRZZ); "EuroXanth: Integrating science on *Xanthomonadaceae* for integrated plant disease management in Europe" (COST-EU); "Regulacija popravka dvolančanog loma u genomu bakterije *Escherichia coli* (HRZZ); "Science and Innovation Investment Fund TT-IPM FoAZ–Enhancement and collaboration between science, industry and farmers: Technology transfer for integrated pest management (IPM) in sugarbeet as the way to improve farmer's income and reduce pesticide use" (IPAllc-EU); "International joint Master degree in Plant Medicine" (TEMPUS-EU); "Identifikacija fitopatogena molekularnim i drugim metodama" (MZOŠ RH); „Gospodarske karakteristike nekih kultivara jabuke otpornih na bakterijsku palež (*Erwinia amylovora*)" (VIP-MPŠVG RH)...

**Skupovi:** znanstveni međunarodni (19) i nacionalni (17); mnogi stručni skupovi u RH i inozemstvu

**Radovi:** stručni i znanstveni (od toga 21 unutar *Web of Science Core Collection*)

**Članstva:** Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatsko mikrobiološko društvo, *American phytopathological society* (APS), *International working group on fire blight* (IWGFB), *International working group on plant viruses with fungal vectors* (IWGPVfV)

## Mentor: dr. sc. Damir Đermić, viši znanstveni suradnik

Datum i mjesto rođenja: 3. listopada 1970. Osijek, Hrvatska

Matični broj znanstvenika: **227052**

**2015.** Izabran u znanstveno zvanje Viši znanstveni suradnik (znanstveno područje - Prirodne znanosti, polje – Biologija, grana – Molekularna biologija i biokemija)

**2008.-2022.** Znanstveni suradnik u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta "Ruđer Bošković", Zagreb

**2006.** Izabran u znanstveno zvanje Znanstveni suradnik (znanstveno područje - Prirodne znanosti, polje – Biologija, grana – Molekularna biologija i biokemija)

**2003.** Doktor znanosti – Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet (znanstveno područje - Prirodne znanosti, polje – Biologija, grana – Molekularna biologija i biokemija)

**1998.** Magistar znanosti - Sveučilišni znanstveni poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (znanstveno područje – Prirodne znanosti, polje – Biologija, grana – Molekularna biologija i biokemija)

**1996.-2008.** Znanstveni novak u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta "Ruđer Bošković", Zagreb

**1995.** Dipl. ing. biol. - Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij Biologije (inženjerski profil, usmjerenje Molekularna biologija)

**Mentorstva:** 4 diplomatska rada (SuZg Farmaceutsko-biokemijski fakultet i SuZg Agronomski fakultet); član povjerenstva u obrani više završnih, diplomskih i doktorskih radova, kao i njihovih ocjena tema, neposredni voditelj više studentskih praksi.

**Znanstveni interesi:** Istraživanje oštećenja i popravka DNA, održavanja stabilnosti genoma i mehanizama genetičke rekombinacije, utjecaj popravka DNA na nastanak raka, utjecaj faktora okoliša na genome patogenih i korisnih mikroorganizama i strategije suzbijanja mikroorganizama.

### Projekti:

**Voditelj:** "Regulacija popravka dvolančanog loma u genomu bakterije *Escherichia coli*" (HRZZ, IP-2019-04-3790); „Istraživanje protutumorskih i antimikrobnih učinaka vodenih iscrpina graba (*Carpinus betulus*) i američke platane (*Platanus occidentalis*)“ (Hrvatski Institut za Eksperimentalnu i Translacijsku Onkologiju, 003-2018).

**Suradnik:** "EuroXanth: Integrating science on *Xanthomonadaceae* for integrated plant disease management in Europe" (COST-EU); „Rekombinacija, popravak DNA i očuvanje integriteta genoma: novi putevi“ (IP-2013-11-2978); "Molekularni mehanizmi rekombinacije i popravka DNA" (MZOŠ 098-0982913-2862)...

**Skupovi:** međunarodni (6) i nacionalni (9) znanstveni i stručni skupovi u RH i inozemstvu

**Radovi:** stručni i znanstveni (od toga 22 unutar *Web of Science Core Collection*)

**Članstva:** Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatsko mikrobiološko društvo, Hrvatsko genetičko društvo

# ZAHVALA

*Hvala svima onima koji su me podržavali na ovom putu, a još više hvala onima koji me u tome na bilo koje načine, nisu podržali. Zbog prvih se osjećam snažnom i ispunjenom, a zbog drugih znam da sam učinila pravu stvar.*

*Hvala Vam!*

## SAŽETAK

Pronalaženje prikladne alternative malom broju postojećih antimikrobnih sredstava za suzbijanje biljnih patogena, vitalan je zadatak u suvremenoj poljoprivredi. U tu svrhu se provode intenzivna istraživanja kako bi se otkrili ekološki prihvatljivi i učinkoviti spojevi koji mogu suzbiti patogene otporne na primjenjivane antimikrobne aktivne tvari. Učinkovitost fenilboronske kiseline (PBA) protiv nekoliko fitopatogenih bazidiomicetnih vrsta u smislu zaštite drvene građe, poznata je od ranije, ali do sada nije testirana u suzbijanju uzročnika bolesti poljoprivrednih kultura. Cilj disertacije je testirati antibakterijski i antimikotički učinak PBA na patogene u uzgoju rajčice i kontaminantnog patogena svježih plodova rajčice u uvjetima *in vitro* i *in vivo*. Dobiveni rezultati potvrđuju letalan učinak PBA na fitopatogenu gljivu *Alternaria alternata* i bakteriju *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* pri niskoj koncentraciji (0,05 %) u uvjetima *in vitro*. U usporedbi s tim, borna kiselina (BA) je na patogenu gljivu imala fungistatički učinak, dok je rast bakterijskih patogena inhibiran pri 6 puta većoj koncentraciji od primijenjene koncentracije PBA.

Bakterija *Escherichia coli* je ispirana s plodova rajčice otopinama PBA i BA, a otopine nakon ispiranja su nanošene na hranjive podloge odmah ili 120 min kasnije. Broj razvijenih kolonija na mediju s 0,05 % (1/2 MIC) PBA bio je oko 40 % manji u odnosu na kontrolu (ispranje sterilnom destiliranom vodom), a taj broj se 2,5 puta smanjio nakon inkubacije u trajanju od 120 min. Podjednako smanjenje broja živih stanica bakterije postignuto je s 3 puta većom koncentracijom BA.

Preventivnim tretiranjem biljaka rajčice cv. Rutgers s 0,05 % (1 MIC) PBA, provedenom 7 dana prije inokulacije gljivom *Alternaria alternata* ili bakterijom *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, zabilježeno je značajno smanjenje površine lezija koncentrične pjegavosti (za 42 – 61 %) i bakterijske pjegavosti (za 55 - 71 %) u odnosu na kontrolnu skupinu biljaka koje nisu preventivno tretirane. Niska koncentracija PBA značajno je reducirala simptome koncentrične i bakterijske pjegavosti u odnosu na učinak BA, pri čemu značajne razlike u učinku na fiziologiju zaraženih biljaka tretiranih s PBA, odnosno s BA, nisu zabilježene. Dokazana je profilaktička aktivnost PBA i BA na uzročnike bolesti rajčice, pri čemu je PBA pokazala značajniji učinak na supresiju simptoma bolesti rajčice od BA. Također, dokazano je da PBA, kao i BA, nemaju štetan utjecaj na zdravlje biljaka u baktericidnim i fungicidnim koncentracijama.

Ova disertacija je prvo istraživanje antibakterijskog i antimikotičkog učinka PBA na uzročnike bolesti zeljaste domaćinske biljke, a testiranje je provedeno usporedno s istraživanjem učinka medicinski značajne BA. Ostvarenjem ciljeva i prihvaćanjem hipoteza disertacije, postignut je preduvjet za nastavak istraživanja PBA kao potencijalnog sredstva za suzbijanje ekonomski značajne fitopatogene bakterije i gljive u uzgoju rajčice, ali i za razmatranje PBA kao potencijalnog dekontaminanta svježih plodova rajčice od patogene bakterije *Escherichia coli*. Budući da nije štetna za zrele biljke rajčice, kao ni za sisavce, a otpornost na testiranu fitopatogenu gljivu i bakteriju nije zamijećena, navedene spoznaje kvalificiraju ekološki prihvatljivu PBA kao prikladan antimikrobni spoj.

**Ključne riječi:** *Alternaria alternata*, BA, *Escherichia coli*, PBA, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, rajčica, učinak

## Antibacterial and antifungal activity of phenylboronic acid on tomato plant pathogens

Finding a suitable alternative to the limited number of existing antifungal agents aimed to control plant pathogens is a vital task in modern agriculture. Therefore, intensive research is being conducted to identify environmentally friendly and effective compounds that can control plant pathogens resistant to the antimicrobials used. Various studies cite phenylboronic acid (PBA) as a commercially available, environmentally and pharmaceutically acceptable compound known as the simplest boric acid (BA) derivative that in certain concentrations has bactericidal and fungicidal effects on several species of human fungi and bacteria. Previous studies demonstrate antifungal effect of PBA on basidiomycete fungi that cause wood decay, but it has not been tested in controlling plant pathogens in agriculture. This fact puts PBA in the context of a potential plant protection compound and explains the need for research on agriculturally interesting herbaceous host pathogens. Because tomato is globally one of the most famous crops whose cultivation is hampered by damage caused by attack of resistant pathogens, it was selected as the herbaceous host on which the bactericidal and fungicidal effect of PBA was investigated in this research. For testing this compound, the economically important pathogens, after isolation from symptomatic tomato leaves, were molecularly identified and morphologically characterized.

The aim of the dissertation is to test, *in vitro* and *in vivo*, the antibacterial and antifungal effect of PBA and BA on two tomato pathogens (fungus *Alternaria alternata* and bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*). The obtained results confirm the lethal effect of PBA on the fungus *A. alternata* and the bacterium *P. syringae* pv. *tomato* at low concentration (0.05 %) *in vitro*. In comparison, BA had a fungistatic effect on the pathogenic fungus, while the growth of bacterial pathogen was inhibited at 6 times higher concentration of BA than that of the applied PBA.

The severity of symptoms caused by infection of economically important tomato plant pathogens was determined experimentally alongside with quantification of physiological parameters of treated plants. Also, it has been shown that PBA, like BA, does not have a detrimental effect on plant health in bactericidal or fungicidal concentrations when applied in the late phenophase of development. By preventive *in vivo* application on tomato cv. Rutgers 7 days before inoculation with fungus *A. alternata* or *P. syringae* pv. *tomato*, low PBA concentration (0,05 %, 1 MIC) significantly reduced the symptoms of early blight (42 - 61 %) and bacterial speck (55 – 71 %) compared to the control group of plants that were not treated. Prophylactic activity of PBA and BA on tomato pathogens has been demonstrated, with PBA showing a stronger effect on the suppression of tomato disease symptoms than BA.

In addition to economically important phytopathogens in tomato growing (*A. alternata* and *P. syringae* pv. *tomato*), the negative aspect in tomato production is caused by the human pathogen - bacterium *Escherichia coli*, which contaminates fruits through manuring and irrigation with contaminated water. The bactericidal effect of PBA on *E. coli* washed off from tomato fruits was investigated by the *in vitro* experiment. *E. coli* was washed off from tomato fruits with PBA and BA solutions and these bacterial suspensions were transferred to nutrient media immediately or 120 min later. Inactivation of *E. coli* from tomato fruits (97 %) was achieved by 120 min exposition of the bacterium to 0,05 % PBA (1/2 MIC) solution is equivalent to the effect of 3-time higher concentrations of BA. The number of bacteria that developed colonies in 0,05 % (1/2 MIC) PBA was about 40 % lower compared to the control, washed with water, and this number decreased 2,5 times after incubation for 120 min.

This dissertation is the first study of the bactericidal and fungicidal effect of PBA on pathogens of herbaceous host plant. By achieving the goals and accepting the hypotheses

of dissertation, the precondition for continuing research on PBA as a potential plant protection compound for the control of economically important plant pathogenic bacterium and fungus in tomato was achieved, as well as for considering PBA as a potential decontaminant of fresh tomato fruits from human pathogen – bacterium *E. coli*. Since PBA is not harmful to mature tomato plants and mammals, and no resistance of plant pathogenic fungi and bacteria has been observed, the mentioned findings effectively qualify PBA as a suitable antimicrobial compound. Additional advance of PBA is its environmental friendliness.

**Keywords:** *Alternaria alternata*, BA, *Escherichia coli*, PBA, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, tomato, effect

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja .....	4
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	5
2.1. Rajčica <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	5
2.2. Problematika suzbijanja biljnih patogena .....	6
2.3. Uzročnici bolesti rajčice .....	7
2.3.1. Rod <i>Alternaria</i> .....	8
2.3.1.1. Vrsta <i>Alternaria alternata</i> .....	8
2.3.1.2. Taksonomija roda <i>Alternaria</i> .....	9
2.3.1.3. Morfološke karakteristike roda <i>Alternaria</i> .....	10
2.3.1.4. Simptomatologija roda <i>Alternaria</i> .....	11
2.3.1.5. Biologija i epidemiologija roda <i>Alternaria</i> .....	12
2.3.1.6. Suzbijanje roda <i>Alternaria</i> .....	12
2.3.2. Rod <i>Pseudomonas</i> .....	14
2.3.2.1. Vrsta <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	14
2.3.2.2. Taksonomija roda <i>Pseudomonas</i> .....	15
2.3.2.3. Morfološke karakteristike roda <i>Pseudomonas</i> .....	15
2.3.2.4. Simptomatologija roda <i>Pseudomonas</i> .....	16
2.3.2.5. Biologija i epidemiologija roda <i>Pseudomonas</i> .....	17
2.3.2.6. Suzbijanje roda <i>Pseudomonas</i> .....	18
2.4. Bakterija <i>Escherichia coli</i> – kontaminant plodova rajčice .....	19
2.5. Boronske kiseline.....	21
2.5.1. Fenilboronska kiselina .....	22
2.5.2. Borna kiselina .....	26
3. MATERIJAL I METODE RADA .....	28
3.1. Prikupljanje biljnog materijala .....	28
3.2. Izolacija gljivičnog uzročnika bolesti rajčice.....	28
3.2.1. Morfološka determinacija gljive <i>Alternaria</i> sp. ....	29
3.2.2. Molekularna identifikacije gljive <i>Alternaria</i> sp. ....	29
3.2.2.1. Ekstrakcija DNA vrste <i>Alternaria</i> sp. ....	29
3.2.2.2. PCR amplifikacija DNA odsječaka vrste <i>Alternaria</i> sp. ....	30
3.2.2.3. Vizualizacija PCR produkata vrste <i>Alternaria</i> sp. ....	31
3.2.2.4. Analiza sekvenci vrste <i>Alternaria</i> sp. ....	31

3.3.	Izolacija bakterioznog uzročnika bolesti rajčice .....	32
3.3.1.	Morfološka determinacija bakterije <i>Pseudomonas</i> sp. ....	33
3.3.2.	Molekularna identifikacije bakterije <i>Pseudomonas</i> sp. ....	34
3.3.2.1.	Ekstrakcija DNA vrste <i>Pseudomonas</i> sp. ....	34
3.3.2.2.	PCR amplifikacija DNA odsječaka vrste <i>Pseudomonas</i> sp. ....	35
3.3.2.3.	Vizualizacija PCR produkata vrste <i>Pseudomonas</i> sp. ....	35
3.3.2.4.	Analiza sekvenci vrste <i>Pseudomonas</i> sp. ....	36
3.4.	Sjetva i uzgoj biljaka domaćina .....	37
3.5.	Pokusi <i>in vitro</i> .....	38
3.5.1.	<i>Poisoned food</i> metoda .....	38
3.5.1.1.	Priprema inokuluma izolata .....	38
3.5.1.2.	Priprema raspona koncentracija kiselina .....	39
3.5.1.3.	Postavljanje pokusa i način očitavanja rezultata .....	39
3.5.2.	Metoda inaktivacija kontaminirajuće bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem plodova rajčice .....	40
3.5.2.1.	Priprema suspenzije izolata .....	40
3.5.2.2.	Priprema raspona koncentracija kiselina .....	41
3.5.2.3.	Postavljanje pokusa i način očitavanja rezultata .....	41
3.6.	Pokus <i>in vivo</i> .....	43
3.6.1.	Priprema suspenzije izolata .....	43
3.6.2.	Priprema raspona koncentracija kiselina .....	43
3.6.3.	Postavljanje pokusa i način očitavanja rezultata .....	44
3.7.	Kochovi postulati .....	47
3.8.	Statistička analiza podataka .....	47
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....	48
4.1.	Rezultati determinacije patogena .....	48
4.1.1.	Rezultati morfološke determinacije gljive <i>Alternaria</i> sp. ....	48
4.1.2.	Rezultati molekularne identifikacije gljive <i>Alternaria</i> sp. ....	51
4.1.3.	Rezultati morfološke determinacije bakterije <i>Pseudomonas</i> sp. ....	52
4.1.4.	Rezultati molekularne identifikacije bakterije <i>Pseudomonas</i> sp. ....	54
4.2.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije borne i fenilboronske kiseline u uvjetima <i>in vitro</i> .....	55
4.2.1.	Antimikotički učinak borne kiseline na rast patogena <i>Alternaria alternata</i> ...	55
4.2.2.	Antimikotički učinak fenilboronske kiseline na rast patogena <i>Alternaria alternata</i> .....	56
4.2.3.	Antibakterijski učinak borne kiseline na broj kolonija patogena <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	57



4.2.4.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na broj kolonija patogena <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	58
4.2.5.	Antibakterijski učinak borne kiseline na veličinu kolonija patogena <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	59
4.2.6.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na veličinu kolonija patogena <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	60
4.2.7.	Antibakterijski učinak borne kiseline na broj kolonija bakterije <i>E. coli</i> .....	61
4.2.8.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na broj kolonija bakterije <i>E. coli</i> .....	62
4.2.9.	Antibakterijski učinak borne kiseline na veličinu kolonija bakterije <i>E. coli</i> ....	63
4.2.10.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na veličinu kolonija bakterije <i>E. coli</i> .....	64
4.3.	Metoda inhibicije bakterije <i>E. coli</i> ispiranjem s plodova rajčice u uvjetima <i>in vitro</i> .....	65
4.3.1.	Učinak borne kiseline na broj kolonija bakterije <i>E. coli</i> ispiranjem s plodova rajčice.....	65
4.3.2.	Učinak fenilboronske kiseline na broj kolonija bakterije <i>E. coli</i> ispiranjem s plodova rajčice.....	67
4.3.3.	Učinak borne kiseline na veličinu kolonija bakterije <i>E. coli</i> ispiranjem s plodova rajčice.....	71
4.3.4.	Učinak fenilboronske kiseline na veličinu kolonija bakterije <i>E. coli</i> ispiranjem s plodova rajčice .....	73
4.4.	Pokus na rajčici <i>in vivo</i> .....	76
4.4.1.	Učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice .....	76
4.4.1.	Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice .....	77
4.4.2.	Učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice .....	78
4.4.3.	Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice .....	79
4.4.1.	Učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice .....	82
4.4.1.	Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice .....	83
4.4.2.	Učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode).....	84
4.4.3.	Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice .....	85

4.4.4.	Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice.....	88
4.4.5.	Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice .....	89
4.4.6.	Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice .....	91
4.4.7.	Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice .....	92
4.4.8.	Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice .....	95
4.4.1.	Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice .....	96
4.4.2.	Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>A. alternata</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice .....	98
4.4.3.	Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive na <i>A. alternata</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice .....	99
4.4.4.	Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice .....	102
4.4.5.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice .....	103
4.4.6.	Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice.....	105
4.4.7.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice.....	106
4.4.8.	Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice .....	110
4.4.9.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na jačinu simptoma bolesti rajčice .....	111
4.4.10.	Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice.....	113
4.4.11.	Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) na multispektralne parametre lista rajčice.....	114
4.5.	Rezultati Kochovih postulata.....	118
5.	RASPRAVA .....	119
5.1.	Pokus <i>in vitro</i> - Metoda <i>poisoned food</i> .....	119
5.2.	Pokus <i>in vitro</i> - Metoda inaktivacija kontaminirajuće bakterije <i>E. coli</i> ispiranjem plodova rajčice .....	121
5.3.	Pokus <i>in vivo</i> na rajčici .....	123

6. ZAKLJUČCI .....	128
7. POPIS LITERATURE.....	130
ŽIVOTOPIS .....	150
PRILOZI.....	152

## POPIS KRATICA

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , analiza varijance
Alt.	<i>Alternaria alternata</i>
ARI	<i>Anthocyanin indeks</i> , sadržaj antocijanina
μl	<i>microliter</i> , mikrolitar
μm	<i>micrometer</i> , mikrometar
BA	<i>Boric acid</i> , borna kiselina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base pair</i> , par baza
CFU	<i>Colony forming unit</i> , jedinica za stvaranje kolonija
CHI	<i>Chlorophyll indeks</i> , sadržaj klorofila
cm	<i>centimeter</i> , centimetar
cm <sup>2</sup>	<i>square centimeter</i> , kvadratni centimetar
CTAB	<i>Centrimonium bromide</i> , centrimonijev bromid
cv.	<i>Cultivar</i> , kultivar
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	<i>Ethanol</i> , etanol
dH <sub>2</sub> O	<i>Distilled water</i> , destilirana voda
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
E.c.	<i>Escherichia coli</i>
g	<i>gram</i> , gram
HUE	<i>Color appearance parameter</i> , parametar pojavnosti boje
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
KB	<i>King B agar</i>
MEA	<i>Malt extract agar</i>
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i> , minimalna inhibitorna koncentracija
ml	<i>milliliter</i> , mililitar
mg/L	<i>milligram per liter</i> , miligram po litri
mm	<i>milimeter</i> , milimetar
NA	<i>Nutrient agar</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIR	<i>Near-infrared reflectance</i> , parametar blizu infracrvenog zračenja
NSA	<i>Nutrient sacruose agar</i>
Pst.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PBA	<i>Phenylboronic acid</i> , fenilboronska kiselina

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , lančana reakcija polimeraze
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> , krumpir dekstrozni agar
pv.	<i>Pathovar</i> , patovar
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i> , polivinilpirolidon
sp.	<i>Species</i> , vrsta
TBE	<i>Tris-Borate-EDTA buffer</i>
TE	<i>Tris- EDTA</i>
TJA	<i>Tomato juice agar</i>
Ø	<i>diameter</i> , promjer
%	<i>percentage</i> , postotak

## POPIS TABLICA

Tablica 4.1. Izmjeri morfoloških struktura vrste <i>Alternaria alternata</i> .....	48
Tablica 4.2. Morfološke karakteristike micelnog rasta i razvoja vrste <i>Alternaria alternata</i> na različitim hranjivim podlogama. ....	49
Tablica 4.3. Antimikotički učinak različitih koncentracija BA na površinu micelija patogena <i>Alternaria alternata</i> nakon 5 dana. ....	55
Tablica 4.4. Antimikotički učinak različitih koncentracija PBA na površinu micelija patogena <i>Alternaria alternata</i> nakon 5 dana. ....	56
Tablica 4.5. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na broj kolonija patogena <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> nakon 72 sata.....	57
Tablica 4.6. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na broj kolonija <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> nakon 72 sata.....	58
Tablica 4.7. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na površinu kolonija <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> nakon 72 sata.....	59
Tablica 4.8. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na površinu kolonija <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> nakon 72 sata.....	60
Tablica 4.9. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na broj kolonija <i>Escherichia coli</i> nakon 72 sata. ....	61
Tablica 4.10. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na broj kolonija <i>Escherichia coli</i> nakon 72 sata. ....	62
Tablica 4.11. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na površinu kolonija <i>Escherichia coli</i> nakon 72 sata.....	63
Tablica 4.12. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na površinu kolonija <i>Escherichia coli</i> nakon 72 sata.....	64
Tablica 4.13. Učinak raspona MIC BA na broj kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem s plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem (dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH) nakon 72 sata. ....	65
Tablica 4.14. Učinak raspona MIC BA na broj kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem i 120- minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) nakon 72 sata.....	66
Tablica 4.15. Učinak raspona MIC PBA na broj kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem s plodova rajčice u usporedbi s kontrolnim ispiranjem dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH nakon 72 sata. ....	67
Tablica 4.16. Učinak raspona MIC PBA na broj kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem i 120 minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) nakon 72 sata.....	68

Tablica 4.17. Antibakterijski učinak PBA na broj kolonija patogena <i>Escherichia coli</i> usporedno s kontrolama - BA, dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata.....	69
Tablica 4.18. Antibakterijski učinak PBA na broj kolonija patogena <i>Escherichia coli</i> nakon ispiranja i 120- minutne ekspozicije plodova rajčice usporedno s kontrolama -BA, dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata.....	70
Tablica 4.19. Učinak raspona MIC BA na površinu kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) nakon 72 sata. ....	71
Tablica 4.20. Učinak raspona MIC BA na površinu kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem i ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) nakon 72 sata. ....	72
Tablica 4.21. Učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem s plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) nakon 72 sata. ....	73
Tablica 4.22. Učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem i ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 %) nakon 72 sata.....	74
Tablica 4.23 Antibakterijski učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija patogena <i>Escherichia coli</i> nakon ispiranja plodova rajčice usporedno s BA, dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata. ....	74
Tablica 4.24. Antibakterijski učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija patogena <i>Escherichia coli</i> nakon ispiranja i ekspozicije plodova rajčice usporedno s BA, dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata. ....	75
Tablica 4.25. Učinak MIC BA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na površinu lezija rajčice nakon 14 dana.....	76
Tablica 4.26. Učinak MIC PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na površinu lezija rajčice nakon 14 dana.....	77
Tablica 4.27. Učinak BA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.....	78
Tablica 4.28. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.....	79
Tablica 4.29. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	80
Tablica 4.30. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	80
Tablica 4.31 Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.....	81

Tablica 4.32. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	81
Tablica 4.33. Učinak MIC BA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na površinu lezija rajčice nakon 14 dana. ....	82
Tablica 4.34. Učinak MIC PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na ukupnu površinu lezija rajčice nakon 14 dana. ....	83
Tablica 4.35. Učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ....	84
Tablica 4.36. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ....	85
Tablica 4.37. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	86
Tablica 4.38. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	86
Tablica 4.39. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	87
Tablica 4.40. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	87
Tablica 4.41. Antimikotički učinak MIC BA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na jačinu simptoma na rajčici nakon 14 dana. ....	88
Tablica 4.42. Antimikotički učinak MIC PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na jačinu simptoma na rajčici nakon 14 dana. ....	89
Tablica 4.43. Antimikotički učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na jačinu simptoma na rajčici u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana. ....	90
Tablica 4.44. Učinak BA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ....	91
Tablica 4.45. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ....	92
Tablica 4.46. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O+Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	93
Tablica 4.47. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana. ....	93



Tablica 4.48. Učinak PBA apliciranih 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) nakon 15 dana. ....	94
Tablica 4.49. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) nakon 15 dana. ....	94
Tablica 4.50. Antimikotički učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na jačinu simptoma u usporedbi s kontrolom nakon 14 dana. ....	95
Tablica 4.51. Antimikotički učinak MIC PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na jačinu simptoma nakon 14 dana. ....	96
Tablica 4.52. Antimikotički učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na jačinu simptoma na rajčici u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana. ....	97
Tablica 4.53. Antimikotički učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije <i>Alternaria alternata</i> na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ..	98
Tablica 4.54. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ....	99
Tablica 4.55. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije patogena <i>Alternaria alternata</i> na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	100
Tablica 4.56. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O+Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	100
Tablica 4.57. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	101
Tablica 4.58. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	101
Tablica 4.59. Antibakterijski učinak MIC BA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na jačinu simptoma nakon 14 dana. ....	102
Tablica 4.60. Antibakterijski učinak MIC PBA aplicirane 2 dan prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na jačinu simptoma nakon 14 dana. ....	103
Tablica 4.61. Antibakterijski učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na jačinu simptoma u usporedbi s kontrolom (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana. ....	104
Tablica 4.62. Učinak BA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana. ....	105

Tablica 4.63. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na fiziološke parametre rajčice u usporedbi s kontrolom nakon 15 dana. ....	106
Tablica 4.64. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O+Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	107
Tablica 4.65. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice nakon 15 dana u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	108
Tablica 4.66. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	108
Tablica 4.67. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.....	109
Tablica 4.68. Antibakterijski učinak MIC BA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na jačinu simptoma nakon 14 dana. ....	110
Tablica 4.69. Antibakterijski učinak MIC PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na jačinu simptoma nakon 14 dana. ....	111
Tablica 4.70. Antibakterijski učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na jačinu simptoma u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana.....	112
Tablica 4.71. Učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na fiziološke parametre rajčice u usporedbi s kontrolom nakon 15 dana. ....	113
Tablica 4.72. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na fiziološke parametre rajčice u usporedbi s kontrolom nakon 15 dana. ....	114
Tablica 4.73. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	115
Tablica 4.74. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.....	115
Tablica 4.75. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana. ....	116
Tablica 4.76. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH <sub>2</sub> O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.....	117

## POPIS SLIKA

Slika 2.1 Morfološke karakteristike vrste roda <i>Alternaria</i> ; konidije (A), konidiofori (B) i čista kultura (C) (original). .....	10
Slika 2.2 Simpomi na rajčici koje uzrokuje <i>Alternaria</i> sp. Koncentrične lezije na listovima rajčice (A), (B). Lezije na plodovima rajčice (C) (original). .....	11
Slika 2.3 Morfološke karakteristike kolonije vrste <i>Pseudomonas</i> sp.; čista kultura na hranjivoj podlozi (A). Vizualizacija kulture pod UV svjetlom (B). Izgled kolonija (C) (original). .....	16
Slika 2.4 Simptomi na rajčici koje uzrokuje vrsta roda <i>Pseudomonas</i> ; nekotične pjegave na listovima (A), (B); sušenje cijele biljke (C) (original). .....	17
Slika 3.1 Prikaz provedbe izolacije gljivičnog uzročnika koncentrične pjegavosti rajčice (original). .....	28
Slika 3.2 Prikaz provedbe molekularne identifikacije gljivične vrste <i>Alternaria</i> sp. konvencionalnom PCR metodom (original). .....	31
Slika 3.3 Prikaz provedbe izolacije bakterijskog uzročnika bakterijske pjegavosti rajčice (original). .....	32
Slika 3.4 Prikaz provedbe molekularne identifikacije bakterijske vrste <i>Pseudomonas</i> sp. konvencionalnom PCR metodom (original). .....	36
Slika 3.5 Uzgoj rajčica u plasteniku; sjetva (A); presadnice (B) (original). .....	37
Slika 3.6 Shematski prikaz metode testiranja rajčice <i>in vitro</i> - poisoned food metoda prema Qadoos i sur. (2016) (original). .....	40
Slika 3.7 Prikaz provedbe metode inaktivacije bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem plodova rajčice (original). .....	42
Slika 3.8 Shematski prikaz metode <i>in vitro</i> - Metoda inaktivacija kontaminirajuće bakterije <i>Escherichia coli</i> ispiranjem plodova rajčice prema Zhang i sur. (2019) (original). .....	42
Slika 3.9 Shematski prikaz metode testiranja rajčice <i>in vivo</i> prema Nashwa i Abo- Elyousr (2012) (original). .....	45
Slika 3.10 Očitavanje fizioloških parametara testiranih rajčica; uređaj Cropreporter (A); prikaz analize sadržaja klorofila i antocijanina na zaslonu uređaja Cropreporter (B). 46	
Slika 4.1 Morfološke karakteristike gljive <i>Alternaria alternata</i> – Čista kultura na PDA (A), MEA (B), TJA (C) nakon 5 dana. Konidije vidljive svjetlosnim mikroskopom (D). Prikaz interkalarnе (E) i terminalne (F) hlamidospore svjetlosnim mikroskopom. Konidiofori vidljivi stereomikroskopom (G). .....	50
Slika 4.2 Vizualizacija PCR produkata amplificiranih setom početnica ITS1/ITS2 (1- 4) veličine 205 bp ( ); ITS1/ITS4 (5- 8) veličine 530 bp ( ) za vrstu <i>Alternaria alternata</i> ; M - marker molekularne veličine fragmenata 100, 200, 300, 400, 500 bp; N, negativna kontrola. ....	51

Slika 4.3 Morfološke karakteristike bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> – Čista kultura na KB (A), NA (B), NSA (C) nakon 3 dana. Bakterijske stanice vidljive svjetlosnim mikroskopom (D). Izgled kolonije pod stereomikroskopom na NA (E), NSA (F) i KB (G); KOH test (E). Testiranje fluorescentnog pigmenta kolonije na UV-transiluminatoru (F).....	53
Slika 4.4 Vizualizacija PCR produkata amplificiranih setom Psy početnica prema Guilbaud i sur. (2015) veličine 144 bp ( ) (1-6) za vrstu <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; M - marker molekularne veličine fragmenata 100, 200, 300, 400, 500 bp; N, negativna kontrola.....	54
Slika 4.5 Antimikotički učinak BA na rast i razvoj patogena <i>Alternaria alternata</i> usporedno s kontrolom nakon 5 dana. ....	55
Slika 4.6 Antimikotički učinak PBA na rast i razvoj patogena <i>Alternaria alternata</i> usporedno s kontrolom nakon 5 dana.....	56
Slika 4.7 Antibakterijski učinak BA na broj i površinu kolonija patogena <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> usporedno s kontrolom nakon 72 sata. ....	59
Slika 4.8 Antibakterijski učinak PBA na broj i površinu kolonija patogena <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> usporedno s kontrolom nakon 72 sata. ....	60
Slika 4.9 Antibakterijski učinak BA na broj i površinu kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> u odnosu na kontrolu nakon 72 sata. ....	63
Slika 4.10 Antibakterijski učinak PBA na broj i površinu kolonija bakterije <i>Escherichia coli</i> u odnosu na kontrolu nakon 72 sata (original). ....	64
Slika 4.11 Inhibitorni učinak raspona MIC BA na bakteriju <i>Escherichia coli</i> ispiranjem s plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%) nakon 72 sata.....	65
Slika 4.12 Inhibitorni učinak raspona MIC BA na bakteriju <i>Escherichia coli</i> ispiranjem i 120-minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%) nakon 72 sata.....	66
Slika 4.13 Inhibitorni učinak raspona MIC PBA na bakteriju <i>Escherichia coli</i> ispiranjem plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%) nakon 72 sata.....	67
Slika 4.14 Inhibitorni učinak raspona MIC PBA na bakteriju <i>Escherichia coli</i> ispiranjem i 120– minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH <sub>2</sub> O i C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%) nakon 72 sata.....	68
Slika 4.15 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC BA (2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). ....	76
Slika 4.16 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (2 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ).....	77
Slika 4.17 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije BA (7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). ....	82
Slika 4.18 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (7 dana prije aplikacije dH <sub>2</sub> O) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ).....	83

Slika 4.19 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC BA (2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). .....	88
Slika 4.20 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (2 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). .....	89
Slika 4.21 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije BA (7 dana prije aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). .....	95
Slika 4.22 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije PBA (7 dana od aplikacije gljive <i>Alternaria alternata</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). .....	96
Slika 4.23 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije BA (2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ).....	102
Slika 4.24 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (2 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanja <i>ImageJ</i> ). .....	103
Slika 4.25 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). .....	110
Slika 4.26 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (7 dana prije aplikacije bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) u usporedbi s kontrolom (očitanje <i>ImageJ</i> ). .....	111
Slika 4.27 Reizolacija gljive <i>Alternaria alternata</i> iz lista rajčice sa simptomima koncentrične pjegavosti nakon 5 dana na PDA supstratu (A) i bakterije <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> iz lista rajčice sa simptomima bakterijske pjegavosti nakon 3 dana na KB (B). .....	118

# 1. UVOD

Fitopatogene bakterije i gljive predstavljaju prijetnju globalnoj proizvodnji hrane. Neki od mehanizama kojima se održavaju u okolišu i u domaćinskoj biljci uključuju razvoj otpornosti na sredstva namijenjena njihovom suzbijanju. Osim otpornosti na agrokemikalije, patogeni su sposobni razviti perzistentne stanice za održavanje u nepovoljnim uvjetima zbog čega agrokemijska sredstva često ne mogu suzbiti čitavu populaciju patogena. Kao posljedica toga, zaraza fitopatogenima se ponavlja, što ima negativan ekonomski i ekološki utjecaj na poljoprivredu (Martins i sur., 2018). Neke vrste fitopatogenih gljiva, kao što je *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, sposobne su razviti tzv. križnu otpornost kod koje se razvojem otpornosti na jedan fungicid gljiva odupire djelovanju fungicida istog mehanizma djelovanja, što spektar fungicida (na koje razvija otpornost) čini širim (Yang i sur., 2019). S druge strane, poznato je da se fitopatogene bakterije na globalnoj razini suzbijaju primjenom antibiotika i pripravaka na bazi bakra. Spektar djelovanja bakrovih spojeva uključuje mnoge patogene, što ovaj metal čini jednim od glavnih sastojaka formulacija fungicida i baktericida (La Torre i sur., 2018). Premda se otpornost gljivičnih patogena na bakar ne razvija brzo, neki bakteriozni patogeni (među kojima je *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe i sur.) razvili su otpornost na spojeve bakra. Učestala upotreba baktericida i fungicida na bazi bakra rezultirala je ekotoksikološkim problemom akumulacije bakra u tlu. Svijest o tome dovela je 2002. godine do ograničenja u korištenju bakrovih pripravaka u poljoprivredi od strane Europske Unije (Uredba Komisije 473/2002 cit. prema La Torre i sur., 2018). Godine 2020., na popisu registriranih sredstava za zaštitu bilja od strane Ministarstva poljoprivrede (Fitosanitarni informacijski sustav, FIS) nalazilo se 35 pripravaka na bazi bakra od kojih je samo 7 bilo registrirano za suzbijanje uzročnika fitobakterioza, a rok valjanosti rješenja za neke od tih pripravaka istekao je krajem iste godine. Trenutno se na istom popisu nalazi 19 pripravaka na bazi bakra od kojih je 4 registrirano za suzbijanje fitobakterija, a rok valjanosti navedenih pripravaka ističe krajem 2023. Kako primjena antibiotika u biljnoj proizvodnji nije dozvoljena (FIS, 2022), problem ograničene upotrebe sredstava za suzbijanje (osobito fitopatogenih bakterija) postaje veći, kao što su izvijestili Martins i sur. (2018). Problem se rješava istraživanjem ekološki prihvatljivih spojeva sa što većom antibiotskom učinkovitošću. Jedna takva kemikalija može biti fenilboronska kiselina (eng. phenylboronic acid, PBA), poznata kao derivat medicinski važne borne kiseline (BA) (Michaelis i Becker 1880; Liu i sur., 1994; Lopalco i sur.,

2020). Riječ je o komercijalno dostupnom i farmaceutski prihvatljivom spoju koji u određenim koncentracijama ima antibakterijski i antimikotički učinak na nekoliko vrsta humanih gljiva i bakterija (Freeman i sur., 2010) te nije toksičan za okoliš (Yalinkilic i sur., 1998). Novija istraživanja, poseban naglasak u suzbijanju stavljaju na nove ekološki prihvatljive spojeve koji su učinkoviti u suzbijanju bakterija pri niskim koncentracijama i koji ne dovode do brzog razvoja otpornosti. U raznim istraživanjima, (Freeman i sur., 2010; González-Bello, 2017) PBA se navodi i kao inhibitor  $\beta$ -laktamaze, enzima ključnog u razvoju otpornosti patogenih bakterija. Osim u humanoj medicini, istraživanjem Liu i sur. (1994) i Yalinkilic i sur. (1998), dokazan je antimikotički učinak PBA na pojedine bazidiomicetne gljive koje su uzročnici propadanja drva japanskog cedra (*Cryptomeria japonica*). Budući da je istraživanje pokazalo značajan antimikotički učinak na uzročnike propadanja drva u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, PBA se smatra sredstvom koje ima karakteristike potencijalnog sredstva za zaštitu drvenastih kultura od gljiva iz odjela Basidiomycota (Liu i sur., 1994). Osim letalnog učinka PBA, starija istraživanja testirala su utjecaj PBA na organogenezu nekoliko vrsta biljaka među kojima se ističe rajčica *Solanum lycopersicum* L. (Haccius i Garrecht, 1963; Mathan, 1965). Haccius i Garrecht (1963) utvrdili su negativan učinak ove supstance na organogenezu rajčice, što za posljedicu ima promjene u morfologiji listova, ali samo pri tretmanu klijavog sjemena. Kod zrelih biljaka rajčice tretiranih s PBA u postembrionskom stadiju, nisu potvrđene promjene u morfologiji biljke (Mathan, 1965). Osim navedenog, proučen je i negativan učinak PBA kao specifičnog kompetitora za bor (Matthes i sur., 2020) koji u biljaka, u određenim koncentracijama, uzrokuje deficit bora. U istraživanju iz 2004. navodi se kako je primjena PBA uzrokovala povećanje rasta korijena u borom ishranjenoj biljci graha (Bassil i sur., 2004), na što se referira istraživanje iz 2019. kojim je potvrđeno kako ishrana borom smanjuje deficit bora uzrokovan djelovanjem PBA (Housh i sur., 2020). Izbjegavanje uvjeta koji dovode do negativnog učinka PBA na biljku (rana fenofaza biljke, nedovoljna ishrana borom i visoke koncentracije PBA), omogućuje istraživanje karakteristika PBA koje su zamijećene u radu Liu i sur. (1994). Istraženi letalni učinak PBA u uvjetima *in vitro* i *in vivo* na drvenastoj domaćinskoj biljci potaknuo je razvoj ideje ove disertacije o testiranju letalnog učinka PBA na zeljastoj domaćinskoj biljci, budući da takva istraživanja nisu zabilježena. Da je odabir rajčice kao zeljastog domaćina na kojem bi se istražio antibakterijski i antimikotički učinak PBA opravdan, svjedoči interes prehrambene industrije, proizvođača, konzumenata, ali i znanstvenika za ovu kulturu. Poznato je da je uzgoj rajčice otežan zbog šteta uzrokovanih otpornim patogenima među kojima su bakterija *P. syringae* pv. *tomato* (Stamova, 2009; La Torre i sur., 2018) i gljiva *A. alternata* (Yang i sur., 2019). Osim ekonomski značajnih

fitopatogena u uzgoju rajčice, negativni aspekt uzrokuje i patogena bakterija *Escherichia coli*, koja kao kontaminant na svježe plodove dopijeva gnojdbom i navodnjavanjem kontaminiranom vodom (Ibekwe i sur., 2004). Nedavna istraživanja (Zhang i sur., 2019) opisuju rezultate inaktivacije populacije bakterije *E. coli* na površini plodova korištenjem raznih spojeva s dekontaminirajućim učinkom, no antibakterijski učinak PBA na bakteriju *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice nije poznat. Izbjegavanje negativnog djelovanja primjenom PBA u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji na rajčicu u poznoj fenofazi razvoja, omogućilo je određivanje jačine simptoma uzrokovane uslijed infekcije ekonomski značajnim patogenima ovog zeljastog domaćina. Kako se biljna bolest uzrokovana fitopatogenim organizmom opisuje kao pojava poremećaja u fiziologiji biljke (Abdulkhair i Alghuthaymi, 2016), istraživanje letalnog učinka PBA osim fitopatološkim testovima *in vitro* i *in vivo*, istraženo je i mjerenjem sadržaja klorofila i drugih vegetacijskih parametara testiranih biljaka, što pomaže u prihvaćanju ili odbacivanju hipoteza istraživanja ove disertacije. Budući da je PBA derivat BA čiji je antibakterijski i antimikotički učinak poznat u medicini (Adamczyk-Woźniak i sur., 2012), BA je korištena kao kontrola. Eventualni negativni učinak PBA na rajčicu testiran je uključivanjem tretmana kontrolne skupine zdravih rajčica. Sukladno navedenom, osnovni cilj ove disertacije je testirati antibakterijski i antimikotički učinak PBA na ekonomski značajnog bakterioznog i gljivičnog patogena rajčice u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, uz testiranje antibakterijskog učinka istog spoja na medicinski značajnog patogenog kontaminanta ploda rajčice, bakteriju *E. coli*.



## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

U istraživanje se ulazi sa sljedećim hipotezama i ciljevima:

H1) PBA u usporedbi s BA, u nižim koncentracijama inhibira rast i razvoj patogena rajčice (*Alternaria* sp. i *Pseudomonas* sp.) u uvjetima *in vitro*.

C1) Testirati antibakterijski i antimikotički učinak različitih koncentracija PBA i kontrolne BA na odabrane uzročnike bolesti u uzgoju rajčice u uvjetima *in vitro*.

H2) Ispiranje s PBA u usporedbi s BA, u nižim koncentracijama inaktivira populaciju bakterije *E. coli* na plodovima rajčice.

C2) Istražiti antibakterijski učinak PBA i kontrolne BA na populaciju bakterije *E. coli* na plodovima rajčice.

H3) Folijarna aplikacija PBA, u usporedbi s BA, u nižim koncentracijama smanjuje jačinu simptoma bolesti rajčice u uvjetima *in vivo*.

C3) U uvjetima *in vivo*, testirati antibakterijski i antimikotički učinak PBA i kontrolne BA na jačinu simptoma bolesti rajčice.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Rajčica *Solanum lycopersicum* L.

Rajčica (*Solanum lycopersicum* L.) je jedna od najvažnijih široko uzgajanih povrtnih kultura koja se najčešće proizvodi i konzumira (Zorzoli i sur., 2007; Knapp i Peralta, 2016; Meena i sur., 2016) u cijelom svijetu (Hussein, 2019). Kultura pripada porodici *Solanaceae* (pomoćnice) i rodu *Solanum* koji uključuje nekoliko komercijalno važnih vrsta biljaka. Rajčica je dvosupnica i višegodišnja zeljasta biljka koja se najčešće uzgaja kao jednogodišnja kultura, a ujedno je druga povrtna kultura po važnosti. Prema statistici Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), u 2014. godini svjetska proizvodnja rajčice kretala se oko 171 milijuna tona, a glavne zemlje po proizvodnji su Kina i Indija (Knapp i Peralta, 2016; Li i sur., 2017). Gotovo 60 % svjetske proizvodnje rajčice dolazi iz Azije, 13,3 % iz Europe, 11,3 % iz Afrike, 8,7 % iz Sjeverne Amerike i 6,6 % iz Srednje i Južne Amerike (FAOSTAT, 2017.). Prema FAOSTAT-u (2017), pet najvećih svjetskih proizvođača rajčice u 2014. godini bile su Kina, Indija, Sjedinjene Države, Turska i Egipat (Knapp i Peralta, 2016), a 2018., Indija je proizvela 18,74 milijuna tona sa stopom produktivnosti od 21,24 t / ha (Kumar i sur., 2020).

Rajčica je izvorno dobila ime *Solanum lycopersicum*, Linnaeus 1753., međutim klasifikacija rajčice bila je predmet mnogih rasprava zbog čega je rod *Solanum* ponovo taksonomski procijenjen. Rajčica je dugo bila poznata kao *Lycopersicon esculentum* no mnoga su istraživanja pokazala da je ova vrsta dio roda *Solanum* zbog čega se ponovo naziva *Solanum lycopersicum* (Knapp i Peralta, 2016).

Rajčica je važno povrće širom svijeta jer su ga mnoge zemlje usvojile kao vrijedan dio njihove svakodnevne prehrane, pa čak i kulinarske tradicije (Moghaddam i sur., 2019). Može se uzgajati u različitim geografskim zonama na otvorenim poljima ili u staklenicima, a plod se može ubrati ručnim ili mehaničkim sredstvima. Kako je riječ o kulturi koja se uzgaja širom svijeta za lokalnu upotrebu ili kao izvozna kultura, ne čudi da se globalna proizvodnja rajčice smanjuje napadom raznih štetnika i bolesti (Hussein, 2019).

Među poznatijim kultivarima rajčice navodi se "Rutgers" koji je proizveden selekcijom tijekom kasnih 1920-ih godina. Ovaj kultivar je izvorno trebao biti korišten za prodaju u svježem stanju i za preradu, a sjeme se prvi puta pojavilo na tržištu 1934. godine. "Rutgers" je bio najistaknutiji kultivar tijekom kasnih 1940-ih, a najpopularniji u svijetu poslije 1950-ih godina (McGay, 2019). Navedeni kultivar ima izražen obrambeni mehanizam uslijed interakcija s različitim patogenima (López-Gresa i sur., 2010), osobito kod infekcije bakterijom *P. syringae* pv. *tomato* (Bellés i sur., 1999; López-Gresa i sur., 2011) zbog čega

se često koristi kao indikatorska biljka u raznim istraživanjima patogeneze, ali i kao indikatorska test biljka za ispitivanje dostupnosti bora u tlima jer pokazuje osjetljivost na nedostatak bora (Brown i Ambler, 1973; Brown 1979).

## **2.2. Problematika suzbijanja biljnih patogena**

Suvremeni problem u suzbijanju fitopatogenih bakterija i gljiva očituje se u razvoju adaptivnih sposobnosti navedenih mikroorganizama, kao što su razvoj otpornosti na sredstva namijenjena njihovom suzbijanju te razvoj perzistentnih morfoloških struktura kojima se održavaju u okolišu. Osim otpornosti na agrokemikalije, patogeni su sposobni razviti perzistentne stanice za održavanje u nepovoljnim uvjetima zbog čega sredstva namijenjena njihovom suzbijanju često ne mogu suzbiti čitavu populaciju patogena. Kao posljedica toga, zaraza fitopatogenima se ponavlja, što ima negativan ekonomski i ekološki utjecaj na poljoprivredu (Martins i sur., 2018). S druge strane, poznato je da se fitopatogene bakterije na globalnoj razini suzbijaju primjenom antibiotika i pripravaka na bazi bakra. Spekatar djelovanja bakrovih spojeva uključuje mnoge patogene, što ovaj metal čini jednim od glavnih sastojaka formulacija fungicida i baktericida (La Torre i sur., 2018).

Premda se otpornost gljivičnih patogena na bakar ne razvija brzo, mnogi bakteriozni patogeni su razvili otpornost na spojeve bakra. Učestala upotreba baktericida i fungicida na bazi bakra rezultirala je ekotoksikološkim problemom akumulacije bakra u tlu. Svijest o tome dovela je 2002. godine do ograničenja u korištenju bakrovih pripravaka u poljoprivredi od strane Europske Unije (Uredba Komisije 473/2002 cit. prema La Torre i sur., 2018). Godine 2020., na popisu registriranih sredstava za zaštitu bilja od strane Ministarstva poljoprivrede (Fitosanitarni informacijski sustav, FIS) nalazilo se 35 pripravaka na bazi bakra od kojih je 7 bilo registrirano za suzbijanje uzročnika fitobakterioza, a rok valjanosti za neke od tih pripravaka istekao je krajem iste godine. Trenutno se na navedenom popisu nalazi 19 pripravaka na bazi bakra od kojih je 4 registrirano za suzbijanje fitopatogenih bakterija, a rok valjanosti ističe krajem 2023. godine. Zamjetno je da se prema podacima FIS-a broj raspoloživih sredstava za suzbijanje uzročnika fitobakterioza, iz godine u godinu, smanjuje. Kako primjena antibiotika u biljnoj proizvodnji nije dozvoljena (FIS, 2022), problem ograničene upotrebe sredstava za suzbijanje (osobito fitopatogenih bakterija) postaje veći, kao što su izvijestili Martins i sur. (2018).

### 2.3. Uzročnici bolesti rajčice

Poznato je da je uzgoj rajčice otežan zbog šteta uzrokovanih otpornim patogenima među kojima su bakterija *P. syringae* pv. *tomato* (Stamova, 2009; La Torre i sur., 2018) i gljiva *A. alternata* (Yang i sur., 2019). Osim ekonomski značajnih fitopatogena u uzgoju rajčice, negativni aspekt uzrokuje i patogena bakterija *Escherichia coli*, koja kao kontaminant gnojdbom i navodnjavanjem kontaminiranom vodom, dospijeva na svježim plodove (Ibekwe i sur., 2004).

Među širokim spektrom gljivičnih patogena, gljiva *A. alternata* uzročnik je koncentrične pjegavosti na rajčici (Ramezani i sur., 2019). Riječ je o jednoj od najpoznatijih i najvažnijih bolesti rajčice koja uzrokuje značajne gubitke, te smanjuje kvalitetu hranjivih vrijednosti ove kulture. Ova bolest najviše šteti rajčici *Solanum lycopersicum* L. u regijama s visokom vlagom i prilično visokim temperaturama, od 24 – 29 °C te u poluaridnim klimatskim uvjetima gdje su česte i dugotrajne noćne rose (Chaerani i sur., 2006). U nasadima u SAD-u, Australiji, Izraelu, Velikoj Britaniji, Brazilu i Indiji, gubitci uzrokovani ovim patogenom kreću se od 35 do 80 % (Bessadat i sur., 2016). Velika zaraza koncentričnom pjegavošću rajčice dovodi do potpune defolijacije i velikih gubitaka u usjevu u kratkom vremenskom razdoblju (Bessadat i sur., 2016). Rajčica je zaražena patogenom *Alternaria* sp. tijekom cijelog svog rasta i razvoja, a infekciju karakterizira pojava klorotičnih i nekrotičnih simptoma na nadzemnim dijelovima, što dovodi do ozbiljnih ekonomskih gubitaka (Meena i sur., 2016). Vrste *Alternaria* sp. mogu uzrokovati manje ekonomski važne simptome na rajčici, uključujući lezije bazalnog dijela stabljike presadnica, lezije stabljike na odrasloj biljci i trulež plodova (Walker, 1952; Chaerani i sur., 2006) gdje uzrokuje gubitke prinosa do 79 %. Lezije na stabljikama mogu uzrokovati gubitke sadnica u polju od 20 % do 40 % (Sherf i MacNab 1986; Chaerani i sur., 2006).

Bakteriozna pjegavost je najpoznatija bakterijska bolest u industriji rajčice koju uzrokuje *P. syringae* pv. *tomato*. Riječ je o bakterijskom uzročniku bolesti koji se javlja širom svijeta i uzrokuje ozbiljno smanjenje prinosa i kvalitete ploda, posebno tijekom hladnih i vlažnih proljeća (Cai i sur., 2011). Zaraza ovom bakterijom u fazi sadnice može uzrokovati do 75 % ukupnog gubitka prinosa i značajno smanjiti kvalitetu rajčice (Li i sur., 2017).

### 2.3.1. Rod *Alternaria*

Gljivični rod *Alternaria*, koji je prvi je predstavio Nees (1816) pripada carstvu Fungi, odjelu Ascomycota, pododjelu Pezizomycotina, razredu Dothiideomycetes, redu Pleosporales i porodici *Pleosporaceae* (Ramezani i sur., 2019). Riječ je o rodu koji obuhvaća skup fitopatogenih i saprofitnih gljiva (Thomma, 2003) te ubikvista koji su dio globalne mikroflore (Maškova i sur., 2012). Vrste unutar roda otkrivene su kao endofiti i patogeni ljudi i životinja (Lawerence i sur., 2015).

Unutar roda *Alternaria*, opisano je preko 600 vrsta dok je 400 vrsti poznato kao ekonomski značajni biljni uzročnici bolesti na biljkama (Meena i sur., 2016), osobito povrća (El-Gazzar i Ismail, 2020). U istraživanju Bessadat i sur. (2016) uzročnik roda *Alternaria* otkriven je u više od 80 % zaraženog biljnog materijala i u više od 50 % ukupnih izolata gljiva iz biljnog uzorka, što potvrđuje veliku patogenost ovog roda. Osim toga, nekoliko vrsti unutar roda važne su kao alergeni u zraku i humani patogeni kod imunološki ugroženih pacijenata. Osim ekonomskih šteta na poljoprivrednim kulturama, vrste su značajne jer produciraju mikotoksine koji dopijevaju u hranu (Rotem, 1994; Meena i sur., 2016) stoga je ispravna i brza identifikacija vrsti roda *Alternaria* od velike koristi zbog značajnih negativnih učinaka na poljoprivredu i zdravlje ljudi (Ratmahzai i sur., 2016).

#### 2.3.1.1. Vrsta *Alternaria alternata*

Vrste roda *Alternaria* uzrokuju bolesti u gotovo 400 biljnih vrsta, od kojih samo vrsta *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler može zaraziti više od 100 biljnih vrsta (Meena i sur., 2016). Među raznim bolestima koje utječu na usjeve rajčice u svijetu, koncentrična pjegavost smatra se najštetnijom. Navedena bolest uzrokovana je od strane nekoliko vrsta gljiva koje pripadaju rodu *Alternaria*, uključujući vrstu *A. alternata* (Moghaddam i sur., 2019). Riječ je o dominantnoj, najpatogenijoj i najčešće izoliranoj vrsti roda *Alternaria* obzirom da uzrokuje značajne gubitke i narušava hranjivu vrijednost rajčice (Hussein, 2019; Moghaddam i sur., 2019; El-Gazzar i Ismail, 2020).

Patogen *A. alternata* je sveprisutna, saprofitska gljiva izolirana iz različitog odumrlog biljnog materijala, a poznata je i kao patogen koji uzrokuje oportunističke bolesti na brojnim usjevima (Thomma, 2003). Uspješna patogenost ove vrste, posljedica je produkcije različitih toksina s jedinstvenim načinom djelovanja (Meena i sur., 2016). Bolest koncentrične pjegavosti koju uzrokuje vrsta *A. alternata*, prvi puta je opisana 1903. godine

u Australiji kada je zarazila listove, grančice i nezrele plodove mandarine, što je dovelo do smanjenja prinosa i narušavanja komercijalne vrijednost tog voća (Hussein, 2019).

Osobito je vrsta *A. alternata* sposobna zaraziti usjeve rajčice u ranim fazama razvoja biljaka, uzrokujući znatne gubitke tijekom berbe (Moghaddam i sur., 2019). Na temelju patoloških, fenotipskih i genotipskih izvještaja, El Gobashy i sur. (2018) u svom istraživanju navode da vrsta *A. alternata* uzrokuje koncentričnu pjegavost rajčice u Egiptu, što potvrđuje adaptivnu sposobnost patogena na širok interval temperature i vlage. Izvijesteno je da navedeni patogen inficira 30 % biljaka razmnoženih u staklenicima i oko 80 % biljaka uzgajanih u nekontroliranim uvjetima (El-Gazzar i Ismail, 2020). Osim značajnih adaptivnih sposobnosti, ova vrsta razvija križnu otpornost na fungicide, što otežava primjenu već ograničenih sredstva namijenjenih njenom suzbijanju (Yang i sur., 2019).

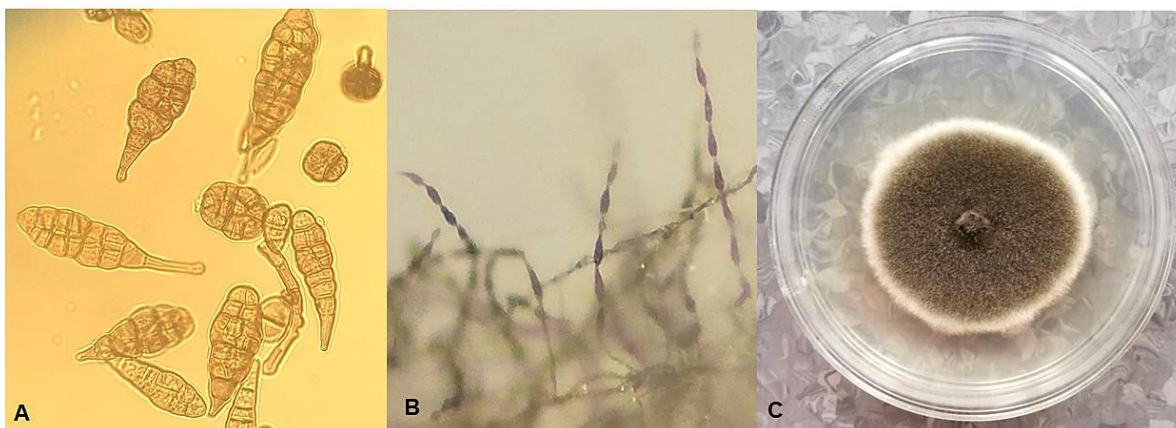
### **2.3.1.2. Taksonomija roda *Alternaria***

Taksonomija roda *Alternaria* temelji se na konidijalnim morfološkim karakteristikama, što uključuje oblik, boju, septaciju konidija, ali i spektar biljnih domaćina te produkciju sekundarnih metabolita. Rod *Alternaria* koji je prvi put opisan 1817. zajedno s izolatom *Alternaria tenuis*. Keissler (1912), nalazio je na nejasnoće u opisima vrste *A. tenuis* te sinonimizirao vrstu *A. tenuis* i *Torula alternata* u jednu vrstu – *A. alternata*. Teleomorfni (spolni) stadij gljive nije bio evidentiran unutar roda, zbog čega je rod *Alternaria* svrstan u red Fungi Imperfecti s ostalim anamorfnim (nespolnim) gljivama. Unutar roda opisano je preko 1000 vrsti *Alternaria*. Mnogi od ovih naziva vrsti nisu bili ispravni te su tijekom vremena razvrstani u druge rodove (Simmons, 2007; Armitage, 2013). Kontinuirana revizija roda odražava njegovu raznoliku prirodu jer vrste posjeduju znatne varijacije u strukturi spora i identificiraju se u različitim ekološkim nišama. Zanimljivo je da se većina klasifikacija *Alternaria sp.* temelji na morfologiji, a o tome svjedoči djelovanje E.G. Simmonsa koji je objavio 355 eseja i radova o morfologiji vrsti roda *Alternaria* (Simmons, 1967; Simmons, 1981; Simmons, 2003; Armitage, 2013). Cijelokupni životni rad je kasnije sažet u identifikacijski vodič za rod *Alternaria* koji morfološki opisuje 275 vrsti unutar roda (Simmons, 2007; Armitage, 2013).

### 2.3.1.3. Morfološke karakteristike roda *Alternaria*

Gljive roda *Alternaria* stvaraju dobro razvijen, obično površinski (supstratni) i višestanični micelij, tamnozeleno, sive ili crne boje (Maškova i sur., 2012; Troncoso-Rojas i Tiznado-Hernández, 2014) promjera preko 70 mm, nakon 7–10 dana (Chaerani i sur., 2006) (Slika 2.1 C). Tipične kolonije gljive *A. alternata* obično imaju istaknutu bijelu marginu (2–5 mm) micelija pri uzgoju na PDA (Troncoso-Rojas i Tiznado-Hernández, 2014). Svi pripadnici roda *Alternaria* stvaraju konidije koje su muriformne, kljunaste, višestanične, septirane i tamno obojene (melanizirane) (Slika 2.1 A). Razvijaju se kao pojedinačne spore ili u lancima, oblika jajeta, cilindrične, usko elipsoidne ili zaobljene, kljunaste ili nekljunaste, blijede ili maslinastosmeđe do smeđe, glatke s poprečnim i sa ili bez kosih ili uzdužnih pregrada (Chaerani i sur., 2006). Konidiofori su jednostavni ili nepravilni te slabo razgranati, blijedo smeđi ili smeđi, pojedinačni ili u skupinama (Slika 2.1 B) (Lawerence i sur., 2015).

Vrsta *A. alternata* se odlikuje stvaranjem primarnih lanaca koji sadrže od 6 do 14 konidija i razvojem brojnih sekundarnih lanaca koji sadrže od 2 do 8 konidija. Male konidije (20-50 µm) su važna karakteristika ove vrste. Konidije su jajolikog oblika, podijeljene poprečnim i okomitim septama s minimalnim razvojem vršnih produžetaka. Vrsta u kulturi stvara duge konidiofore koji su septirani i svijetlosmeđe boje (Troncoso-Rojas i Tiznado-Hernández, 2014).



Slika 2.1 Morfološke karakteristike vrste roda *Alternaria*; konidije (A), konidiofori (B) i čista kultura (C) (original).

#### 2.3.1.4. Simptomatologija roda *Alternaria*

Razne vrste *Alternaria* sp. uzročnici su destruktivne bolesti rajčice – koncentrične pjegavosti. Nekrotične lezije u koncentričnim prstenovima obrubljene žutim klorotičnim prstenom, čest su simptom bolesti koju uzrokuju patogene gljive roda *Alternaria* (Slika 2.2). Temeljem simptoma, štete se manifestiraju u svim fazama rasta nadzemnih dijelova rajčice (Ramezani i sur., 2019). Prvi simptomi koncentrične pjegavosti su male, tamne, nekrotične lezije koje se obično pojavljuju na starijim listovima i šire se u svojoj veličini kako biljke stare. U teškim epidemijama, uzročnik može uzrokovati prijevremenu defolijaciju koja slabi biljke i izlaže plodove ozljedama od Sunca. Na stabljikama se mogu pojaviti velike, tamne i utonule lezije u prizemnom dijelu stabljike sadnica, što uzrokuje djelomično opasavanje poznato kao trulež ovratnika. Sadnice su oslabljene i mogu uginuti kad je stabljika potpuno opasana lezijom. Jako zaraženi plodovi često ispadaju prije sazrijevanja (Chaerani i sur., 2006).



Slika 2.2 Simptomi na rajčici koje uzrokuje *Alternaria* sp. Koncentrične lezije na listovima rajčice (A), (B). Lezije na plodovima rajčice (C) (original).



### 2.3.1.5. **Biologija i epidemiologija roda *Alternaria***

Gljive roda *Alternaria* se održavaju kao micelij ili u obliku nespolnih spora - konidija u tlu, na biljnim ostacima i sjemenu (Rotem, 1994). Također, hlamidospore mogu poslužiti kao strukture za preživljavanje. U uvjetima visoke vlage zraka i u širokom rasponu temperatura (8 – 32 °C), konidije vrše primarnu infekciju na domaćinskim biljkama. Ove spore direktno prodiru u stanice epiderme domaćina appresorijem i ulaze kroz puči ili rane. Do prodora u biljno tkivo dolazi kada su temperature između 10 i 25 °C. Kolonizaciju domaćina olakšavaju enzimi (celulaze, pektin metil galakturonaze) koji razgrađuju staničnu stijenkicu stanica domaćina i niz toksina koji ubijaju stanice domaćina, što omogućuje patogenu dobivanje hranjivih sastojaka iz uginulih stanica. Ovaj relativno kratak ciklus bolesti omogućuje policikličku infekciju u čemu se očituje ekonomski značaj ovih vrsta gljiva (Chaerani i sur., 2006).

### 2.3.1.6. **Suzbijanje roda *Alternaria***

Primjena fungicida je najčešća metoda koja se koristi za smanjenje gubitaka uzrokovanih patogenom gljivom *Alternaria* sp. (Bessadat i sur., 2016). Mjere suzbijanja uključuju 3 do 5 godina plodoreda, rutinske primjene fungicida i uporabu zdravog sadnog materijala. Suzbijanje bolesti fungicidima općenito je najučinkovitija mjera suzbijanja, ali takva mjera nije ekonomski izvediva u svim dijelovima svijeta. Otporne sorte potencijalno su najekonomičnija mjera kontrole jer se mogu proširiti razmaci između aplikacija fungicida (Chaerani i sur., 2006). Utvrđeno je kako neki gljivični patogeni, kao što je vrsta *A. alternata*, imaju sposobnost razviti križnu otpornost. Riječ je o otpornosti koja nastaje jer se patogen uspješno odupre jednom antimikrobnom spoju, a također je otporan na jedan ili nekoliko drugih spojeva. Obično se javlja među antimikrobnim spojevima koji imaju isti način djelovanja. Ovakav tip otpornosti smatra se ozbiljnom prijetnjom suvremenoj proizvodnji hrane. U istraživanju Yang i sur. (2019) potvrđena je križna otpornost vrste *A. alternata* na dva fungicida (mankozeb i difenokonazol) s različitim mehanizmom djelovanja. Također, u istraživanju Yanga i sur. (2019) ističu kako bi patogeni mogli razviti križnu otpornost na fungicide s različitim mehanizmom djelovanja, na što ukazuje snažna pozitivna korelacija između tolerancije na mankozeb i difenokonazol te patogena *A. alternata* što će u budućnosti dodatno otežavati suzbijanje bolesti bilja.

Alternativa za postizanje i optimizaciju suzbijanja biljnih bolesti uzrokovanih gljivama roda *Alternaria* te minimaliziranje rizika od razvoja otpornosti, je razvitak novih fungicida s kontrastnim načinima djelovanja u folijarnoj primjeni (Avenot i sur., 2007; Avenot i

Michailides, 2007). Smatra se kako je dugotrajna upotreba fungicida rezultirala razvojem rezistentnih sojeva gljiva. Testovima *in vitro* otkriveno je nekoliko izolata *A. alternata* rezistentnih na boskalid (Avenot i sur., 2007), piraklostrobin, strobilurine (Avenot i Michailides, 2007) i azoksistrobin (Ma i sur., 2003) zbog čega su ove sintetičke kemikalije postale neučinkovite na navedenu vrstu gljiva. Također, postoji sve veća zabrinutost potrošača zbog rezidua pesticida u hrani, zbog čega fungicidi više nisu prva metoda suzbijanja gljivičnih bolesti. Novi biološki načini suzbijanja vrsti roda *Alternaria* uključuju upotrebu esencijalnih ulja, mikrobnih antagonista (Wang i sur., 2008), nanočestica (El-Gazzar i Ismail, 2020), a navedene metode napredovale su kao potencijalne alternative sintetičkim fungicidima za suzbijanje koncentrične pjegavosti rajčice.

### **2.3.2. Rod *Pseudomonas***

Predstavnici bakterijskog roda *Pseudomonas* imaju veliki značaj u fitomedicini budući da su vrlo rasprostranjeni, a štete koje uzrokuju parazitiranjem na biljkama domaćinima su značajne. Neke fitopatogene vrste unutar roda *Pseudomonas*, izraziti su polifagi koji parazitiraju uglavnom parenhimsko, ali i druga biljna tkiva zeljastih i drvenastih domaćina. Spektar domaćina ovih bakterija uključuje brojne kultivirane biljke na kojima uzrokuju različite simptome kao što su nekrotične pjege, rak- rane, tumori, venuća i trulež (Arsenijević, 1986). Vrste *Pseudomonas* sp. rastu epifitski, iako populacije u polju opadaju u odsutnosti osjetljivog domaćina. Ozbiljna izbijanja bolesti relativno su rijetka, a pogoduju im visoka vlažnost zraka, niske temperature i mehanička oštećenja koja omogućavaju širenje bakterija između biljaka domaćina (Preston, 2000). Osim na biljkama, neke vrste roda *Pseudomonas* parazitiraju na životinjama i ljudima.

Veliki broj ovih bakterija na hranjivoj podlozi luči pigment fluorescein, koji difundiranjem kroz podlogu stvara fluorescentni sjaj žučkastozelene boje. Na hranjivoj podlozi, većina bakterija roda *Pseudomonas* stvara bijele kolonije koje su sluzave, sivobjelkastog ili plavkastog odsjaja pri propuštanju svjetlosti. Riječ je uglavnom o aerobnim, štapićastim, sporogenim i Gram- negativnim bakterijama koje imaju bičeve na polovima, lofotrihog ili amfitrihog tipa. Pretpostavlja se kako ove bakterije potječu od saprofitske vrste *Pseudomonas fluorescens* koja pripada rizosfernoj mikroflori (Arsenijević, 1986).

#### **2.3.2.1. Vrsta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***

Vrsta *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* je gram-negativna, hemibiotrofna bakterija (Moyano i sur., 2019) koja uzrokuje bakterioznu pjegavost listova, stabljike i plodova u čemu se očituju veliki ekonomski gubitci rajčice, obično u uzgoju na polju, ali u zatvorenim prostorima (Tate i van der Mespel, 1976; Zhao i sur., 2007; Uppalapati i sur., 2008; Li i sur., 2017; Mansfield i sur., 2012). Riječ je o fitopatogenoj bakteriji koja je aerobna, pokretna, štapićastog oblika s polarnim bičevima. Vrsta je primarno proučavana kao uzročnik bakteriozne pjegavosti rajčice premda je izolirana iz širokog spektra kulturnih biljaka i korova (Preston, 2000).

Bakteriozna pjegavost je prvi puta opisana 1933. godine (Okabe 1933; Bryan 1933) i prvi puta pronađena na Novom Zelandu (1944) (Reid, 1948) gdje je uzrokovala ozbiljno zaostajanje u razvoju sorata rajčice u polju i značajne infekcije lista sadnica. Bolest je danas raširena na Novom Zelandu gdje uzrokuje ekonomske gubitke zbog smanjenog prinosa i

usporavanja dozrijevanja plodova, zbog čega se prinosi smanjuju prilikom infekcije ploda i listova rajčice.

Vrsta *P. syringae* pv. *tomato* ima dva načina života: početna epifitska faza na površini lista zdrave biljke i endofitska faza u apoplastu nakon ulaska u biljku kroz prirodne otvore i/ili rane (Xin i sur., 2018; Moyano i sur., 2019). Epifitski način života ovog folijarnog patogena ključan je za kolonizaciju domaćinske biljke. Svjetlost i sustav fitokroma patogena *P. syringae* pv. *tomato* imaju utjecaj na pokretljivost, stvaranje biofilma, prijanjanje bakterije na površini biljke te su u snažnoj korelaciji s početnom fazom kolonizacije kada bakterija mora epifitski preživjeti s ciljem uzrokovanja bolesti u biljci domaćinu (Xin i sur., 2018; Moyano i sur., 2019).

### **2.3.2.2. Taksonomija roda *Pseudomonas***

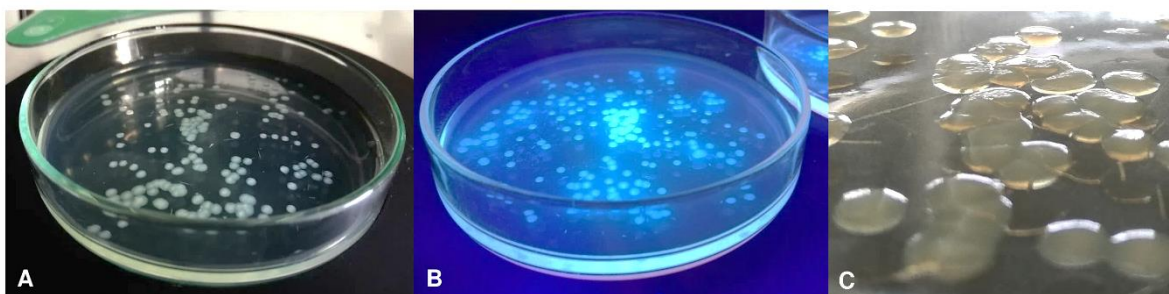
Vrsta *P. syringae* pv. *tomato* koja uzrokuje bakterioznu pjegavost rajčice, otkrio je Okabe 1933. i u početku je nazvana *Phytomonas tomato* Okabe. Iste godine, Bryan (1933) je opisao bakterioznog patogena rajčice i nazvao ga *Bacterium punctulans* Bryan. U Bergeyu priručniku za determinacijsku bakteriologiju iz 1939., vrsta *Bacterium punctulans* je navedena kao mogući sinonim za vrstu *Phytomonas tomato* (Pyke, 1980), a 1943. Dowson mikroorganizmu dodjeljuje naziv *Pseudomonas punctulans* (Bryan) Dowson (Pyke, 1980). Naziv *Pseudomonas tomato* predložen je 1944. (Alstatt 1944; Pyke 1980) i danas se najčešće koristi u klasifikaciji navedenog patogena. Young i sur. (1978) predložili su nomenklaturu i klasifikacijski sustav za fitopatogene bakterije u kojem se vrsta *Pseudomonas tomato* naziva *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye i Wilkie.

### **2.3.2.3. Morfološke karakteristike roda *Pseudomonas***

Vrste bakterijskog roda *Pseudomonas* su gram-negativne bakterije ravnog ili blago zakrivljenog štapićastog oblika (0,5 x 1,5 µm) s polarnim flagelama koje tvore golemu i heterogenu skupinu strogo aerobnih i kemoorganotrofnih mikroorganizama (Bryan 1933; Mulcahy, 1993). Većina pripadnika roda *Pseudomonas* fluorescira zelenom ili plavom bojom na King's B mediju pod ultraljubičastim svjetlom u zamračenoj prostoriji (Slika 2.3 B). Na prirodnom svjetlu pojavljuju se blago uzdignute i zaobljene kolonije svijetložute boje (Wilkie i Dye 1974b) (Slika 2.3 C). Rod *Pseudomonas* koji je imenovao Migula 1894. godine,

najvažniji je od mnogih rodova bakterija koje posjeduju navedene karakteristike (Palleroni, 1986; Mulcahy, 1993).

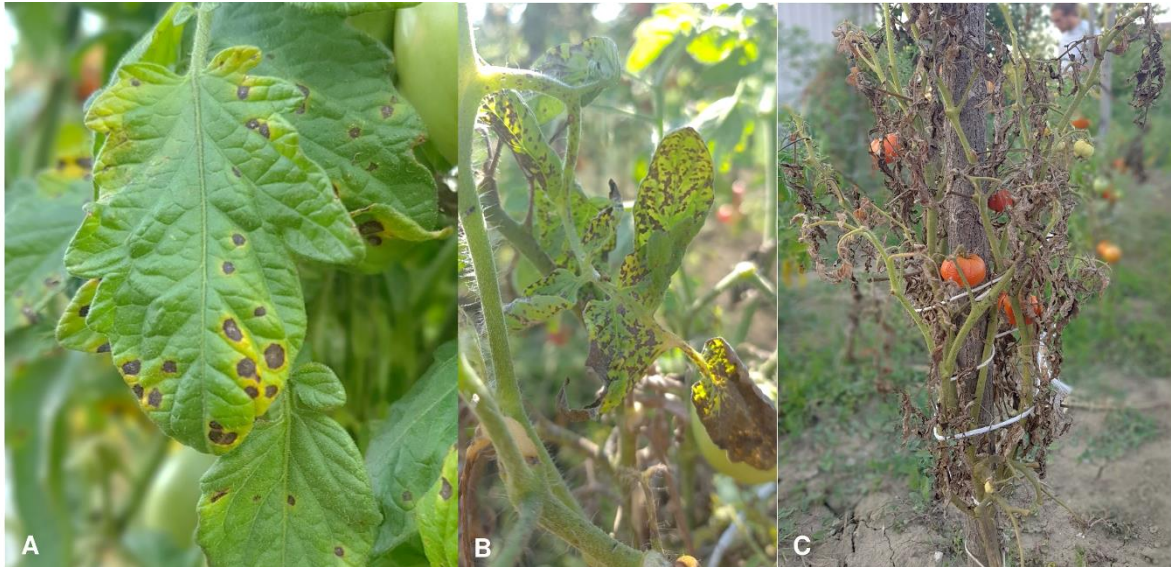
Vrsta *P. syringae* pv. *tomato* je aerobna, fluorescentna, asporogena, Gram- negativna bakterija štapićastog oblika (Arsenijević, 1986). Kretanje i vrtnju omogućuju joj flagele (bičevi) koji su smješteni na polu bakterijske stanice. Prisutnost flagela i njihov položaj na bakteriji doprinosi njezinoj morfološkoj identifikaciji (Blancard, 2012). Ova patogena vrsta na hranjivoj podlozi luči pigment fluorescein koji difundiranjem kroz podlogu stvara fluorescentni sjaj žučkastozele boje. Kolonije *P. syringae* pv. *tomato* su bijele i sluzave, sivobjelkastog ili plavkastog odsjaja pri propuštanju svjetlosti (Arsenijević, 1986) (Slika 2.3 A).



Slika 2.3 Morfološke karakteristike kolonije vrste *Pseudomonas* sp.; čista kultura na hranjivoj podlozi (A). Vizualizacija kulture pod UV svjetlom (B). Izgled kolonija (C) (original).

#### 2.3.2.4. Simptomatologija roda *Pseudomonas*

Fitopatogen *P. syringae* pv. *tomato* uzrokuje bakterioznu pjegavost rajčice koja se lako prepoznaje po karakterističnim simptomima na plodovima, listovima i stabljikama. Zaraza ovom bakterijom rezultira pojavom malih, ulegnutih i crnih lezija na nadzemnom dijelu biljke (Li i sur., 2017). Simptomi na folijarnim lezijama se očituju kao tamnosmeđa do crna nekrotična područja okružena žutim prstenovima (Bryan, 1933) (Slika 2.4 A, B), dok su lezije na plodovima blago izdignute i razlikuju se u veličini, od manjih mrlja do vidljivih lezija, veličine 3 mm u promjeru (Uppalapati i sur., 2008; Goode i Sasser, 1980). Prilikom jačih zaraza, dolazi do propadanja cijele biljke (Slika 2.4 C) i do infekcije ploda, što dovodi do zaraze sjemena rajčice (Uppalapati i sur., 2008; Devash i sur., 1980).



Slika 2.4 Simptomi na rajčici koje uzrokuje vrsta roda *Pseudomonas*; nekrotične pjegave na listovima (A), (B); sušenje cijele biljke (C) (original).

### 2.3.2.5. Biologija i epidemiologija roda *Pseudomonas*

Pripadnici roda *Pseudomonas* zauzimaju dominantan položaj u biosferi u smislu raznolikosti staništa i broja vrsti u određenom staništu. Vrste roda se nalaze u velikom broju u svim glavnim prirodnim kopnenim i vodenim ekosustavima te u mnogim različitim zajednicama s biljkama i životinjama (Clarke i Slater, 1986; Mulcahy, 1993). Optimalna temperatura rasta za većinu vrsti roda *Pseudomonas* je 28 °C, ali mnoge vrste su sposobne rasti na temperaturama u rasponu od 4 – 43 °C. Basu (1966) i Grogan i sur. (1974) izvijestili su da razvoju bakterijske pjegavosti pogoduju temperature od 24 -27 °C i relativna vlažnost zraka od 90 %. Umjerene temperature i visoka vlaga vrlo su pogodni za pojačan razvoj bakterije *P. syringae* pv. *tomato*. Ova bakterija raste pri temperaturama između 13 i 28 °C, a raspon temperatura od 18 - 24 °C je optimalan, dok je njezina aktivnost znatno smanjena pri temperaturama višim od 30 °C (Venette, 1996; Gullino i sur., 2009). Patogen može biti prisutan na listovima rajčice u malom broju, ne uzrokujući bolest, sve dok povoljni uvjeti ne omoguće masovno razmnožavanje (Gullino i sur., 2009). Nepovoljne uvjete, bakterija može preživjeti u tlu, ali i na biljnim ostacima, najmanje 7 mjeseci (Blancard, 2012), zatim na površini sjemenki rajčice te na površini kontaminirane mehanizacije i alata koji se koristi u proizvodnji rajčice. Navedeni načini preživljavanja predstavljaju potencijalne izvore inokuluma patogena za sljedeće usjeve (Gullino i sur., 2009). Blancard (2012) ističe da vrsta *P. syringae* pv. *tomato* može u područjima proizvodnje rajčice preživjeti na samoniklim

biljkama, na korijenu i listovima korovnih vrsta koje ne pripadaju porodici pomoćnica premda je raspon domaćina ove bakterije uzak i ograničen na rajčicu.

#### **2.3.2.6. Suzbijanje roda *Pseudomonas***

Primjena kemijskih baktericida za suzbijanje ove bolesti uzrokovala je neželjenu otpornost patogena i onečišćenje okoliša (Li i sur., 2017). Zbog značajne štetnosti, bakterijska pjegavost meta je brojnih studija o mjerama suzbijanja za zaštitu rajčice, uključujući biološku i kemijsku kontrolu. Zabilježeno je da neke bakterije, kao što su *Bacillus pumilus* i *B. amyloliquefacies* (Lanna Filho i sur., 2013; Li i sur., 2017) imaju sposobnost ograničiti uzročnika bakterijske pjegavosti rajčice, međutim antibakterijska učinkovitost mikroorganizma koji se koriste u svrhu biokontrole, ovisi o uvjetima okoliša koji su često nepovoljni što otežava korištenje bioloških metoda suzbijanja. Premda su kemijska sredstva (prema učinkovitosti) praktičnija i brža u suzbijanju bakterijske pjegavosti (Conlin, 1983; Li i sur., 2017), dugotrajna upotreba ovih biocida dovodi do otpornosti patogena (Bower i Daeschel, 1999; Louws i sur., 2001; Li i sur., 2017). Budući da su ostaci kemijskih sredstava u tlu i hrani štetni za okoliš i ljudsko zdravlje (Zhang i sur., 2011; Li i sur., 2017), potrebno je razviti alternativne baktericide za zaštitu rajčice od infekcija ovim ekonomski značajnim patogenom.

## 2.4. Bakterija *Escherichia coli* – kontaminant plodova rajčice

Osim ekonomski značajnih fitopatogena u uzgoju rajčice, negativni aspekt uzrokuje i patogena bakterija *Escherichia coli* O157:H7, koja kao kontaminant na svježe plodove dopijeva gnojdbom i navodnjavanjem kontaminiranom vodom (Ibekwe i sur., 2004). Bakterija *E. coli* pripada porodici *Enterobacteriaceae* i jedan je od najbolje okarakteriziranih mikroorganizama na svijetu, budući da je opsežno proučavan više od jednog stoljeća (Hufnagel i sur., 2015). Međutim, većina istraživanja usmjerena je na bakteriju *E. coli* uzgojenu u laboratorijskim uvjetima koji ne simuliraju vjerno njezino prirodno okruženje. Enterobakteriju *E. coli* prvi je izolirao Theodor Escherich iz uzorka ljudske stolice 1886. (Shulman i sur., 2007; Hufnagel i sur., 2015), nakon čega je otkriveno da je riječ o gram-negativnoj bakteriji ravnog štapićastog oblika, dimenzija 1,5 µm x 0,5 µm (Shiomi i sur., 2009) koja je najčešće pokretni peritrih iako su neki sojevi nepokretni (Mears i sur., 2014). Bakterija se prepoznaje po velikim okruglim sivkasto bijelim kolonijama glatke i vlažne površine koje razvija na NA (Rhodes, 1966). Glavna niša *E. coli* je donji crijevni trakt sisavaca, ptica i gmazova (Smith, 1965; Hufnagel i sur., 2015), zbog čega ne čudi da je optimalna temperatura rasta i razvoja ove bakterije 37 °C (Ron i Davis, 1971; Plank i Harvey, 1979). Kao fakultativni anaerob, bakterija *E. coli* može preživjeti i u prisutnosti i u odsutnosti kisika (von Wulffen i sur., 2016), povećavajući rizik od kontaminacije hrane (Tack i sur., 2017).

Poznato je da bakterija *E. coli* može dovesti do bolesti putem konzumacije kontaminiranog svježeg voća i povrća zbog čega je ova bakterija veliki problem u prehrambenoj industriji gdje predstavlja trajni izazov u sigurnosti hrane (Tack i sur., 2017; Zhang i sur., 2019). Svježi proizvodi su bili identificirani kao jedni od najrizičnijih namirnica povezanih s ovim patogenom. Nguyen i Carlin (1994) izvijestili su da je bakterija *E. coli* pronađena u salatama od sirovog voća i povrća, a konzumacija kontaminirane hrane dovodi do različitih gastrointestinalnih infekcija stoga je posebno opasan patogen za imunokompromitirane ljude (Rowe, 2009; Tack i sur., 2017). Bakterija *E. coli* indikatorski je mikroorganizam za onečišćenje vode fekalijama (Clesceri i sur., 1998; Gupta i Madramooto, 2017) zbog čega je takva voda za navodnjavanje potencijalni izvor kontaminacije svježeg voća i povrća (Ibekwe i sur., 2004; Gupta i Madramooto, 2017). Ulazak patogena u biljku mogao bi biti putem kontaminirane vode za navodnjavanje koja dolazi u kontakt s pučima na površini lista ili stabljike, kroz rane ili prskanjem kišnih kapi s površine tla (Gu i sur., 2011). Drugi mogući razlog kontaminacije mogu biti bioaerosoli (Pianetti i sur., 2004.) koji nastaju navodnjavanjem prskalicama. Ovi bioaerosoli s mikroorganizmima mogu ostati na biljci ili površini voća i povrća te uzrokovati kontaminaciju.



Solomon i sur. (2003) izvijestili su da je navodnjavanje prskalicama povezano s onečišćenjem usjeva i sugerirali su da ponovljeno izlaganje kontaminiranoj vodi, biljkama povećava populaciju bakterije *E. coli*.

Najčešća namirnica koja ima veliki rizik od kontaminacije bakterijom *E. coli* je rajčica budući da se konzumira diljem svijeta u sirovom ili prerađenom obliku. Svježa rajčica može biti kontaminirana patogenima i može rezultirati bolestima i epidemijama koje se prenose hranom. O tome svjedoče Guo i sur. (2001.) koji su izvijestili da je 1990. u Illinoisu, Michiganu, Minnesoti i Wisconsinu zabilježeno 176 slučajeva epidemija uzrokovanih hranom i povezanih s konzumacijom sirovih rajčica. Zbog kontinuiranog porasta bolesti koje se prenose hranom uzrokovanih konzumacijom sirovog povrća kao što je rajčica, potrebne su učinkovite antimikrobne mjere nakon berbe plodova (Shu i sur., 2021) s ciljem sprječavanja kontaminacije plodova bakterijom *E. coli*. Nedavna istraživanja (Zhang i sur., 2019) opisuju rezultate inaktivacije populacije bakterije *E. coli* na površini plodova korištenjem raznih spojeva s dekontaminirajućim učinkom. Premda su učinkovita u smanjenju unakrsne kontaminacije plodova bakterijom *E. coli*, sredstva za dekontaminaciju na bazi klora predstavljaju ograničenja jer njihova učinkovitost inaktivacije se brzo smanjuje (Praeger i sur., 2018.), a neke kemikalije su eksplozivne ili su iritansi (Ölmez i Kretschmar, 2009). Alternativni pristup dekontaminacije plodova od bakterije *E. coli* je primjena spojeva niske toksičnosti i visoke učinkovitosti pri niskim koncentracijama (Zhang i sur., 2019).

## 2.5. Boronske kiseline

Boronske kiseline pripadaju grupi organskih derivata bora izražene formulom  $RB(OH)_2$ . Za ove spojeve prijavljeno je da imaju biološke aktivnosti koje supresiraju muhe i gljivične organizme tj. imaju sposobnost inhibiranja određenih enzima koje izlučuju gljive kao uzročnici propadanja drva (Yalinkilic i sur., 1998) te su vrlo učinkovite u suzbijanju bakterija (Lee i sur., 2020). Posljednjih godina, sve veći interes za istraživanjem učinka boronskih kiselina povezan je s njihovim novim primjenama, od kojih su najvažnije njihova uporaba kao biološki aktivnih spojeva koji inhibiraju velik spektar gljiva i bakterija (Adamczyk-Woźniak i sur., 2012).

Boronske kiseline su enzimski inhibitori u stanicama gljiva i bakterija (Adamczyk-Woźniak i sur., 2012) zbog čega djeluju kao antibakterijski, antifungalni, antimalarijski (Adamczyk-Woźniak i sur., 2012) i antiprotozoalni lijekovi (Jacobs i sur., 2011; Adamczyk-Woźniak i sur., 2012). Učinak biološke aktivnosti boronskih kiselina u antikancerogenim, antibakterijskim i antivirusnim aplikacijama, također je dokazan (Trippier i McGuigan, 2010; Wieczorek i sur., 2014) zbog čega se široko primjenjuju u medicini i biologiji (Hall, 2011). U radu iz 2013., boronske kiseline se spominju kao novi antibiotici u medicini, a glavni razlog zbog kojeg su odabrane kao potencijalni lijekovi je nedostatak toksičnosti (Barquero, 2013).

Neki bakterijski sojevi stekli su otpornost na gotovo sve antibiotike kako u humanoj medicini tako i u fitomedicini, stoga su nova antibakterijska sredstva (kao što su boronske kiseline) presudni za suzbijanje rezistentnih bakterija deaktiviranjem mehanizma rezistencije tj. inhibicijom  $\beta$ -laktamaze (Breijyeh i sur., 2020).

### 2.5.1. Fenilboronska kiselina

Fenilboronska kiselina (eng. phenylboronic acid, PBA) ( $C_6H_7BO_2$ ) je komercijalno dostupan i farmaceutski prihvatljiv spoj poznat kao najjednostavniji derivat borne kiseline (eng. boric acid, BA) (Liu i sur., 1994) koji u određenim koncentracijama ima antibakterijski i antimikotički učinak na nekoliko vrsta humanih gljiva i bakterija (Freeman i sur., 2010), nije toksičan za okoliš (Yalinkilic i sur., 1998) i sisavce te ima antitumorski učinak (Marasović i sur., 2017). Poznato je da PBA stupa u interakciju s biološkim membranama raznih stanica, virusa, bakterija i gljiva putem ugljikohidrata koji čine staničnu membranu (Matsumoto i sur., 2009; Huang i sur., 2014). Temeljem navedenog, razvio se interes za ovu kiselinu što je dovelo do istraživanja Sebastian i Kolattukudy (1988) kojim je utvrđen antibakterijski učinak PBA koja je inhibirala aktivnost bakterijske cutinaze za 63 % i 80 % pri 0,07 % i 0,1 %. Novija istraživanja poseban naglasak u suzbijanju stavljaju na one spojeve koji su inhibitori  $\beta$ -laktamaze, enzima ključnog u razvoju otpornosti patogenih bakterija. Razna istraživanja (Kiener i Waley, 1978; Freeman i sur., 2010; González-Bello, 2017) otkrivaju da je PBA učinkovita protiv bakterija rezistentnih na beta-laktamske antibiotike budući da PBA djeluje kao inhibitor određenih beta-laktamaza. Zbog inhibicije aktivnosti laktamaza, PBA djeluje antibakterijski, iako u većim koncentracijama nego beta-laktamski antibiotici. Hipoteza Freemanovog istraživanja je da prilikom ulaska u stanicu, PBA se degradira do toksičnog fenilnog spoja, koji potom ubija stanicu (Freeman, 2010). Dokazan je i efikasan medicinski učinak PBA na kancerogene stanice gdje je pokazala snažniji učinak u usporedbi s BA (Bradke i sur., 2008; Marasović i sur., 2017).

Osim u humanoj medicini, istraživanjem Liu i sur. (1994) i Yalinkilic i sur. (1998) dokazan je antimikotički učinak PBA na pojedine bazidiomicetne gljive koje su uzročnici propadanja drva japanskog cedra (*Cryptomeria japonica*). Budući da je istraživanje pokazalo značajan antimikotički učinak na uzročnike propadanja drva u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, PBA se smatra sredstvom koje ima karakteristike potencijalnog sredstva za zaštitu drvenastih kultura od gljiva iz odjela Basidiomycota (Liu i sur., 1994). Osim antibakterijskog, istražen je antimikotički učinak PBA na dva gljivična uzročnika propadanja drva - *Trametes versicolor* (Linnaeus et Fries) Pilat i *Postia placenta* (Fries) M. Larsen et Lombard (Liu i sur., 1994). U preliminarnom laboratorijskom ispitivanju iz 1994., PBA se pokazala kao potencijalno sredstvo za zaštitu drveta od od basidiomycetnih gljiva koje dovode do propadanja drva. U radu Yalinkilic i sur. (1998), istražena je antimikotička i termiticidna učinkovitost PBA u drvu *Cryptomeria japonica*, a istraživanje je provedeno na gljivičnim uzročnicima propadanja drva- *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. i *Tyromyces palustris* (Berk. I Curt) Murr. te na podzemnom termitu *Coptotermes formosanus* Shiraki. Drvo

tretirano s 0,3 % PBA bilo je rezistentno na obje gljive koje uzrokuju propadanje drva dok je tretman s 1 % PBA, potpuno supresirao podzemnog termita (Yalinkilic i sur., 1998). Insekticidni učinak PBA dokazan je i u ranijim istraživanjima gdje rezultati potvrđuju antitermitska svojstva (Toriki i Furuse, 1988) te insekticidni učinak na muhe (Brotherton i sur., 1985). Također, istražen je antifungalni učinak PBA i na askomicetne gljivične patogene kao što su *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Fusarium solani*, *F. dimerum* i *Penicillium ochrochloron*. Istraživanje je provedeno difuzijskom agar metodom (Adamczyk-Woźniak i sur., 2012; Wieczorek i sur., 2014) kojom nije dokazana antifungalna aktivnost u korištenim koncentracijama (0,01 % PBA) (Wieczorek i sur., 2014), premda rezultati ranijeg istraživanja *in vitro* (Bonnen i Hammerschmidt, 1989), sugeriraju da primjerna 0,01 % PBA inhibira enzim kutinazu odgovoran za razgradnju polimernog dijela biljne kutikule - kutina u fitopatogenoj gljivi *Colletotrichum lagenarium*.

Osim letalnog učinka PBA, starija istraživanja testirala su utjecaj PBA na organogenezu nekoliko vrsta biljaka među kojima se ističe rajčica *Solanum lycopersicum* L. (Haccius i Garrecht, 1963; Mathan, 1965). U radu Milborrow (1962), navedeni su rezultati tretmana sjemena rajčice *Lycopersicum esculentum* var. Ailsa Craig s 0,01 % PBA koji pokazuju promjenu pigmentacije tj. posmeđenje listova klijanaca uslijed nedostatka bora. S druge strane, Odhnoff (1961) u svom istraživanju bilježi povišen sadržaj klorofila u biljkama graha kojima nedostaje bor, tretiranih s PBA. Temeljem sličnih morfoloških rezultata klijanaca rajčice tretiranih s PBA i BA, Odhnoffu (1961) navodi da se PBA ponaša kao "djelomično onemogućena BA". U istraživanju Odhnoffu (1961), tretirano je sjeme rajčice *Solanum lycopersicum* (var. Rheinlids Slava) što je dovelo do promjene u morfologiji listova klijanaca rajčice. Takozvana "lanceolatna blokada", inducirana je tretmanom sjemena rajčice s PBA, što se navodi kao "lanceolatni mutant" tj. "lanceolatni alelni razvojni poremećaj" (Haccius i sur., 1963). Istraživanje Haccius i Garrecht (1963) pokazuje da tretman klijavih sjemenki rajčice tretiranih s PBA dovodi do razvoja lanceolatnih listova koji nastaju kao prvi pravi listovi presadnica. Tretman klijavih sjemenki rajčice s PBA stimulirao je učinak mutiranog alela lanceolatnog gena u odnosu na indukciju listova lanceolata i na porast aktivnosti 4 oksidativnih enzima - tirozinaza, lakaza, peroksidaza i katalaza (Mathan, 1965). Primjena PBA kod klijavih sjemenki rajčice i presadnica uzrokuje smanjenje veličine listova, no zanimljivo je da zreli listovi tretirani s PBA ne pokazuju nikakve morfološke promjene u rastu i razvoju (Mathan, 1965).

Istraživanje Torsell-a (1956), rađeno s nekoliko supstituiranih derivata PBA, ne daju dokaze o sposobnosti te kiseline da omogući bor biljci. Tvrdnja da su PBA i njeni derivati aktivni kao izvori bora jer se razgrađuju do fenola i BA, malo je vjerojatno jer je PBA stabilna u vodenoj otopini i u kromato-grafičkim otapalima (Neales, 1967). Također, utvrđeno je kako

je PBA stabilna na hidrolizu tijekom autoklaviranja i skladištenja na sobnoj temperaturi u 1 % otopini. U istraživanjima iz 1994. i 1997., potvrđena je stabilnost PBA unutar drvenog matriksa (Liu i sur., 1994), što se nastavlja na rezultate analize ionske kromatografije vrućih vodenih ekstrakata obrađenog drva prije i nakon ispiranja koji potvrđuju da je PBA značajno otporna na ispiranje vodom unutar drvenog matriksa (Yalinkilic i sur., 1998). Navedene prednosti ističu karakteristike PBA kao konzervansa za drvene vrste biljaka (Liu i sur., 1994).

Osim navedenog, proučen je i negativan utjecaj PBA kao specifičnog kompetitora za bor (Matthes i sur., 2020) koji u biljaka, u određenim koncentracijama, uzrokuje deficit bora. U istraživanju iz 2004. navodi se kako je primjena PBA uzrokovala povećanje rasta korijena u borom ishranjenoj biljci graha (Bassil i sur., 2004), na što se referira istraživanje iz 2019. kojim je potvrđeno kako ishrana borom smanjuje deficit bora uzrokovan djelovanjem PBA (Housh i sur., 2020). Ulaskom u biljku, boronske kiseline (kao što je PBA) traže mjesta na koja bi se vezala i tako promijenile biološke procese u biljkama što često dovodi do mutacija. Bor konkurenti, kao što su BA i PBA, razlikuju se po tome što obje kiseline imaju isti afinitet vezanja za specifična mjesta u biljci (na mjesto bora), no BA za razliku od PBA, ne može zbog svog kemijskog oblika poslužiti za umrežavanje molekula (Matthes i Torres-Ruiz, 2017). Primijećeno je da je stupanj inhibicije klijanja peludi od strane PBA obrnuto proporcionalan koncentraciji bora, što znači da je PBA manje inhibirala klijavost polena pri većim koncentracijama bora. Razlog tomu je što se bor može učinkovitije natjecati s PBA za mjesta vezivanja bora, ali PBA ne može zamijeniti funkciju bora u procesu klijanja peludi petunije zbog problema u vezivanju molekule na mjesto gdje se veže bor (Bassil i sur., 2004). S druge strane, primjena PBA u grahu uzrokovala je produženje korijena čak i u prisutnost bora istovremeno promovirajući stabilizaciju stanične stijenke, što je inhibiralo prekomjernim izduživanjem korijena graha (Odhnoff, 1961; Bassil i sur., 2004). Međutim, rezultati sugeriraju da je smanjenje dužine primarnog korijena uzrokovano tretmanom PBA, zapravo posljedica nedostatka bora, a ne toksičnosti PBA (Housh i sur., 2019). Dodavanje BA djelomično je zaostavilo smanjivanje primarne duljine korijena uslijed djelovanja PBA. Riječ je o djelomičnom spasu, a ne potpunom spašavanju ko-inkubacije PBA s BA, što se može objasniti većom čvrstoćom vezanja PBA u usporedbi s BA (Housh i sur., 2019). To je izmijenilo izgled za konkurentno vezivanje bora u korist PBA. Housh i sur. (2019) navode da nakon što se PBA veže na B-vezivno mjesto unutar stanične stijenke biljke, BA se više ne može se ravnopravno natjecati s PBA jer je mjesto vezanja za BA izgubljeno. Ova činjenica objašnjava zašto samo velike količine BA mogu djelomično spasiti nedostatke B deficita uzrokovane primjenom PBA. Istodobno, koncentracija BA je ograničena jer povećanje koncentracije BA dovodi do simptoma toksičnosti u biljci. Ovu hipotezu

potkrepljuju prethodne studije s PBA, gdje su oštećenja uzrokovana s PBA samo djelomično ili uopće nisu spašena s dodatkom BA (Housh i sur., 2019).

Usprkos negativnim učincima PBA, izbjegavanje uvjeta koji dovode do negativnog učinka PBA na biljku (rana fenofaza biljke, nedovoljna ishrana borom i visoke koncentracije PBA), omogućuje istraživanje karakteristika PBA koje su zamijećene u radu Liu i sur. (1994).

## 2.5.2. Borna kiselina

BA ( $H_3BO_3$ ) je blaga organska Lewisova kiselina sa strukturnim značajkama sličnim ugljiku (Marasović i sur., 2017). Ova kiselina je učinkovita u suzbijanju gljiva i ksilofagnih insekata te se smatra netoksičnim spojem za ljude i okoliš, ako se koristi pod ograničenjem navedenim u Direktivi o biocidnim proizvodima 98/8 /EC (Europska komisija, 1998 cit. Palanti i sur., 2012). Spojevi bora, kao što je BA, imaju nižu toksičnost za ljude nego za neke životinjske vrste (Thévenon i sur., 2010), stoga se BA već duži niz godina smatra prihvatljivim spojem za okoliš. Pregledom literature, ustanovljeno je da se BA može pronaći u biljkama, uključujući gotovo sve plodove (Allen i Tankard, 1904).

Osim ekološkog aspekta, za BA je poznat antifungalni i antibakterijski učinak u veterini i humanoj medicini (Lopalco i sur., 2020). Iznenadujuće malo se zna o učincima BA, iako je riječ o najčešće korištenom antimikrobnom sredstvu u medicini. BA utječe na transformaciju hifa i razvoj biofilma, no čini se da je inhibicija oksidativnog mehanizma ključni protugljivični mehanizam ove kiseline (De Seta i sur. 2009). Toksični kemijski spojevi bazirani na boru mogu se razviti intracelularno, što je sugerirano postojanjem antibiotika koji sadrži bor – boromicina, tj. prirodne tvari izolirane iz bakterijskog roda *Streptomyces* (Kohn i sur., 1996). Sukladno tome, istraživanje Peppoloni i sur. (2020) potvrđuje antibakterijski učinak pri 0,3 % BA korištenjem metode mikrorazrijeđenja u mikrotitarskim pločicama na odabrane sojeve bakterija od kliničke i veterinarske važnosti, među kojima je *Pseudomonas aeruginosa*. Yılmaz (2012) je prvi objavio MIC BA za neke gram-pozitivne i gram-negativne humane sojeve bakterija gdje spominje da MIC za bakterijske vrste, kao što je *P. aeruginosa*, iznosi između 0,7 % i 1,5 % BA. Takav interval koncentracija BA, koje inhibiraju navedenu bakteriju, sugerira da različiti mediji i volumen mogu biti odgovorni za takve varijacije, kao što su primijetili Caroline i Campbell (1990).

Osim u humanoj medicini, BA pokazuje učinkovito djelovanje i u području fitomedicine. Borati, kao što je BA, već dugi niz godina dokazuju svoju učinkovitost kao sredstva za zaštitu drva širokog spektra djelovanja. BA ima brojne prednosti, uključujući to što je financijski dostupan spoj, bez mirisa, boje i nezapaljiv. Također, kiselina je topiva u vodi što omogućava unošenje u drvo konvencionalnim metodama poput difuzije ili obrade vakuumskim pritiskom (Thévenon i sur., 2010). Takvo svojstvo BA iskorišteno je u istraživanju *in vivo* čiji rezultati svjedoče da je visoka razina učinkovitosti BA zabilježena u suzbijanju basidiomicetne gljive *Trametes versicolor* (Palanti i sur., 2012). Ranija istraživanja *in vitro*, iznose da je maksimalna inhibicija rasta gljiva *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* i *P. expansum* postignuta aplikacijom 2 % BA, što je rezultiralo postotcima inhibicije od 44 %, 52 % i 61 % (Alubaidy i sur., 2007). S druge strane, BA je

uzrokovala nagli porast rasta micelija *Alternaria alternata* pri nižim koncentracijama od 0,01 % i 0,02 %, ali je usporila rast micelija pri 0,09 %. Utvrđeno je da su rast, sporulacija i klijanje spora gljive *A. alternata* posebno tolerantni na BA. Narančin ekstrakt sadrži iznenađujuće velike količine BA u usporedbi s drugim mineralima, što može objasniti afinitet *A. alternata* prema BA u hranjivom mediju (Singh i Khanna, 1969). U istraživanju *in vitro*, među ispitanim biljnim ekstraktima, testirana je BA u inhibiciji rasta micelija *Alternaria solani* korištenjem metode *poisoned food* (Grover i Moore, 1962). Istraživanjem Bhalerao i sur. (2019), utvrđen je fungistatički učinak BA na *A. solani* u koncentraciji od 1 % i 2 %. Pet različitih kemikalija, među kojima je i BA, testirane su *in vitro* radi njihovog učinka na rast i klijanje spora uzročnika koncentrične pjegavosti rajčice - vrste *Alternaria* sp. (Patel i sur., 2005). Rezultati istraživanja *in vitro*, gdje je otopina suspenzije spora *Alternaria* sp. pomiješana pojedinačno u istom volumenu s istraženim koncentracijama otopine BA, pokazuju da je BA u visokoj koncentraciji od 2,5 % reducirala klijanje spora *Alternaria* sp. za 44 %, u koncentraciji od 5 % BA za 39 % i u koncentraciji od 10 % BA za 36 % u odnosu na kontrolu nakon 48 sati. Također, promjer lezija uzrokovanih patogenom gljivom *Alternaria* sp. u pred tretmanu (aplikacija BA 12 sati prije inokulacije ploda patogenom), smanjen je za 77 %, dok je u post tretmanu (inokulacija ploda patogenom 12 sati prije aplikacije BA) na hranjivom mediju, reduciran za 57 % u odnosu na kontrolu (Patel i sur., 2005).

Osim fitopatogenih gljiva, BA je korištena u suzbijanju gljivične infekcije u akvatičnim uvjetima. Saprolegnioza je globalno rasprostranjena gljivična infekcija koja pogađa slatkovodne ribe i njihova jaja (Ali i sur., 2019). Istraživanja pokazuju visoku smrtnost i naknadne ekonomske godišnje gubitke riba od infekcija saprolegnijom. Većina terapeutanata u suzbijanju infekcija uzrokovanih *Saprolegnia* sp. su neučinkovite, a neke imaju negativan utjecaj na okoliš. Istraživanjem *in vitro* iz 2019., testirana je sposobnost BA da inhibira infekciju saprolegnijom te je zabilježena potpuna inhibicija rasta vrste *Saprolegnia hyphae* primjenom BA u koncentraciji  $\geq 0,6$  % (Ali i sur., 2019).

Rezultati folijarne aplikacije na zrelih rajčicama u radu Roy i sur. (2020), sugeriraju da 0,01% BA ima pozitivan utjecaj na visinu, broj listova, rast, cvatnju, prinos i kvalitetu rajčice u odnosu na 0,02 %. Dakle, osim inhibitornog učinka BA na razne vrste gljivičnih i bakterijskih patogena, zabilježen je pozitivan učinak u određenoj koncentraciji na rajčicu što omogućuje korištenje ovog spoja u planiranom istraživanju.



### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. Prikupljanje biljnog materijala

U nasadu u Gornjem Laduču, prikupljen je biljni materijal rajčice (lat. *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers) sa simptomima ekonomski značajnih patogena: gljive *Alternaria* sp. i bakterije *Pseudomonas* sp. Od lipnja do srpnja, nasumično su sakupljeni listovi sa simptomima navedene gljivične i bakterijske bolesti.

U vrijeme dozrijevanja plodova, u istom nasadu su prikupljeni plodovi "cherry" rajčice (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) (plodovi do 8 g prema protokolu metode Zhang i sur., 2019). Uzorci prikupljenog biljnog materijala dopremljeni su u laboratorij Zavoda za fitopatologiju, Sveučilište u Zagrebu Agronomskog fakulteta gdje su testirani.

#### 3.2. Izolacija gljivičnog uzročnika bolesti rajčice

Prikupljeni zaraženi lisni materijal površinski je steriliziran potapanjem u etanol (70 %) u trajanju od 1 min nakon čega je ispran sterilnom destiliranom vodom. Površinski steriliziran biljni materijal postavljen je na PDA i u vlažnu komoru, u uvjete *in vitro*. Petrijevke s biljnim materijalom inkubirane su radi stimulacije rasta patogena, u komori za uzgoj mikroorganizama uz termostatski kontrolirane optimalne uvjete tj. na 25 °C, u mraku. Po završetku inkubacije, reprezentativne kolonije su odabrane i pročišćene ponovljenim nanošenjem na PDA prema metodi Mitchell (1997), kako bi se dobila čista kultura patogena u svrhu provedbe molekularne i morfološke analize patogena. Postupak izolacije gljivičnog uzročnika bolesti rajčice iz simptomatskog biljnog materijala, prikazan je shematski (Slika 3.1).



Slika 3.1 Prikaz provedbe izolacije gljivičnog uzročnika koncentrične pjegavosti rajčice (original).

### 3.2.1. Morfološka determinacija gljive *Alternaria* sp.

Determinacija gljive *Alternaria* sp. provedena je istraživanjem makroskopskih i mikroskopskih karakteristika prema Nagrale i sur. (2013). Morfološke karakteristike gljivičnog patogena koji inficira rajčicu, zapažene su istraživanjem rasta i razvoja kulture na 3 različita hranjiva medija (PDA, MEA, TJA) u trajanju do 10 dana, na 25 °C, sa svjetlosnim režimom - 16 sati bijele svijetlosti / 8 sati mraka.

U sterilizirane petrijevke (Ø 9 cm) uliven je hranjiv medij. Nakon skrućivanja medija, petrijevke su inokulirane u središtu micelarnim diskom (Ø 10 mm) izrezanim kružnim sjekačem iz 7 dana starih kultura. Nacijepljene petrijevke su inkubirane u klima komori na 25 °C, sa svjetlosnim režimom - 16 sati bijele svijetlosti / 8 sati mraka. Rast kolonija gljive bilježen je svakih 48 sati do 6. dana rasta, a karakteristike konidiofora i konidija zabilježene su 4. dana, dok su morfološka obilježja hlamidospora istražena 10. dana od naciepljivanja gljive. Rast micelija, veličina konidiofora, konidija i hlamidospora istražene su svjetlosnim mikroskopom (SZ BH 021 Olympus BH, Japan) ( $\approx 1000 \times$ ) i stereomikroskopom (SZ ST 4045, Olympus, Japan) ( $\approx 250 \times$ ). Strukture su uslikane, a prosjeci veličina promatranih struktura su izmjereni računalnim programom *ImageJ* (izmjeri provjereni postavljanjem skale računalnog programa na temelju mikroskopske skale na okularu) na temelju 30 opažanja svake navedene strukture, snimljenih s 5 različitih mikroskopskih preparata od 10 nasumično odabranih struktura sa svakog preparata.

### 3.2.2. Molekularna identifikacije gljive *Alternaria* sp.

#### 3.2.2.1. Ekstrakcija DNA vrste *Alternaria* sp.

Za provedbu DNA ekstrakcije, micelij izolata gljive *Alternaria* sp. inokuliran je u središte petrijevke s prethodno izlivenim PDA i postavljenim steriliziranim celofanom. Nacijepljene petrijevke inkubirane su u klima komori na 25 °C, u mraku. Nakon 4 dana, genomski DNA vrste *Alternaria* sp. izoliran je prema metodi Elias i sur. (2004) koristeći CTAB (3 %) pufer. Micelij, uzgojen na PDA tj. na celofanu, je sakupljen i usitnjen u prah uporabom tučka i tarionika, uz dodatak tekućeg dušika. Oko 70 mg praha je odvagano u 1,5 ml mikrocentrifugalnu tubicu. U tubicu koja sadrži prah micelija gljive, dodan je CTAB pufer (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 3% PVP-40) za lizu u količini 800  $\mu$ l te 24  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanola (Sigma- Aldrich, Njemačka). Sadržaj tubice je "vorteksiran" i inkubiran na 65 °C na miješalici (Thermomixer comfort, Eppendorf,

Njemačka) u trajanju od 1 sata. Tijekom inkubacije, tubica je invertirana 3 puta. Kloroform-isoamil alkohol (Sigma- Aldrich, Njemačka) (24:1) dodan je u količini 500 µl u tubicu koja je zatim "vorteksirana" u trajanju od 1 min. Lizat je centrifugiran 10 minuta na 8000 rpm. Supernatant u količini 500 µl, pipetiran je u novu mikrocentrifugalnu tubicu (1,5 ml) u koju je dodano 500 µl kloroform- isoamil alkohola i 200 µl CTAB (3 %) pufera. Sadržaj nove tubice je centrifugiran 10 minuta na 8 000 rpm. Supernatant u količini 500 µl, iz tubice je pipetiran u novu mikrocentrifugalnu tubicu (1,5 ml) nakon čega je dodano 350 µl ohlađenog (na - 20 °C) isopropanola (Sigma- Aldrich, Njemačka) te pomiješano tijekom pipetiranja. Sadržaj tubice je centrifugiran 10 minuta na 8 000 rpm. Nakon centrifugiranja, na dnu tubice sadržana je genomska DNA u obliku peleta. Iz tubice je izvučen tekući sadržaj, a tubica s peletom na dnu je postavljena u laminar na sušenje u trajanju od 10 min kako bi ostatak alkohola ispario. Nakon sušenja peleta, u tubicu je pipetirano 100 µl TE pufera 10X (Sigma- Aldrich, Njemačka). Tubica s genomskom DNA i puferom postavlja se na inkubaciju na 37 °C na miješalicu, u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije, genomska DNA je uskladištena na -20 °C sve do ponovne upotrebe.

### **3.2.2.2. PCR amplifikacija DNA odsječaka vrste *Alternaria* sp.**

Odsječci DNA gljivične vrste *Alternaria* sp., amplificirani su koristeći par primera; ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') i ITS2 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') (White i sur., 1990) te ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') i ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3') (White i sur., 1990) prema metodi Zheng i sur., (2015).

PCR amplifikacija provedena je u reakcijskoj smjesi (25 µl) koja sadrži 2,5 µl CoralLoad PCR Buffer 10X (Qiagen, Njemačka), 8,5 µl Q- solution 5X (Qiagen, Njemačka), 1,25 µl smjese primera (svaki primer 10 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (Qiagen, Njemačka), 0,125 µl Hot Star Taq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Njemačka), 15,125 µl UP H<sub>2</sub>O i 0,5 µl uzorka DNA.

Uvjeti PCR reakcije sastoje se od početne denaturacije u trajanju od 5 minuta na 94 °C, zatim slijedi 35 ciklusa denaturacije na 94 °C od 40 sekundi, sparivanje početnica (primera) na 58 °C u trajanju od 40 sekundi te produljivanje DNA lanca na 72 °C u trajanju od 1 minuta, nakon čega je amplifikacija završena s jednim ciklusom konačnog produljenja na 72 °C u trajanju od 10 minuta (Zheng i sur., 2015). PCR metoda provedena je u uređaju za provedbu PCR reakcije – MasterCycler Thermal Cycler (Eppendorf, Njemačka).

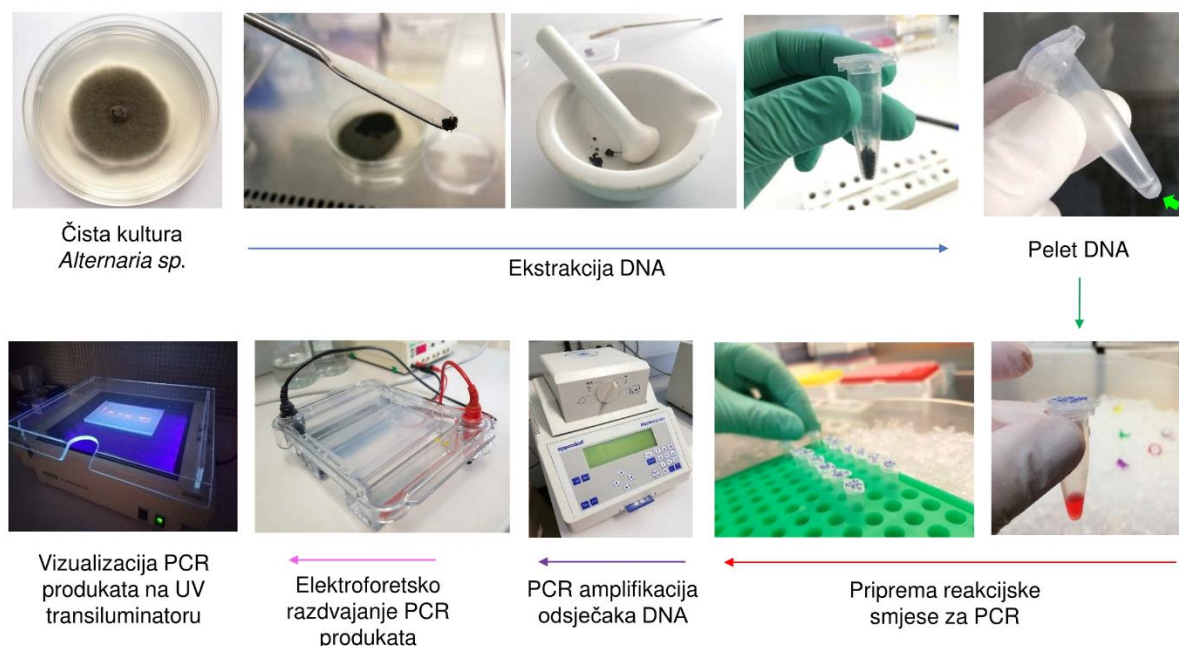
### 3.2.2.3. Vizualizacija PCR produkata vrste *Alternaria* sp.

Za potrebe vizualizacije PCR produkata, provedeno je razdvajanja produkata prema veličini DNA odsječaka metodom elektroforeze. U svrhu provedbe elektroforeze, korišteno je 2 µl uzorka amplificirane DNA vrste *Alternaria* sp. postavljenog na 1,5 % agarozni gel s dodatkom 10 X TBE pufera (Sigma- Aldrich, Njemačka). Prilikom izrade agaroznog gela za elektroforezu, u gel je pipetirano 10 µl GelRed (Olerup, Švedska) u svrhu obojenja i vizualizacije odsječaka pomoću uređaja UV -Transiluminator 2000 (Biorad, SAD). Metoda je provedena na 90 V u trajanju od 60 minuta. Približna veličina amplificiranih odsječaka procijenjena je usporedbom s 100 bp ljestvice DNA (Gel Pilot, 100 bp Plus DNA Ladder, Qiagen, Njemačka).

Postupak provedbe molekularne identifikacije vrste roda *Alternaria*, prikazan je shematski (Slika 3.2).

### 3.2.2.4. Analiza sekvenci vrste *Alternaria* sp.

Nukleotidne sekvence DNA odsječaka usklađene su koristeći Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), verzija 5.10. Prednji i nasuprotni DNA odsječak su provjereni i uređeni prema potrebi u programu BioEdith, verzija 7.2. Nakon nastanka konsenzusnog odsječaka iz svakog poravnavanja, odsječci su uspoređivani s odsječcima iz GenBank-baze koristeći Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

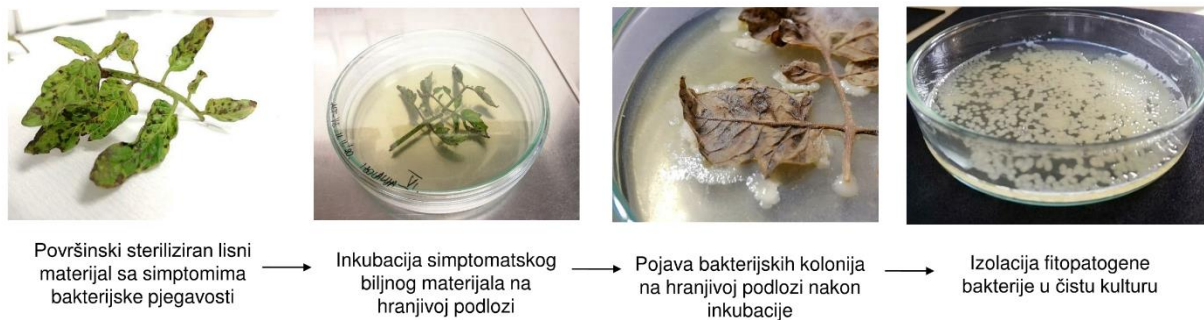


Slika 3.2 Prikaz provedbe molekularne identifikacije gljivične vrste *Alternaria* sp. konvencionalnom PCR metodom (original).

### 3.3. Izolacija bakterijskog uzročnika bolesti rajčice

Zaraženi lisni materijal sa simptomima bakterijske pjegavosti, površinski je steriliziran potapanjem u etanol (70 %) u trajanju od 1 min nakon čega je ispran sterilnom destiliranom vodom. Površinski steriliziran biljni materijal postavljen je na standardni hranjivi medij (NA) i na poluselektivni medij King B (KB), u uvjete *in vitro*. Petrijevke s biljnim materijalom inkubirane su radi stimulacije rasta patogena, u komori za uzgoj mikroorganizama, uz termostatski kontrolirane optimalne uvjete od 28 °C, u mraku. Nakon inkubacije, reprezentativne kolonije su odabrane i pročišćene ponovljenim nanošenjem na NA. Kolonije izraslih patogena izolirane su u čistu kulturu prema Mitchell (1997) u svrhu provedbe molekularne i morfološke analize patogena.

Postupak izolacije bakterijskog uzročnika bolesti rajčice, prikazan je shematski (Slika 3.3).



Slika 3.3 Prikaz provedbe izolacije bakterijskog uzročnika bakterijske pjegavosti rajčice (original).

### 3.3.1. Morfološka determinacija bakterije *Pseudomonas* sp.

U svrhu morfološke determinacije bakterije *Pseudomonas* sp., istražene su makroskopske karakteristike kolonije bakterije uzgojene na različitim hranjivim medijima (NA, KB, NSA) te su provedeni biokemijski test (KOH- test) i test produkcije fluorescentnog pigmenta prema Gormez i sur. (2013). Suspenzija bakterije *Pseudomonas* sp. dobivena metodom serijskog razrijeđenja ( $10^5$  CFU/ml), ravnomjerno je nanjena staklenim etalerom pojedinačno u sterilne petrijevke ( $\varnothing$  9 cm) koje sadrže različite hranjive medije (NA, KB, NSA). Nacijepljene petrijevke s bakterijskim uzročnikom su inkubirane u klima komori na 28 °C, u mraku. Nakon 72 sata, zabilježen je rast kolonija bakterije *Pseudomonas* sp. na različitim hranjivim medijima.

Proveden je KOH test na način da je na predmetno mikroskopsko stakalce postavljena kap 3% otopine kalijevog hidroksida u koju je emulgirano nekoliko kolonija bakterioznog patogena. Neprestanim miješanjem u trajanju od 60 sekundi, nježno je povučena petlja od suspenzije.

Kako bi se provjerila produkcija fluorescentnog pigmenta, serijski razrijeđena suspenzija ( $10^5$  CFU/ml) izolirane bakterije, nacijepljena je na KB. Nakon inkubacije petrijevki na 28 °C, u mraku, u trajanju od 72 sata, petrijevke su postavljene na UV-transiluminator pomoću kojeg je vizualno zabilježena procjena produkcije fluorescentnog pigmenta.

### 3.3.2. Molekularna identifikacije bakterije *Pseudomonas* sp.

#### 3.3.2.1. Ekstrakcija DNA vrste *Pseudomonas* sp.

Kako bi se provela DNA ekstrakcija, suspenzija bakterijskog izolata *Pseudomonas* sp. serijski je razrijeđena i nacijepljena u petrijevke na prethodno izlivenu hranjivu podlogu NA. Nacijepljene petrijevke su inkubirane u klima komori na 28 °C, u mraku. Nakon 72 sata, genomska DNA vrste *Pseudomonas* sp. izolirana je prema metodi Elias i sur. (2004) koristeći CTAB (3 %) pufer. Polovica petrijevke s kolonijama bakterije uzgojene na NA, prikupljene su laboratorijskom ezom i prenesene u mikrocentrifugalnu tubicu u koju je prethodno pipetiran 1 ml sterilne destilirane vode. Tubica s bakterijskom suspenzijom centrifugirana je na 10 000 rpm u trajanju od 10 min kako bi se bakterijske stanice nataložile u dnu tubice. Nakon centrifugiranja, tekući dio je uklonjen pipetom, a na talog bakterijskih stanica pipetirano je 800 µl CTAB (3 %) pufera za lizu i 24 µl β-mercaptoethanola. Sadržaj tubice je "vorteksiran" i inkubiran na 65 °C na miješalici (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) u trajanju od 1 sata. Tijekom inkubacije, tubica je invertirana 3 puta. Kloroform-isoamil alkohol (Sigma- Aldrich, Njemačka) (24:1) dodan je u količini 500 µl u tubicu koja je zatim "vorteksirana" u trajanju od 1 min. Lizat je centrifugiran 10 minuta na 8 000 rpm. Supernatant u količini 500 µl, pipetiran je u novu mikrocentrifugalnu tubicu (1,5 ml) nakon čega je dodano 500 µl kloroform- isoamil alkohola i 200 µl CTAB (3 %) pufera. Sadržaj nove tubice je centrifugiran u trajanju od 10 minuta na 8 000 rpm. Supernatant u količini 500 µl iz tubice, pipetiran je u novu mikrocentrifugalnu tubicu (1,5 ml) nakon čega je dodano 350 µl isopropanola (Sigma- Aldrich, Njemačka) ohlađenog na - 20 °C te pomiješano tijekom pipetiranja. Sadržaj tubice je centrifugiran 10 minuta na 8 000 rpm. Nakon centrifugiranja, na dnu tubice nalazila se genomska DNA u obliku peleta. Iz tubice je izvučen tekući sadržaj, a tubica s peletom na dnu je postavljena u laminar na sušenje u trajanju od 10 min kako bi ostatak alkohola ispario. Nakon sušenja peleta, u tubicu je pipetirano 100 µl 10X TE pufera (Sigma- Aldrich, Njemačka). Tubica s genomskom DNA i puferom postavljena je na inkubaciju na 37 °C na miješalicu, u trajanju od 30 min. Nakon inkubacije, genomska DNA je uskladištena na -20 °C sve do ponovne upotrebe.

### 3.3.2.2. PCR amplifikacija DNA odsječaka vrste *Pseudomonas* sp.

DNA odsječci vrste *Pseudomonas* sp. amplificirani su koristeći par primera; Pst\_F 5'-ATG ATC GGA GCG GAC AAG 3' i Pst\_R 5' GCT CTT GAG GCA AGC ACT 3' (Guilbaud i sur., 2015) prema metodi Guilbaud i sur. (2015).

PCR amplifikacija provedena je u reakcijskoj smjesi (25 µl) koja sadrži 2,5 µl CoralLoad PCR Buffer 10X (Qiagen, Njemačka), 8,5 µl Q- solution 5X (Qiagen, Njemačka), 1,25 µl smjese primera (svaki primer 10 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (Qiagen, Njemačka), 0,125 µl Hot Star Taq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Njemačka), 15,125 µl ultra pure H<sub>2</sub>O i 0,5 µl uzorka DNA.

Uvjeti PCR reakcije sastoje se od početne denaturacije u trajanju od 5 minuta na 96 °C, zatim slijedi 30 ciklusa denaturacije na 94 °C od 30 sekundi, sparivanje početnica (primera) na 61 °C u trajanju od 30 sekundi te produljivanje DNA lanca na 72 °C u trajanju od 30 sekundi, nakon čega je amplifikacija završena s jednim ciklusom konačnog produljenja na 72 °C u trajanju od 10 minuta (Guilbaud i sur., 2015). PCR metoda provedena je u uređaju za provedbu PCR reakcije – MasterCycler Thermal Cycler (Eppendorf).

### 3.3.2.3. Vizualizacija PCR produkata vrste *Pseudomonas* sp.

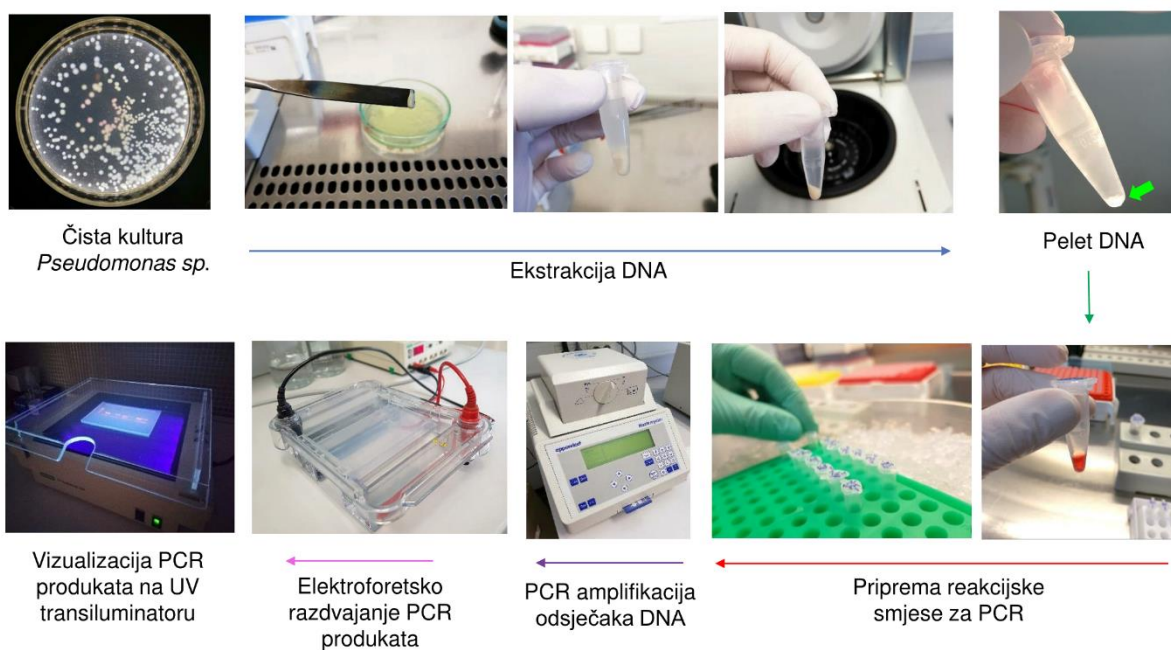
U svrhu provedbe vizualizacije PCR produkata, provedena je metoda razdvajanja PCR produkata prema veličini odsječaka DNA, elektroforezom. U svrhu provedbe elektroforeze, korišteno je 2 µl uzorka amplificirane DNA vrste *Pseudomonas* sp. postavljene na 1,5 % agarozni gel s dodatkom 10 X TBE pufera. Prilikom izrade agaroznog gela za elektroforezu, u gel je pipetirano 10 µl GelRed (Olerup, Švedska) u svrhu obojenja i vizualizacije odsječaka pomoću UV -Transilluminator 2000 (Biorad, SAD). Metoda je provedena na 90 V u trajanju od 60 minuta. Približna veličina amplificiranih područja je procijenjena usporedbom sa 100 bp ljestvice DNA (Gel Pilot, 100 bp Plus DNA Ladder, Qiagen, Njemačka).

Postupak provedbe molekularne identifikacije vrste roda *Pseudomonas*, prikazan je shematski (Slika 3.4).



### 3.3.2.4. Analiza sekvenci vrste *Pseudomonas sp.*

Nukleotidne sekvence DNA odsječaka usklađene su koristeći Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), verzija 5.10. Prednji i nasuprotni DNA odsječak su provjereni i uređeni prema potrebi u programu BioEdith, verzija 7.2. Nakon nastanka konsenzusnog odsječka iz svakog poravnavanja, odsjecci su uspoređivani s odsječcima iz GenBank-baze koristeći Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).



Slika 3.4 Prikaz provedbe molekularne identifikacije bakterijske vrste *Pseudomonas sp.* konvencionalnom PCR metodom (original).

### 3.4. Sjetva i uzgoj biljaka domaćina

Sjetva i uzgoj domaćinskih biljaka rajčice (lat. *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers) provedena je u plasteniku Zavoda za fitopatologiju, Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta (Slika 3.5). Sjeme rajčice je posijano u 2 tegle (80 x 17 x 14 cm) u svrhu klijanja. Presadnice su presađene u plastične teglice (Ø 10 cm) koje su sadržavale ekološki supstrat (Substral Naturen Bio, Salzburg, Austrija) do razine ruba taglice i uzgajane u optimalnim uvjetima za rast i razvoj prema Shamshiri i sur. (2018). Zalijevanje biljaka provodilo se jednom dnevno ili prema potrebi, ručnim zalijevanjem. Prihranjivanje biljaka provedeno je prema preporukama proizvođača organskog tekućeg gnojiva za rajčice (Celaflor Naturen, Salzburg, Austrija). S ciljem neometanog horizontalnog rasta i razvoja, biljke su povezane vezicama za tanki drveni potporanj sukladno fenofazi razvoja u kojoj je to bilo potrebno.

Nakon postavljanja pokusa, biljke su prostorno izolirane s ciljem izbjegavanja unakrsnih infekcija između kontrolnih i test biljaka. Tijekom uzgoja u zatvorenom prostoru, suzbijanje patogena i štetnika provodilo se bez primjene pesticida, mehaničkim uklanjanjem simptomatičnih biljaka. Biljke rajčice u fenofazi razvoja 9. pravog lista, korištene su za istraživanje *in vivo* u svrhu izbjegavanja rane faze razvoja rajčice koja bi mogla dovesti do eventualnog negativnog učinka PBA na rajčicu.

Također, kultivar "Rutgers" je odabran kao indikatorska test biljka jer ima izraženu hipersenzitivnu reakciju uslijed infekcije patogenima i osjetljivost na nedostatak bora, a temeljni razlog odabira je uočena osjetljivost kultivara nakon izolacije gljive *Alternaria* sp. i *Pseudomonas* sp. iz prirodno zaraženih "Rutgers" rajčica uzgojenih u poljskim uvjetima.



Slika 3.5 Uzgoj rajčica u plasteniku; sjetva (A); presadnice (B) (original).

### 3.5. Pokusi *in vitro*

Za potrebe istraživanja u laboratorijskim uvjetima, korišteni su determinirani izolati – gljiva *A. alternata* i bakterija *P. syringae* pv. *tomato* koji se čuvaju u zbirci Zavoda za fitopatologiju, Agronomskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu te izolat kontaminirajuće bakterije *Escherichia coli* iz zbirke Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

#### 3.5.1. *Poisoned food* metoda

U prvom pokusu *in vitro* istražena je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) PBA koja ima letalan učinak na patogene u uzgoju rajčice. MIC je najniža koncentracija antimikrobnog sredstva (mg/L) koja, u definiranim uvjetima *in vitro*, sprječava pojavu vidljivog rasta mikroorganizma unutar definiranog vremenskog razdoblja što donosi podatke o osjetljivosti mikroorganizma na antimikrobno sredstvo i pomaže u donošenju odluka o suzbijanju (EUCAST, 2003). MIC za PBA određena je prema modificiranoj metodi Qadoos i sur. (2016) - *poisoned food* (Grover i Moore, 1962) za gljivičnog patogena *A. alternata*, bakterijskog patogena *P. syringae* pv. *tomato* i kontaminirajuću bakteriju *E. coli*.

##### 3.5.1.1. Priprema inokuluma izolata

Prema protokolu metode, gljivični izolat *A. alternata* uzgojen je na PDA na 25 °C u svjetlosnom režimu (16 sati bijele svjetlosti / 8 sati mraka) i trajanju inkubacije od 7 dana u klima komori, u svrhu stimulacije rasta i razvoja gljive. Bakterijski izolat *P. syringae* pv. *tomato* uzgojen je na KB na 28 °C, dok je izolat kontaminirajuće bakterije *E. coli* uzgojen na NA, na 35 °C. Oba bakterijska izolata inkubirana su 72 sata u navedenim uvjetima u svrhu rasta i razvoja kolonija, u klima komori.

Nakon inkubacije svakog pojedinog izolata, pripremljen je inokulum. Kako bi se istražila MIC PBA koja ima antimikotički učinak na patogena *A. alternata*, iz čiste kulture gljive stare 7 dana, kružnim sjekačem (Ø 5 mm) izrezani su micelarni diskovi (inokulum gljive) za daljnje istraživanje. U svrhu testiranja MIC PBA koja ima antibakterijski učinak na patogena *P. syringae* pv. *tomato*, pripremljena je bakterijska suspenzija (inokulum bakterije) metodom serijskog razrijeđenja koja iznosi  $5,6 \times 10^6$  CFU/ml. Istom metodom, bakterijska suspenzija je pripremljena i za kontaminirajuću bakteriju *E. coli* ( $7,5 \times 10^8$  CFU/ml) u svrhu testiranja MIC PBA koja ima antibakterijski učinak.

### 3.5.1.2. Priprema raspona koncentracija kiselina

U pokusu je korištena PBA (Sigma-Aldrich, SAD) u širokom rasponu koncentracija (0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 % i 0,3 %). U 50 ml sterilne destilirane vode otopljeno je 0,5 mg PBA kako bi se dobila otopina od 1 % PBA. Temeljem faktora razrijeđenja, pripravljena otopina 1 % PBA pipetirana je u određenom volumenu u 50 ml tekuće hranjive podloge dostatne za ravnomjerno izlijevanje jedne varijante hranjive podloge, ukupno u 3 repeticije. Isti postupak, ponovljen je za BA (Sigma-Aldrich, SAD).

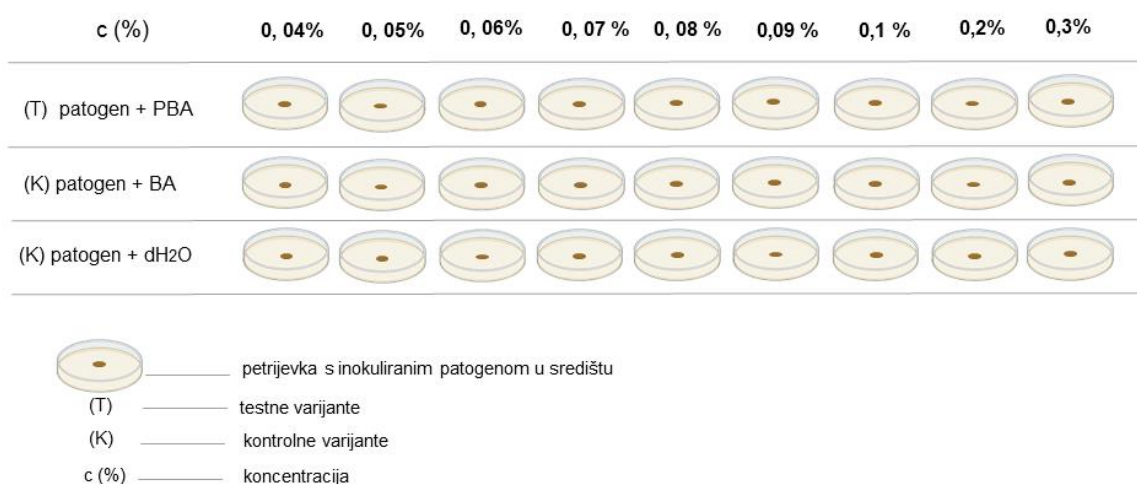
### 3.5.1.3. Postavljanje pokusa i način očitavanja rezultata

Prema protokolu modificirane metode *poisoned food* (Grove i Moore, 1962; Qadoos i sur., 2016) micelarni diskovi gljive *A. alternata* postavljaju se u središte petrijevki koje sadrže izliven i ohlađen PDA supstrat u koji je prethodno inkorporiran raspon koncentracija PBA. U kontrolne petrijevke je umjesto raspona koncentracija PBA, korišten raspon koncentracija BA i sterilne destilirane vode.

Pripremljena bakterijska suspenzija patogena *P. syringae* pv. *tomato* ( $5,6 \times 10^6$  CFU/ml), pipetirana je u središte petrijevki koje sadrže prethodno inkorporiran raspon koncentracija PBA u hranjiv medij KB te je ravnomjerno nanescena po površini medija staklenim etalerom. U kontrolnim petrijevkama je umjesto raspona koncentracija PBA, korišten raspon koncentracija BA i sterilne destilirane vode. Isti postupak ponovljen je sa suspenzijom kontaminirajuće bakterije *E. coli* ( $7,5 \times 10^8$  CFU/ml).

Pokus je za svakog patogena postavljen pojedinačno u 27 varijanti i 3 repeticije (Slika 3.6). Očitavanja rezultata provedena su 5. dan za gljivičnog i 3. dan za bakterijske patogene od inokulacije patogena, fotografiranjem (mobilnim uređajem Samsung Galaxy S8) izraslih kolonija u petrijevkama na način da je objektiv postavljen okomito (udaljenost 40 cm) u odnosu na petrijevku ("ptičja perspektiva").

Očitavanje rasta micelija gljive provedeno je pomoću računalnog programa *ImageJ* (Schneider i sur., 2012) prema Guzmán i sur. (2014) na način da je mjerena ukupna površina micelija gljive. Na isti način su bakterijske kolonije izbrojane (kako bi se dobio ukupan broj kolonija) i izmjerena je ukupna površina bakterijskih kolonija (kako bi se dobila ukupna veličina kolonija).



Slika 3.6 Shematski prikaz metode testiranja rajčice *in vitro* - poisoned food metoda prema Qadoos i sur. (2016) (original).

### 3.5.2. Metoda inaktivacija kontaminirajuće bakterije *Escherichia coli* ispiranjem plodova rajčice

U drugom pokusu *in vitro* testirana je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) PBA koja ima antibakterijski učinak na bakteriju *E. coli* u Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. Inaktivacija bakterije *E. coli* ispiranjem sa svježih plodova provedena je prema modificiranoj metodi Zhang i sur. (2019).

#### 3.5.2.1. Priprema suspenzije izolata

U svrhu testiranja MIC PBA koja ima antibakterijski učinak na kontaminirajuću bakteriju *E. coli*, pripremljena je bakterijska suspenzija metodom serijskog razrijeđenja ( $7,9 \times 10^8$  CFU/ml) iz kulture *E. coli* inkubirane u klima komori na KB i na 35 °C, u trajanju od 72 sata.

### 3.5.2.2. Priprema raspona koncentracija kiselina

Temeljem određene MIC PBA iz prvog pokusa *in vitro*, pripravljena je PBA u određenom rasponu koncentracija ( $1/2$  MIC, 1 MIC, 2 MIC, 3 MIC). U 50 ml sterilne destilirane vode otopljeno je 0,5 mg PBA kako bi se dobila otopina 1 % PBA. Temeljem faktora razrijeđenja, pripravljena otopina 1 % PBA pipetirana je u određenom volumenu u 50 ml sterilne destilirane vode. Isti postupak ponovljen je za kontrolnu BA. Raspon koncentracija MIC kiselina pripremljen je u plastičnim ependorf tubicama (50 ml) koje su prethodno autoklavirane. Za provedbu metode, pripravljena je kontrolna otopina 1 % etanola (Zhang i sur., 2019) i sterilne destilirane vode.

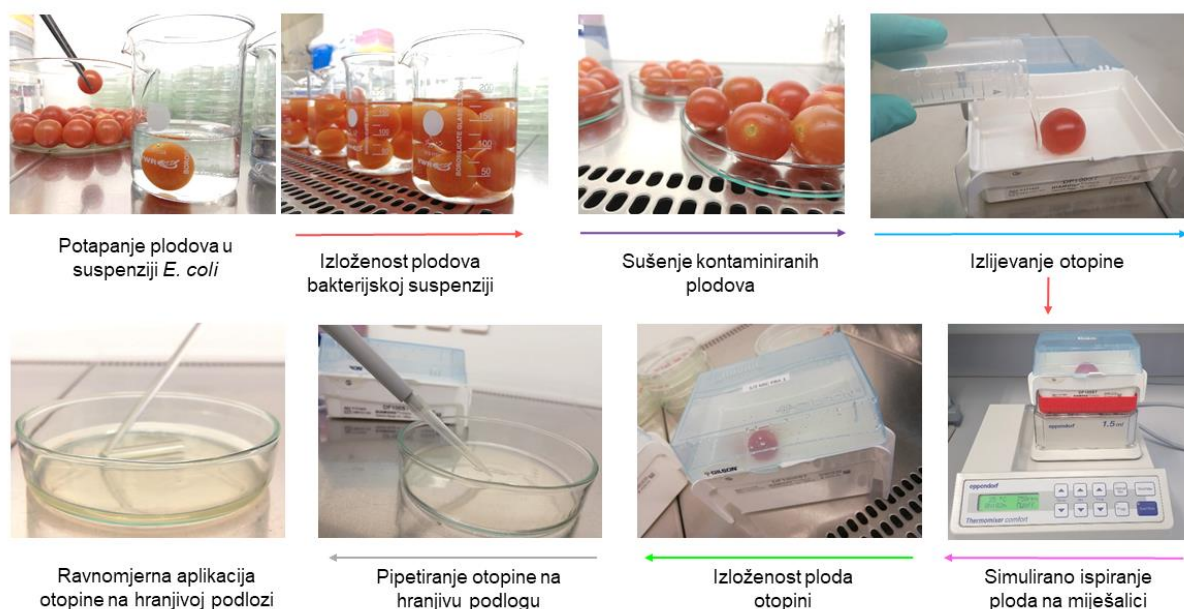
### 3.5.2.3. Postavljanje pokusa i način očitavanja rezultata

Prema protokolu modificirane metode inaktivacije kontaminirajuće bakterije *E. coli* ispiranjem plodova rajčice prema Zhang i sur. (2019), plodovi rajčice potapaju se u suspenziju kontaminirajuće bakterije *E. coli* ( $7,9 \times 10^8$  CFU/ml) u sterilnoj staklenoj posudi i ostavljaju se potopljeni 30 min. Nakon potapanja, plodovi su izvađeni i postavljeni na sušenje u laminar s ciljem boljeg prijanjanja bakterija na površini ploda rajčice. U prethodno autoklaviranu plastičnu kutijicu (8 x 6 x 7 cm), steriliziranom pincetom postavlja se plod rajčice i izlijeva se pripravljena koncentracija PBA. Zatvorena kutijica koja sadrži plod uronjen u određenu koncentraciju PBA, postavlja se na miješalicu (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Njemačka) i osigurava ljepljivom vrpcom za podlogu. Pokretanjem miješalice na 800 rpm u trajanju od 2 min, plod je postepeno ispiran otopinom PBA. Postupak je ponovljen za ispiranje plodova rajčice i s kontrolnim otopinama etanola (1 %), sterilne destilirane vode i raspona MIC BA koncentracija. Nakon ispiranja, otopina u kojoj su plodovi rajčice bili isprani, pipetirana je u količini 100  $\mu$ l na prethodno izliven hranjiv supstrat (KB) u dno sterilnih petrijevki ( $\varnothing$  9 cm) te ravnomjerno nanosena staklenim etalerom. Tako nacijepljene petrijevke inkubirane su u klima komori na 35 °C, u mraku. Postupak provedbe metode, prikazan je shematski (Slika 3.7).

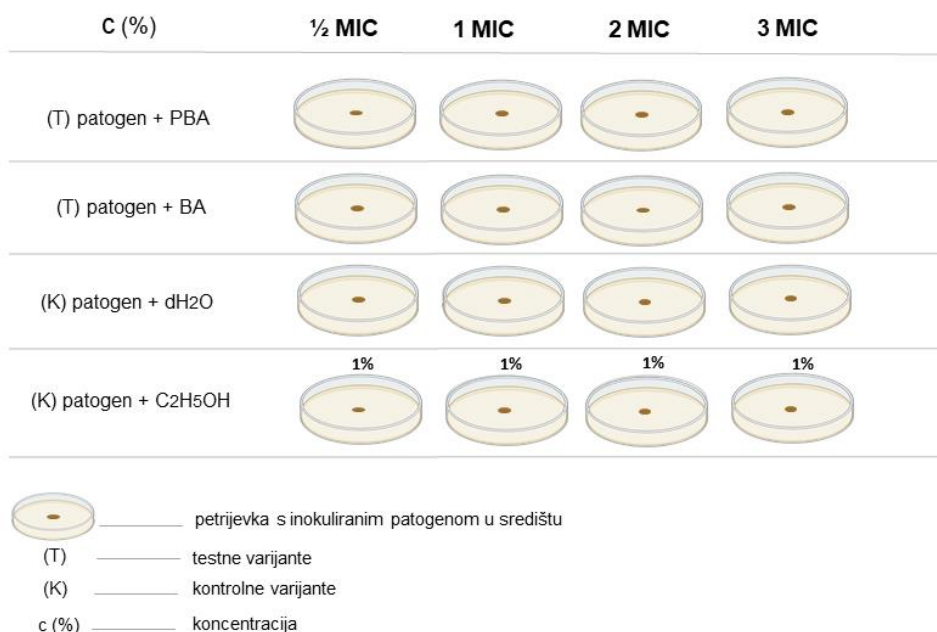
Pokus je ponovljen s izloženošću plodova otopinama u trajanju od 120 minuta. Trajanje vremenske ekspozicije određeno je preliminarnim pokusom kojim je utvrđeno da ne dolazi do raspucavanja niti do promjene boje ploda rajčice nakon 120 minuta potapanja u korištenim otopinama vode, etanola i (P)BA.

Pokus je postavljen pojedinačno u 16 varijanti i 3 repeticije (Slika 3.8). Očitavanja rezultata provedena su nakon 72 sata od postavljanja pokusa fotografiranjem (mobilnim uređajem Samsung Galaxy S8) izraslih kolonija u petrijevkama na način da je objektiv

postavljen okomito (udaljenost 40 cm) u odnosu na petrijevku ("ptičja perspektiva"). Mjerenje ukupne površine kako bi se odredila veličina kolonija te brojanje kolonija bakterije *E. coli*, provedeno je pomoću računalnog programa *ImageJ* (Schneider i sur., 2012) prema Guzmán i sur. (2014).



Slika 3.7 Prikaz provedbe metode inaktivacije bakterije *Escherichia coli* ispiranjem plodova rajčice (original).



Slika 3.8 Shematski prikaz metode *in vitro* - Metoda inaktivacija kontaminirajuće bakterije *Escherichia coli* ispiranjem plodova rajčice prema Zhang i sur. (2019) (original).

### 3.6. Pokus *in vivo*

U uvjetima plastenika, istražen je učinak PBA primijenjene u rasponu MIC koncentracija na bakterioznog (*P. syringae* pv. *tomato*) i gljivičnog patogena (*A. alternata*) pojedinačno, prema modificiranoj metodi Nashwa i Abo-Elyousr (2012). Testiranje učinka MIC PBA provedeno je u postembrionskoj fenofazi rajčice, tj. BBCH 109 koja označava pojavu 9. lista rajčice prema Meier (2001).

#### 3.6.1. Priprema suspenzije izolata

Za potrebe pokusa *in vivo*, gljivični izolat *A. alternata* uzgojen je na PDA na 25 °C u svjetlosnom režimu (16 sati bijele svjetlosti / 8 sati mraka) i trajanju inkubacije od 7 dana u klima komori u svrhu stimulacije sporulacije gljive. Nakon inkubacije, pripremljena je suspenzija spora gljivičnog patogena *A. alternata* iz čistih kultura starih 7 dana. U 10 petrijevki s razvijenim kolonijama gljive, pojedinačno je izliveno 20 ml sterilne destilirane vode te pomoću laboratorijske špatule, spore gljive su sastrugane. Broj spora vrste *A. alternata* izmjeren je hemocitometrom ( $8,2 \times 10^5$  spora/ml), a pripremljena suspenzija je izlivena u ručnu prskalicu koja je prethodno sterilizirana.

Bakterijski izolat *P. syringae* pv. *tomato* uzgojen je na KB i na 28 °C te inkubiran u klima komori u trajanju od 72 sata. U 10 petrijevki s razvijenim kolonijama bakterije uliveno je 20 ml sterilne destilirane vode nakon čega su laboratorijskom špatulom kolonije strugane. Dobivena suspenzija bakterijskih stanica ( $6,1 \times 10^6$  CFU/ml) izlivena je u prethodno steriliziranu ručnu prskalicu.

Suspenzije gljivičnog i bakterioznog patogena pripremljene su pojedinačno u volumenu od 200 ml dostatnom za aplikaciju svih varijanti u pokusu *in vivo*.

#### 3.6.2. Priprema raspona koncentracija kiselina

Temeljem određene MIC PBA iz prvog pokusa *in vitro* za gljivu *A. alternata* i bakteriju *P. syringae* pv. *tomato*, pripremljena je PBA u određenom rasponu koncentracija ( $1/2$  MIC, 1 MIC, 2 MIC, 3 MIC). U 50 ml sterilne destilirane vode, otopljeno je 0,5 mg PBA kako bi se dobila otopina 1 % PBA. Temeljem faktora razrijeđenja, pripremljena otopina 1 % PBA pipetirana je u određenom volumenu u 200 ml sterilne destilirane vode. Isti postupak



ponovljen je za kontrolnu BA. Raspon koncentracija MIC kiselina pripremljen je u plastičnim ručnim prskalicama, u volumenu od 200 ml dostatnom za aplikaciju svih varijanti u pokusu *in vivo*.

### 3.6.3. Postavljanje pokusa i način očitavanja rezultata

Određene MIC koncentracije PBA i BA dobivene pokusom *in vitro* za svakog patogena, korištene su u istraživanju *in vivo*.

Kako bi se testirao antimikotički i antibakterijski učinak, preventivna aplikacija MIC PBA provedena je u rasponu koncentracija ( $1/2$  MIC, 1 MIC, 2 MIC, 3 MIC) i u različitom vremenskom rasponu (7 i 2 dana prije inokulacije patogena) folijarnim prskanjem biljaka pomoću ručne prskalice. Kao kontrolne varijante, korištene su umjetno zaražene biljke prskane s BA u različitom rasponu koncentracija ( $1/2$  MIC, 1 MIC, 2 MIC, 3 MIC) i sterilnom destiliranom vodom. Zasebna kontrolna skupina sadržavala je biljke koje su tretirane raznim koncentracijama PBA i BA, bez prethodne zaraze patogenima. Za potrebe inokulacije, biljke rajčice ranjavane su primjenom praha karborunduma prema Fallik i sur. (1983) i potom zaražene aplikacijom pripremljenih suspenzija oba patogena pomoću ručnih prskalica. Nakon inokulacije patogena, rajčice su pokrivene plastificiranom folijom u trajanju od 48 sati u svrhu postizanja visoke vlage zraka. Nakon 48 sati, plastična folija je uklonjena sa rajčica koje su zadržane u optimalnim uvjetima plastenika ( $25 \pm 2$  °C) do pojave prvih simptoma.

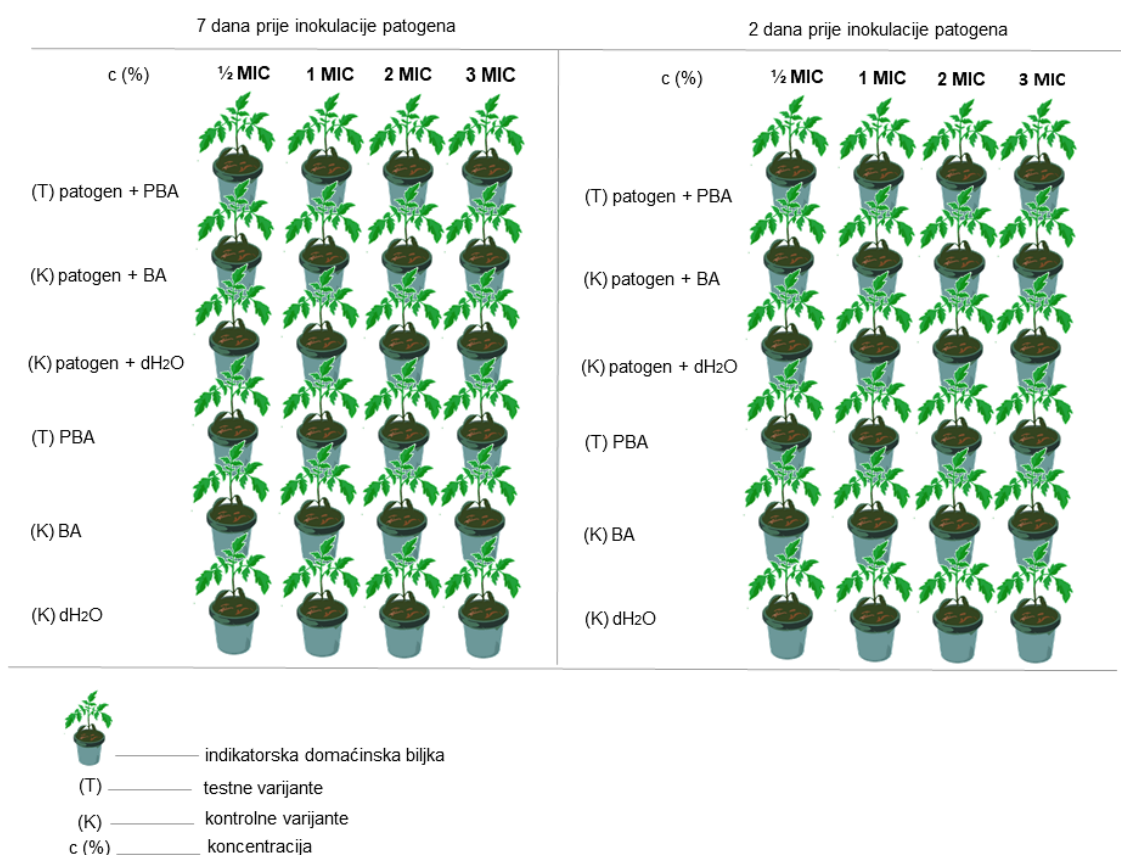
Pokus je postavljen za svakog patogena pojedinačno u 48 varijanti i 3 repeticije (Slika 3.9). Očitavanja rezultata provedena su 14. (i) i 15. (ii) dana od folijarne aplikacije (P)BA na dva načina:

i) analizom odabranih fizioloških parametara koji ukazuju na zdravlje testiranih rajčica (sadržaj antocijanina ARI, parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja NIR, sadržaj klorofila CHI i parametar pojavnosti boje HUE) na Zavodu za ishranu bilja Sveučilište u Zagrebu Agronomskog fakulteta, snimanjem multispektralnih fotografija visoke rezolucije šest reprezentativnih odvojenih listova pomoću uređaja CropReporter (Phenovation Life Sciences, Wageningen, Nizozemska) (Slika 3.10). Multispektralne analize provedene su mjerenjem refleksije listova u crvenom (640 nm), zelenom (550 nm), plavom (475 nm), spektru specifičnom za refleksiju klorofila (730 nm) i antocijanina (540 nm) te near infra-red spektru (769 nm). Iz izmjerenih podataka refleksije izračunati su sadržaj klorofila (CHI) (Gitelson i sur., 2003), sadržaj antocijanina (ARI) (Gitelson i sur., 2001) te HUE (0-360°).

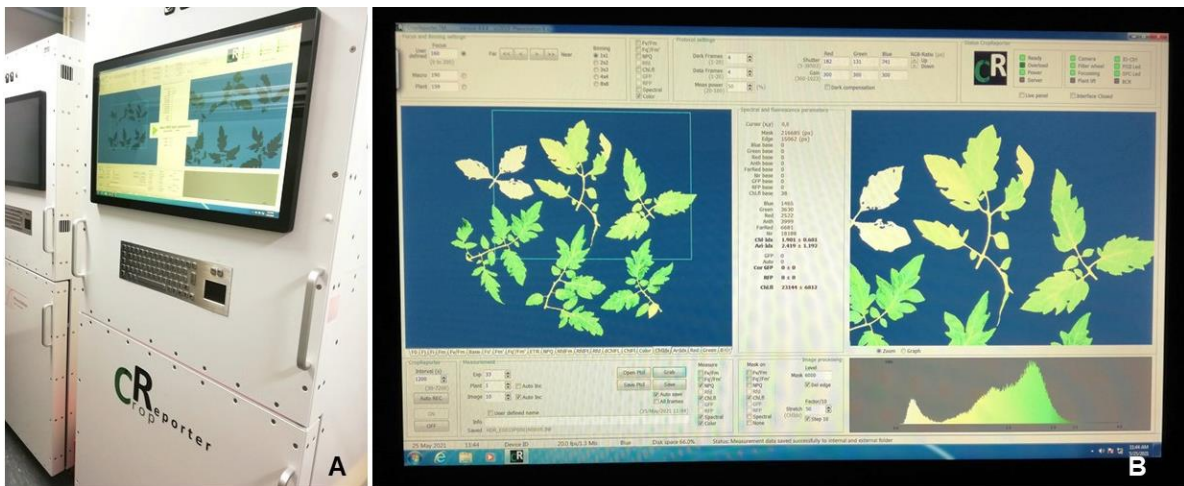
ii) računalnom obradom fotografija cijelih biljaka sa simptomima bolesti uz procijenu jačine simptoma zaraženih rajčica korištenjem računalnog programa *ImageJ* (Schneider i sur.,

2012) prema Laflamme i sur. (2016). Jačina simptoma bolesti određena je mjerenjem ukupne simptomatske površine zaraženih rajčica.

U svrhu provedbe snimanja multispektralnih fotografija uređajem CropReporter, rajčice su postavljene u klima komoru, u mrak, 24 sati prije očitavanja. Kako bi se provelo očitavanje programom *ImageJ*, rajčice su fotografirane (mobilnim uređajem Samsung Galaxy S8) pojedinačno na bijelom platnu, osvjetljene reflektorima u svrhu izbjegavanja sjena i to na način da je objektiv postavljen okomito (udaljenost 2,5 m) u odnosu na biljku ("ptičja perspektiva").



Slika 3.9 Shematski prikaz metode testiranja rajčice *in vivo* prema Nashwa i Abo- Elyousr (2012) (original).



Slika 3.10 Očitavanje fizioloških parametara testiranih rajčica; uređaj Cropreporter (A); prikaz analize sadržaja klorofila i antocijanina na zaslonu uređaja Cropreporter (B).

### 3.7. Kochovi postulati

Kochovi postulati za patogene vrste *A. alternata* i *P. syringae* pv. *tomato*, testirani su u uvjetima *in vitro* prema metodi Mitchell (1997). Nakon očitavanja rezultata pokusa *in vivo*, provedena je reizolacija gljivičnog i bakterioznog patogena iz zaraženog biljnog materijala. Prikupljen je lisni materijal rajčice sa simptomima koncentrične pjegavosti i postavljen na PDA i u vlažnu komoru s ciljem stimulacije rasta i razvoja gljivičnog patogena. Inkubacija naciopljenog biljnog materijala provedena je u klima komori, na 26 °C sa svjetlosnim režimom - 16 sati bijele svjetlosti/ 8 sati mraka. Nakon 7 dana, provedena je izolacija reizoliranog gljivičnog patogena u čistu kulturu nakon čega je je patogen ponovo morfološki i molekularno determiniran.

Također, prikupljen je lisni materijal rajčice sa simptomima bakteriozne pjegavosti i naciopljen na selektivni hranjiv medij KB, na 28 °C i postavljen u klima komori u svrhu stimulacije rasta kolonija bakterioznog patogena. Nakon trodnevne inkubacije, kolonije bakterioznog patogena reizolirane su u čistu kulturu. Kultura bakterije je morfološki i molekularno determinirana.

### 3.8. Statistička analiza podataka

Svi pokusi *in vitro* i *in vivo* izvedeni su u tri ponavljanja, a rezultati su predstavljeni njihovim srednjim vrijednostima i standardnim odstupanjima. Podatci koji odgovaraju normalnoj distribuciji, analizirani su jednosmjernom analizom varijance (One Way ANOVA), a razlike između tretmana su evaluirane Tukey testom ( $p \leq 0,05$ ) (Tukey, 1949) u programu SPSS, verzija 27 (IBM SPSS Statistics IBM, Corp., New York, NY, 2020).

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Rezultati determinacije patogena

#### 4.1.1. Rezultati morfološke determinacije gljive *Alternaria sp.*

Istražene morfološke karakteristike izoliranog gljivičnog patogena iz simptomatskog biljnog materijala rajčice, odgovaraju vrsti *A. alternata*. Srednje vrijednosti promjera rasta i veličina morfoloških struktura vrste *A. alternata*, prikazane su u Tablici (4.1).

Istraživanjem morfoloških karakteristika rasta i razvoja gljive, zamijećeno je da izolat vrste *A. alternata* ima obilan micelaran rast na PDA. U početku je micelij filamentozan i hijalin, a sa zrelošću poprimia sivo-smečkasto obojenje. Micelij je višestaničan, septiran i nepravilno razgranat. U ranoj fazi rasta, hife su tanke, uske, hijaline, a sa zrelošću postaju blago zadebljane. Dugački ili kratki konidiofori razvijaju se pojedinačno ili u skupinama, maslinasto do maslinasto-smeđe obojeni, ravni ili zakrivljeni pod kutem, s konidijama u lancima. Srednja vrijednost konidiofora iznosi 41  $\mu\text{m}$  duljine i 4  $\mu\text{m}$  širine. Na vrhu konidiofora, stvaraju se do 10 ili više maslinasto smeđih do tamnosmeđih, zaobljenih do pretežno elipsoidnih i muriformnih kondija s 1-8 poprečnih i 1-2 uzdužnih pregrada (septi). Muriformne konidije, bez kljuna, u prosjeku iznose 57,8  $\mu\text{m}$  duljine i 20  $\mu\text{m}$  širine. Zamijećeno je da većina konidija ima kratki stožasti ili cilindrični kljun koji se sužava prema vrhu i često je svijetlije obojen od ostatka tijela konidije. Kljun konidija u prosjeku iznosi 20,3  $\mu\text{m}$  duljine i 6,9  $\mu\text{m}$  širine.

Hlamidospore su zabilježene 10. dana u kulturi vrste *A. alternata*. Ove trajne spore su interkalarne i terminalne, debelih stijenki, okruglog do ovalnog oblika, tamnosmeđe boje i prosječnog promjera od 7,6  $\mu\text{m}$ .

Tablica 4.1. Izmjeri morfoloških struktura vrste *Alternaria alternata*.

Morfološke strukture	Izmjeri struktura		
	duljina( $\mu\text{m}$ )	širina ( $\mu\text{m}$ )	duljina : širina ( $\mu\text{m}$ )
konidije	57,8	20,7	2,8
kljun konidija	20,3	6,9	2,9
konidiofori	41	4	10,2
hlamidospore	-	7,6	-

Rast i razvoj kolonija gljive *A. alternata* na različitim hranjivim medijima bilježeni su svakih 48 sati. Korišteni hranjivi mediji pokazali su različit stupanj rasta kolonija.

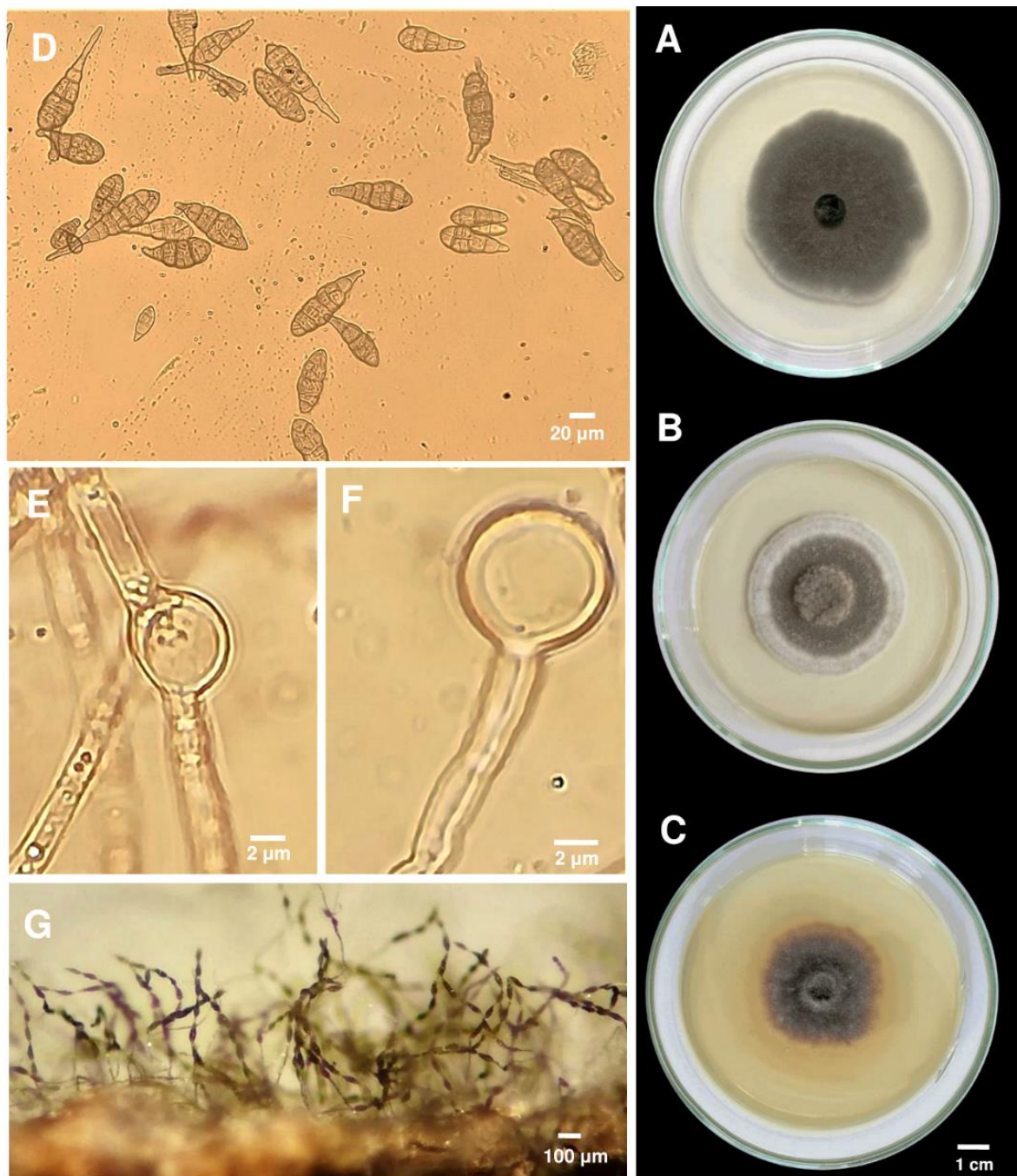
Maksimalan rast vrste *A. alternata* zabilježen je na PDA, dok je rast na MEA nakon 6 dana manji za 25 % u odnosu na PDA, a rast na TJA je manji za 50 % u odnosu na rast gljive na PDA (Tablica 4.2). Micelij gljive *A. alternata* razlikovao se u načinu rasta ovisno o vrsti hranjive podloge. Na svim podlogama se razvio micelij koji je okružen bijelom do svijetlo smeđom marginom, a jedino na MEA je primijećen razvoj vunastog micelija koji je blago izdignut od podloge.

Rezultati morfološke karakterizacije rasta i razvoja gljivičnog patogena *A. alternata* pokazuju da je PDA najoptimalniji medij za rast i sporulaciju testirane vrste gljive, dok MEA i TJA produciraju dobar micelarni rast s umjerenom sporulacijom.

Makroskopske i mikroskopske karakteristike vrste *A. alternata* prikazane su slikom 4.1.

Tablica 4.2. Morfološke karakteristike micelarnog rasta i razvoja vrste *Alternaria alternata* na različitim hranjivim podlogama.

Hranjiva podloga	promjer kolonije (mm)			karakteristike kolonije		
	48 sati	96 sati	144 sati	boja	oblik	tip
PDA	7,2	15,2	24	tamosmeđ micelij s bijelom marginom	cirkularni	supstratni micelij
MEA	6,4	10,9	18	svjetlo siv micelij s bijelom marginom	cirkularni	izdignut micelij
TJA	6,1	9	12	tamosmeđ micelij sa svijetlo smeđom marginom	cirkularni	supstratni micelij

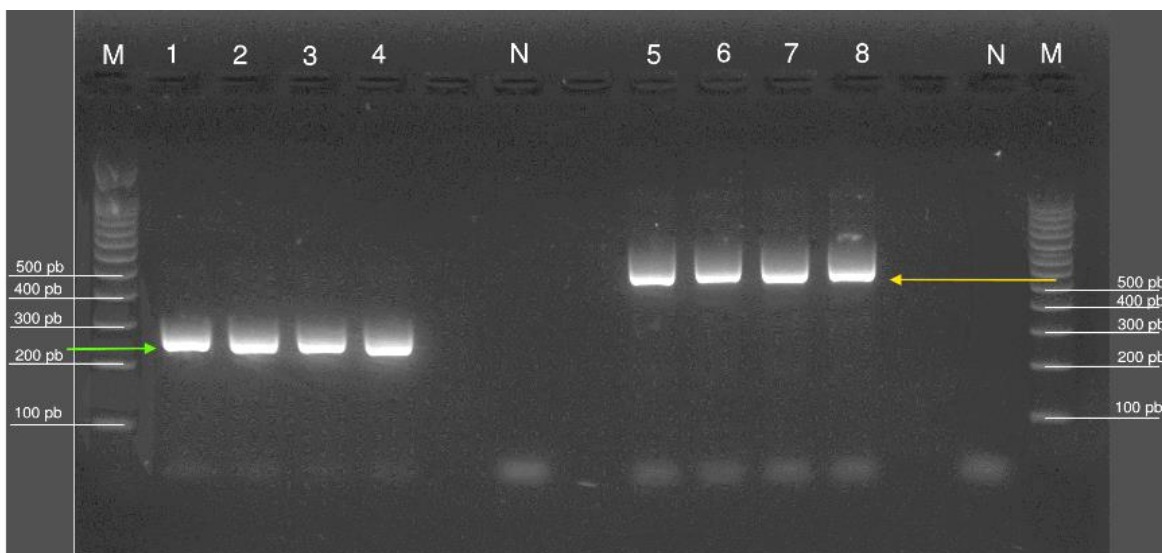


Slika 4.1 Morfološke karakteristike gljive *Alternaria alternata* – Čista kultura na PDA (A), MEA (B), TJA (C) nakon 5 dana. Konidije vidljive svjetlosnim mikroskopom (D). Prikaz interkalarne (E) i terminalne (F) hlamidospore svjetlosnim mikroskopom. Konidiofori vidljivi stereomikroskopom (G).

#### 4.1.2. Rezultati molekularne identifikacije gljive *Alternaria* sp.

Na temelju sekvenciranja amplificiranog odsječka regije ITS-rDNA izolata *Alternaria* sp. korištenjem seta početnica ITS1/ITS4, izolati su identificirani kao vrsta *A. alternata* (Slika 4.2). Elektroforeza amplificiranih PCR produkata rezultirala je amplifikacijom od 530 bp korištenjem seta početnica ITS1/ITS4 kod svih četiri testiranih izolata. Dobivene sekvence veličine 530 bp, uspoređivane su sa sekvencama u NCBI korištenjem BLAST programa. Rezultati su pokazali da dobivene sekvence izolata imaju najveću homolognost s vrstom *A. alternata* koja iznosi 100 % (GenBank pristupni broj MT482506). Zabilježeni rezultati odgovaraju molekularnoj identifikaciji vrste *A. alternata* provedenoj u istraživanju Parkunan i sur. (2013).

Identifikacija izolata fitopatogene gljive dodatno je potvrđena setom početnica ITS1/ITS2 (Slika 4.2). Duljine sekvenci određene metodom razdvajanja DNA odsječaka gel elektroforezom iznosile su 205 bp korištenjem seta početnica ITS1/ITS2 kod četiri testirana izolata. Dobivenim rezultatima utvrđeno je da svi izolati imaju identičnu sekvencu u ITS-regiji. BLAST analiza sekvenci ITS rDNA podržala je morfološku identifikaciju vrste pri čemu je utvrđeno da najbliže podudaranje iznosi 100 % homolognosti u bazi podataka NCBI s vrstom *A. alternata* (GenBank pristupni broj OL514181).



Slika 4.2 Vizualizacija PCR produkata amplificiranih setom početnica ITS1/ITS2 (1- 4) veličine 205 bp (→); ITS1/ITS4 (5- 8) veličine 530 bp (→) za vrstu *Alternaria alternata*; M - marker molekularne veličine fragmenata 100, 200, 300, 400, 500 bp; N, negativna kontrola.



#### 4.1.3. Rezultati morfološke determinacije bakterije *Pseudomonas* sp.

Izolirana bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na hranjivom mediju NA formira kremasto bijele, blago izdignute, glatke i okrugle kolonije s nepravilnim rubovima. Na NSA, bakterija stvara kolonije koje su također kremasto bijele boje, koveksne, glatke i sluzave, dok na King B agaru, vrsta *P. syringae* pv. *tomato* stvara kolonije s obilnim fluorescentnim pigmentom koji difundira u podlogu.

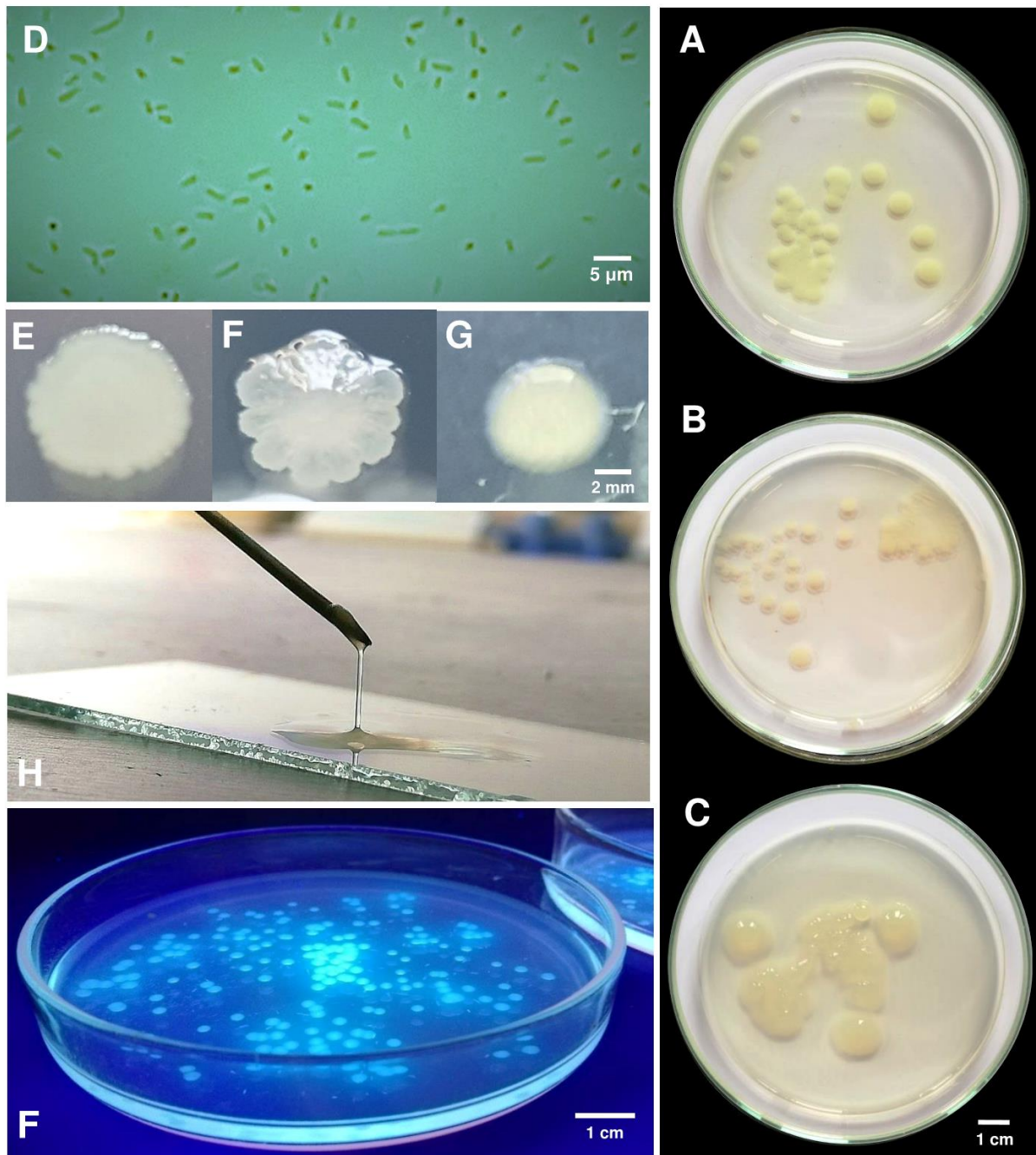
Istraživanjem rasta i razvoja kolonija na različitim hranjivim medijima, zabilježeno je da izolirana bakterija *P. syringae* pv. *tomato* razvija kolonije na NA i NSA agaru nakon 48 sati, dok na King B agaru formira kolonije nakon 72 sata u uvjetima inkubacije od 28 °C, u mraku.

Istraživanjem mikroskopskih karakteristika bakterije, na svjetlosnom mikroskopu uočene su pokretne štapićaste bakterije. Veličina stanica bakterije u prosjeku iznosi 1,8 µm duljine.

Ispitivanjem topivosti KOH testom, potvrđeno je da je izolirana bakterija Gram negativna.

Rezultati testa produkcije fluorescentnog pigmenta dokazuju da testirana bakterija razvija fluorescentni pigment na King B mediju, što se postiže vizualizacijom pomoću UV-transiluminatora.

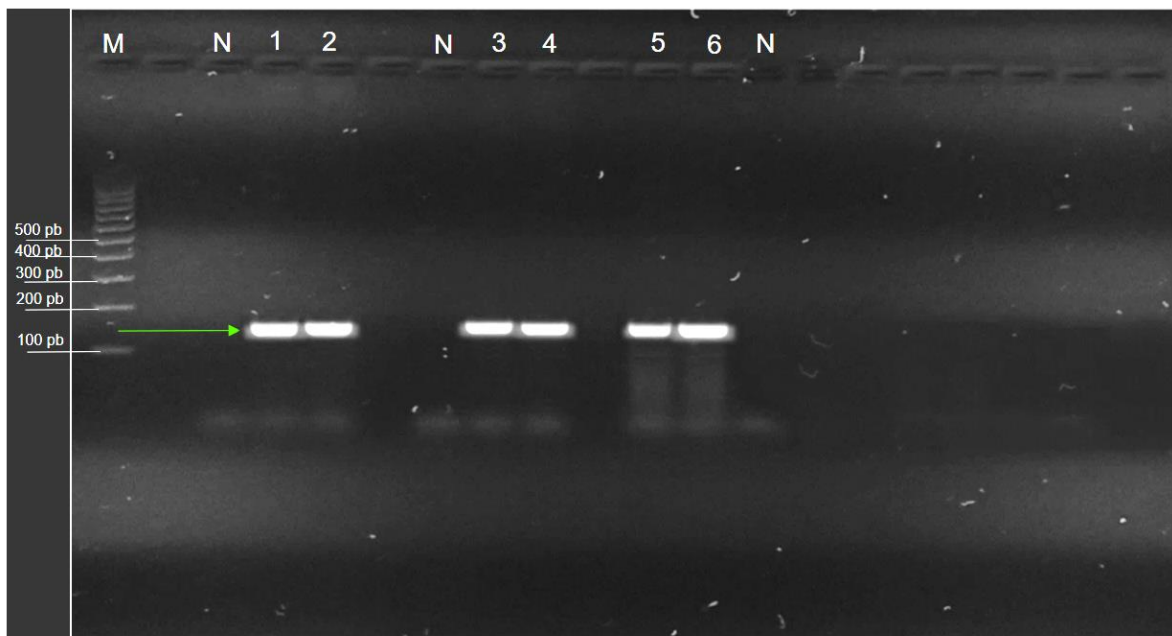
Morfološke karakteristike i reakcije bakterije *P. syringae* pv. *tomato* na biokemijske testove, prikazani su slikom 4.3.



Slika 4.3 Morfološke karakteristike bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* – Čista kultura na KB (A), NA (B), NSA (C) nakon 3 dana. Bakterijske stanice vidljive svjetlosnim mikroskopom (D). Izgled kolonije pod stereomikroskopom na NA (E), NSA (F) i KB (G); KOH test (E). Testiranje fluorescentnog pigmenta kolonije na UV- transiluminatoru (F).

#### 4.1.4. Rezultati molekularne identifikacije bakterije *Pseudomonas* sp.

Sekvenciranjem amplificiranog odsječka izolata *Pseudomonas* sp. korištenjem seta početnica preuzetima iz rada Guilbaud i sur. (2015), izolati su identificirani kao vrsta *P. syringae* pv. *tomato* (Slika 4.4). Duljine sekvenci određene metodom razdvajanja DNA odsječaka gel elektroforezom, iznosile su 144 bp korištenjem seta dizajniranih početnica (Guilbaud i sur., 2015) kod šest testiranih izolata. BLAST analiza sekvenci podržala je morfološku identifikaciju vrste pri čemu je utvrđeno da podudaranje iznosi 100 % homolognosti u NCBI bazi podataka s vrstom *P. syringae* pv. *tomato* (GenBank pristupni broj CP019874).



Slika 4.4 Vizualizacija PCR produkata amplificiranih setom Psy početnica prema Guilbaud i sur. (2015) veličine 144 bp (→) (1-6) za vrstu *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; M - marker molekularne veličine fragmenata 100, 200, 300, 400, 500 bp; N, negativna kontrola.

## 4.2. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije borne i fenilboronske kiseline u uvjetima *in vitro*

### 4.2.1. Antimikotički učinak borne kiseline na rast patogena *Alternaria alternata*

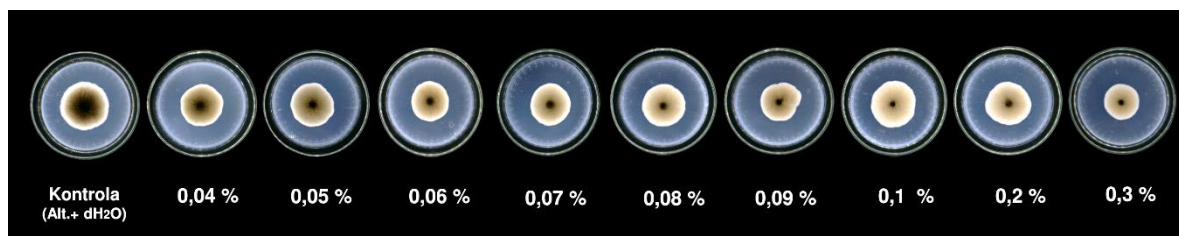
Rezultati istraživanja antimikotičkog učinka BA na rast micelija patogena *A. alternata* usporedno s kontrolnom varijantom bez BA (0 %), prikazani su tablicom 4.3 i slikom 4.5. Rast micelija patogene gljive *A. alternata* zabilježen je na svim hranjivim podlogama koje sadrže testirane koncentracije BA (0,04 % - 0,3 %). Na hranjivom mediju s 0,04 % BA, rast micelija gljive smanjen je za 27 %, dok je na hranjivoj podlozi s 0,05 %, 0,06 % i 0,07 % BA, rast micelija smanjen za 37 %, 45 % i 33 % u odnosu na kontrolu. Rast micelija gljivičnog patogena na hranjivim podlogama s 0,08 %, 0,09 % i 0,1 % BA, reduciran je za 31 %, 37 % i 21 %, dok je na hranjivoj podlozi s 0,2 % i 0,3 % BA, zabilježeno smanjenje rasta micelija za 16 % i 9 % u odnosu na kontrolu.

Srednje vrijednosti površine micelija patogena *A. alternata* značajno su smanjene u varijantama s koncentracijama 0,04 % - 0,2 % BA, dok srednja vrijednost površine micelija gljive u varijanti s 0,3 % BA, nije značajno smanjena u odnosu na srednje vrijednosti kontrolne skupine ( $P < 0,05$ , Tukey test).

Tablica 4.3. Antimikotički učinak različitih koncentracija BA na površinu micelija patogena *Alternaria alternata* nakon 5 dana.

koncentracija BA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost površine micelija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	12,9 <sup>bc</sup> ± 1,1	11,2 <sup>ab</sup> ± 0,7	9,7 <sup>a</sup> ± 0,4	11,8 <sup>abc</sup> ± 1	12,2 <sup>abc</sup> ± 0,5	11,2 <sup>ab</sup> ± 1,3	14 <sup>cd</sup> ± 0,1	14,9 <sup>cd</sup> ± 1	16,2 <sup>de</sup> ± 0,6	17,7 <sup>e±</sup> 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



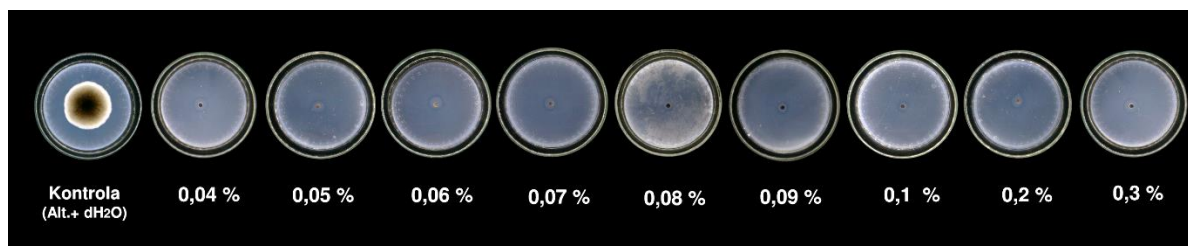
Slika 4.5 Antimikotički učinak BA na rast i razvoj patogena *Alternaria alternata* usporedno s kontrolom nakon 5 dana.

#### 4.2.2. Antimikotički učinak fenilboronske kiseline na rast patogena *Alternaria alternata*

Rezultati istraživanja antimikotičkog učinka PBA na rast micelija patogena *A. alternata* usporedno s kontrolom bez PBA (0 %), prikazani su tablicom 4.4 i slikom 4.6. Na hranjivim podlogama koje sadrže testirane koncentracije PBA (0,05 % - 0,3 %), nije zabilježen rast micelija gljive *A. alternata*. Na hranjivom mediju s 0,04 % PBA rast micelija gljive smanjen je za 98 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,05 % - 0,3 % PBA, rast micelija smanjen za 100 % u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Tablica 4.4. Antimikotički učinak različitih koncentracija PBA na površinu micelija patogena *Alternaria alternata* nakon 5 dana.

koncentracija PBA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost površine micelija (cm <sup>2</sup> )	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	17,7



Slika 4.6 Antimikotički učinak PBA na rast i razvoj patogena *Alternaria alternata* usporedno s kontrolom nakon 5 dana.

#### 4.2.3. Antibakterijski učinak borne kiseline na broj kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato*

Rezultati istraživanja antibakterijskog učinka BA na broj kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato* usporedno s kontrolom bez BA (0 %), prikazani su tablicom 4.5 i slikom 4.7. Na hranjivim podlogama sa svim testiranim koncentracija (0,04 % - 0,3 % BA), zabilježen je rast kolonija patogena. Na hranjivom mediju s 0,04 % BA, broj kolonija bakterije smanjen je za 4 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,06 %, 0,07 %, 0,08 % i 0,09 % BA, broj kolonija smanjen za 15 %, 38 %, 68 % i 34 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na hranjivim podlogama koje su sadržavale 0,1 % i 0,2 % BA, broj kolonija je reduciran za 60 % i 70 % u usporedbi s kontrolom, dok na hranjivoj podlozi s 0,3 % BA, rast patogena nije zabilježen. Na hranjivoj podlozi s 0,05 % BA, broj kolonija je uvećan za 12 % u odnosu na kontrolu.

Tablica 4.5. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na broj kolonija patogena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* nakon 72 sata.

koncentracija BA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost broja kolonija	173,3	205,3	153	111,6	57	119,6	71,6	54,3	0	180,3

#### 4.2.4. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na broj kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato*

Antibakterijski učinak PBA na broj kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato* usporedno s kontrolom bez PBA (0 %), prikazan je tablicom 4.6 i slikom 4.8. Na hranjivim podlogama koje sadrže koncentracije 0,05 % - 0,3 % PBA, kolonije patogena *P. syringae* pv. *tomato* nisu zabilježene. Na hranjivom mediju s 0,04 % PBA, broj kolonija bakterije reduciran je za 34 % u odnosu na kontrolu.

Tablica 4.6. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na broj kolonija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* nakon 72 sata.

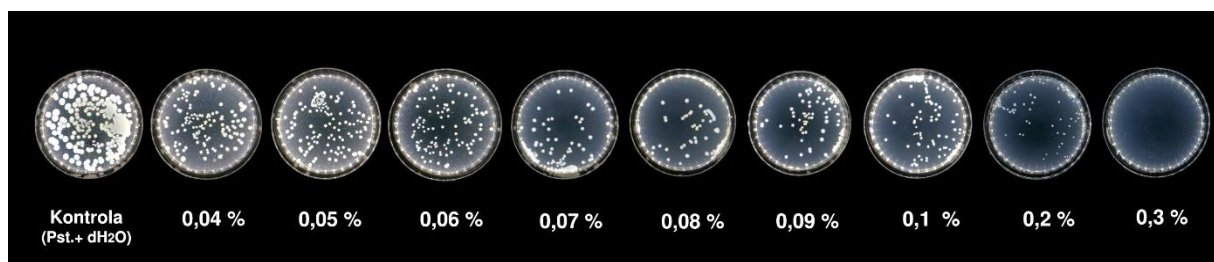
koncentracija PBA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost broja kolonija	120	0	0	0	0	0	0	0	0	180,3

#### 4.2.5. Antibakterijski učinak borne kiseline na veličinu kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato*

Rezultati istraživanja antibakterijskog učinka BA na veličinu kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato* usporedno s kontrolnom varijantom bez BA (0 %), prikazani su tablicom 4.7 i slikom 4.7. Na hranjivim podlogama koje sadrže koncentracije 0,04 % - 0,2 % BA, zabilježen je rast kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato*, dok na podlozi s 0,3 % BA, rast kolonija bakterije nije zabilježen. Na hranjivom mediju s 0,04 % i 0,05 % BA, površina kolonija bakterije reducirana je za 74 % i 76 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,06 %, 0,07 %, 0,08 % i 0,09 % BA, površina kolonija smanjena za 71 %, 83 %, 92 % i 76 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na hranjivim podlogama koje su sadržavale 0,1 % i 0,2 % BA, površina kolonija je reducirana za 92 % i 96 % u usporedbi s kontrolom bez BA, dok na hranjivoj podlozi s 0,3 % BA, rast patogena nije zabilježen.

Tablica 4.7. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na površinu kolonija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* nakon 72 sata.

koncentracija BA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> )	4,4	4,0	4,8	2,9	1,4	4,0	1,4	0,6	0	16,7



Slika 4.7 Antibakterijski učinak BA na broj i površinu kolonija patogena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* usporedno s kontrolom nakon 72 sata.

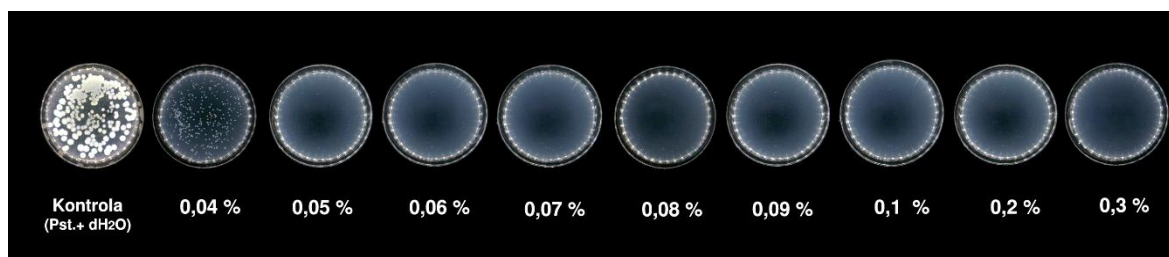


#### 4.2.6. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na veličinu kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato*

Rezultati istraživanja antibakterijskog učinka PBA na veličinu kolonija patogena *P. syringae* pv. *tomato* usporedno s kontrolnom varijantom bez PBA (0 %), prikazani su tablicom 4.8 i slikom 4.8. Na hranjivim podlogama s koncentracijama 0,05 % - 0,3 % PBA, kolonije patogena *P. syringae* pv. *tomato* nisu rasle. Na hranjivom mediju s 0,04 % PBA površina kolonija bakterije reducirana je za 92 % u odnosu na kontrolu.

Tablica 4.8. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na površinu kolonija *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* nakon 72 sata.

koncentracija PBA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> )	1,27	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7



Slika 4.8 Antibakterijski učinak PBA na broj i površinu kolonija patogena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* usporedno s kontrolom nakon 72 sata.

#### 4.2.7. Antibakterijski učinak borne kiseline na broj kolonija bakterije *E. coli*

Antibakterijski učinak BA na broj kolonija bakterije *E. coli* usporedno s kontrolnom varijantnom bez BA (0 %), prikazan je tablicom 4.9 i slikom 4.9. Na hranjivim podlogama s koncentracija 0,04 % - 0,2 % BA zabilježen je rast kolonija bakterije, dok na hranjivom mediju s 0,3 % BA, rast kolonija bakterije nije zabilježen. Na podlozi s 0,04 %, 0,05 % i 0,06 % BA, broj kolonija bakterije smanjen je za 84 %, 45 % i 84 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,07 %, 0,08 % i 0,09 % BA, broj kolonija smanjen za 86 %, 87 % i 45 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na hranjivim podlogama koje su sadržavale 0,1 % i 0,2 % BA, broj kolonija je reduciran za 86 % i 84 % u usporedbi s kontrolom, dok na hranjivoj podlozi s 0,3 % BA, rast patogena nije zabilježen.

Tablica 4.9. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na broj kolonija *Escherichia coli* nakon 72 sata.

koncentracija BA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost broja kolonija	42,6	148	43	39	36	148,6	37	42,7	0	270

#### 4.2.8. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na broj kolonija bakterije *E. coli*

Antibakterijski učinak PBA na broj kolonija bakterije *E. coli* usporedno s kontrolnom varijantom bez PBA (0 %), prikazan je tablicom 4.10 i slikom 4.10. Na mediju s koncentracija 0,04 % - 0,09 % PBA, zabilježen je rast kolonija bakterije, dok na hranjivom mediju s 0,1 %, 0,2 % i 0,3 % PBA, nije uočen rast bakterija. Na podlozi s 0,04 %, 0,05 % i 0,06 % PBA, broj kolonija bakterija smanjen je za 85 %, 85 %, 62 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,07 %, 0,08 % i 0,09 % PBA, broj kolonija smanjen za 85 %, 87 % i 92 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na hranjivim podlogama koje su sadržavale 0,1 % i 0,2 % i 0,3 % PBA, broj kolonija bakterije *E. coli* reduciran je za 100 % u usporedbi s kontrolom, tj. na navedenim varijantama nije zabilježen rast kolonija.

Tablica 4.10. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na broj kolonija *Escherichia coli* nakon 72 sata.

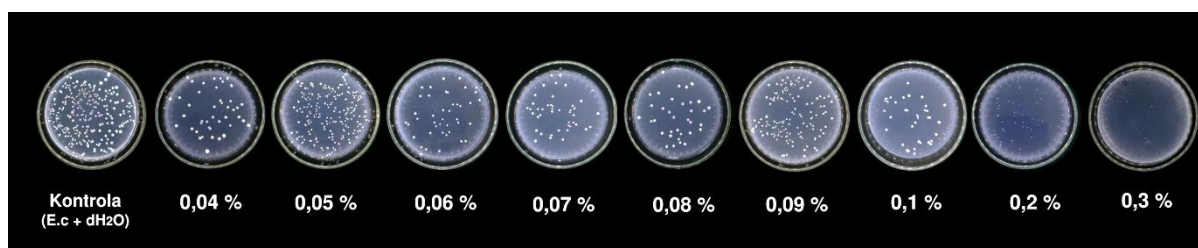
koncentracija PBA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost broja kolonija	39,6	42	104	41,3	35,1	20,6	0	0	0	270

#### 4.2.9. Antibakterijski učinak borne kiseline na veličinu kolonija bakterije *E. coli*

Antibakterijski učinak BA na veličinu kolonija bakterije *E. coli* usporedno s kontrolom bez BA (0 %), prikazan je tablicom 4.11 i slikom 4.9. Na hranjivim podlogama s koncentracijama 0,04 % - 0,2 % BA, zabilježen je rast kolonija bakterije, dok na hranjivom mediju s 0,3 % BA, rast kolonija bakterije nije zabilježen. Na hranjivom mediju s 0,04 %, 0,05 % i 0,06 % BA, površina kolonija bakterije smanjena je za 85 %, 83 % i 95 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,07 %, 0,08 % i 0,09 % BA, površina kolonija smanjena za 93 %, 86 % i 85 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na hranjivim podlogama koje su sadržavale 0,1 % i 0,2 % BA, površina kolonija reducirana je za 95 % i 97 % u usporedbi s kontrolom, dok na hranjivoj podlozi s 0,3 % BA, rast patogena nije zabilježen.

Tablica 4.11. Antibakterijski učinak različitih koncentracija BA na površinu kolonija *Escherichia coli* nakon 72 sata.

koncentracija BA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> )	1,5	1,7	0,5	0,7	1,3	1,5	0,5	0,3	0	9,8



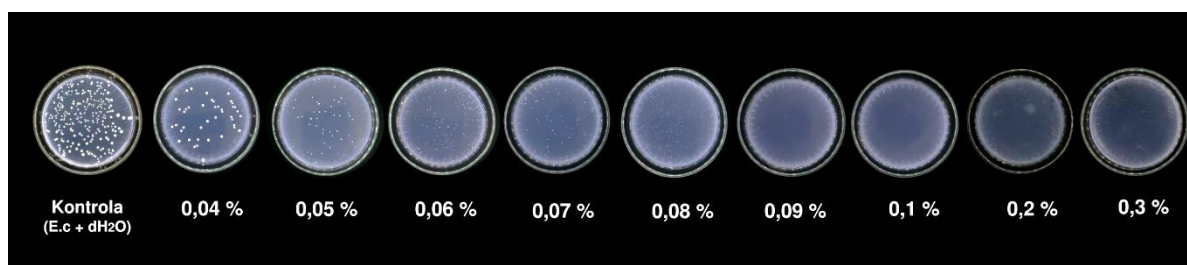
Slika 4.9 Antibakterijski učinak BA na broj i površinu kolonija bakterije *Escherichia coli* u odnosu na kontrolu nakon 72 sata.

#### 4.2.10. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline na veličinu kolonija bakterije *E. coli*

Učinak PBA na veličinu kolonija bakterije *E. coli* usporedno s kontrolom bez PBA (0 %), prikazan je tablicom 4.12 i slikom 4.10. Na mediju s koncentracijama 0,04 % - 0,09 % PBA, zabilježen je rast kolonija bakterije, dok na hranjivom mediju s 0,1 %, 0,2 % i 0,3 % PBA, nije uočen rast bakterije. Na podlogama s 0,04 %, 0,05 % i 0,06 % PBA, površina kolonija bakterije *E. coli* smanjena je za 90 %, 98 % i 93 %, dok je na hranjivim podlogama s 0,07 %, 0,08 % i 0,09 % površina kolonija smanjena za 97 %, 95 % i 99,6 % u usporedbi s kontrolnom skupinom. Na hranjivim podlogama koje su sadržavale 0,1 % i 0,2 % i 0,3 % PBA, površina kolonija bakterije *E. coli* reducirana je za 100 % u usporedbi s kontrolom, tj. na navedenim varijantama nije zabilježen rast kolonija.

Tablica 4.12. Antibakterijski učinak različitih koncentracija PBA na površinu kolonija *Escherichia coli* nakon 72 sata.

koncentracija PBA (%)	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1	0,2	0,3	0
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> )	1,0	0,2	0,6	0,3	0,5	0,04	0	0	0	9,8



Slika 4.10 Antibakterijski učinak PBA na broj i površinu kolonija bakterije *Escherichia coli* u odnosu na kontrolu nakon 72 sata (original).

### 4.3. Metoda inhibicije bakterije *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice u uvjetima *in vitro*

#### 4.3.1. Učinak borne kiseline na broj kolonija bakterije *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice

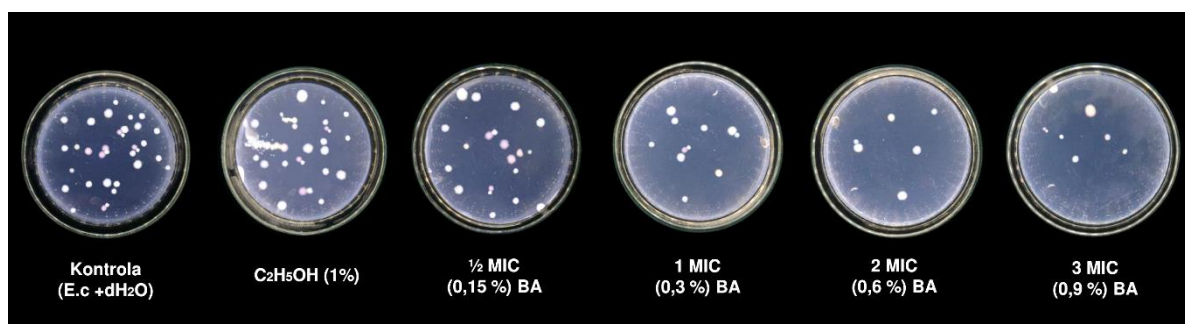
Rezultati inhibicije broja kolonija *E. coli* ispiranjem plodova rajčice s rasponom MIC BA usporedno s kontrolom – dH<sub>2</sub>O i etanolom (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (1%), prikazani su tablicom 4.13 i slikom 4.11. Nakon ispiranja plodova s koncentracijama ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA, na hranjivim podlogama zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Broj kolonija bakterije nakon ispiranja plodova rajčice s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA, inhibiran je za 39 %, 65 %, 85 % i 80 % u odnosu na ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje kontaminiranih plodova rajčice s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA rezultiralo je inhibicijom broja kolonija bakterije za 46 %, 69 %, 86 % i 82 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%).

Srednje vrijednosti broja kolonija vrste *E. coli* značajno su smanjene u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA) u usporedbi sa srednjim vrijednostima broja kolonija u kontrolnim varijantama gdje su plodovi ispirani s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.13. Učinak raspona MIC BA na broj kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem s plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem (dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC BA + E.c.	1 MIC BA + E.c.	2 MIC BA + E.c.	3 MIC BA + E.c.
srednja vrijednost broja kolonija ± SD	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37 <sup>a</sup> ± 2,0	20 <sup>c</sup> ± 1,0	11,6 <sup>b</sup> ± 0,5	5 <sup>d</sup> ± 1,0	6,6 <sup>e</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05



Slika 4.11 Inhibitorni učinak raspona MIC BA na bakteriju *Escherichia coli* ispiranjem s plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) nakon 72 sata.

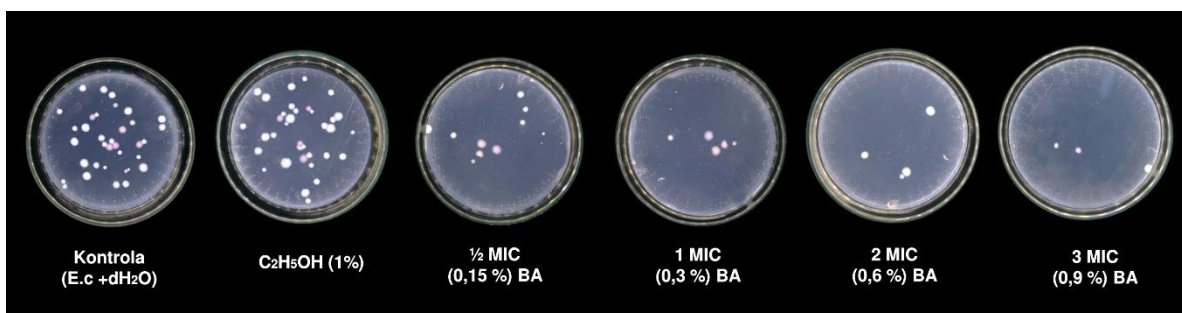
Smanjenje broja kolonija *E. coli* ispiranjem s BA s plodova rajčice i 120-minutnom izloženošću plodova usporedno s kontrolom - dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %), prikazani su tablicom 4.14 i slikom 4.12. Nakon ispiranja plodova s koncentracijama ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA i vremenskom ekspozicijom plodova u navedenim koncentracijama, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Broj kolonija bakterije *E. coli* nakon ispiranja plodova rajčice i izloženosti plodova u ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA, inhibiran je za 75 %, 86 %, 86 % i 90 % u odnosu na ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje plodova rajčice kontaminiranih bakterijom *E. coli* s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA i vremenske ekspozicije u navedenim koncentracijama, rezultiralo je inhibicijom broja kolonija bakterije od 78 %, 88 %, 88 % i 91 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%).

Srednje vrijednosti broja kolonija vrste *E. coli* značajno su manje u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA) u usporedbi s kontrolnim varijantama na kojima su korištene dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.14. Učinak raspona MIC BA na broj kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem i 120- minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC BA + E.c.	1 MIC BA + E.c.	2 MIC BA + E.c.	3 MIC BA + E.c.
srednja vrijednost broja kolonija ± SD	32,6 <sup>c</sup> ± 2,5	37 <sup>d</sup> ± 2,0	8,3 <sup>b</sup> ± 0,5	4,6 <sup>ab</sup> ± 0,5	4,6 <sup>ab</sup> ± 0,5	3,3 <sup>a</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05



Slika 4.12 Inhibitorni učinak raspona MIC BA na bakteriju *Escherichia coli* ispiranjem i 120-minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) nakon 72 sata.

#### 4.3.2. Učinak fenilboronske kiseline na broj kolonija bakterije *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice

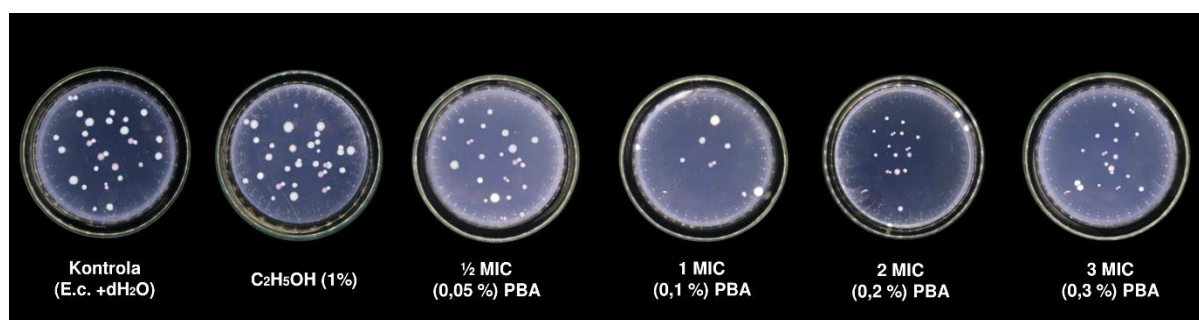
Rezultati inhibicije broja kolonija *E. coli* ispiranjem plodova rajčice s rasponom MIC PBA usporedno s kontrolom - dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazani su tablicom 4.15 i slikom 4.13. Nakon ispiranja plodova s koncentracijama ½ MIC (0,05 %), 1 MIC (0,1 %), 2 MIC (0,2 %) i 3 MIC (0,3 %) PBA, na hranjivim podlogama, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Broj kolonija bakterije *E. coli* nakon ispiranja s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA s plodova rajčice, inhibiran je za 39 %, 83 %, 38 % i 28 % u odnosu ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje kolonija bakterije *E. coli* s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA s plodova rajčice, rezultiralo je inhibicijom broja kolonija bakterije za 46 %, 85 %, 46 %, 36 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%).

Srednje vrijednosti broja kolonija vrste *E. coli* značajno su manje u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA) u usporedbi sa srednjim vrijednostima broja kolonija u kontrolnim varijantama - dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.15. Učinak raspona MIC PBA na broj kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem s plodova rajčice u usporedbi s kontrolnim ispiranjem dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC PBA + E.c.	1 MIC PBA + E.c.	2 MIC PBA + E.c.	3 MIC PBA + E.c.
srednja vrijednost broja kolonija ± SD	32,6 <sup>c</sup> ± 2,5	37,0 <sup>d</sup> ± 2,0	20,0 <sup>b</sup> ± 1,5	5,6 <sup>a</sup> ± 0,5	20,3 <sup>b</sup> ± 1,1	23,6 <sup>b</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05



Slika 4.13 Inhibitorski učinak raspona MIC PBA na bakteriju *Escherichia coli* ispiranjem plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) nakon 72 sata.



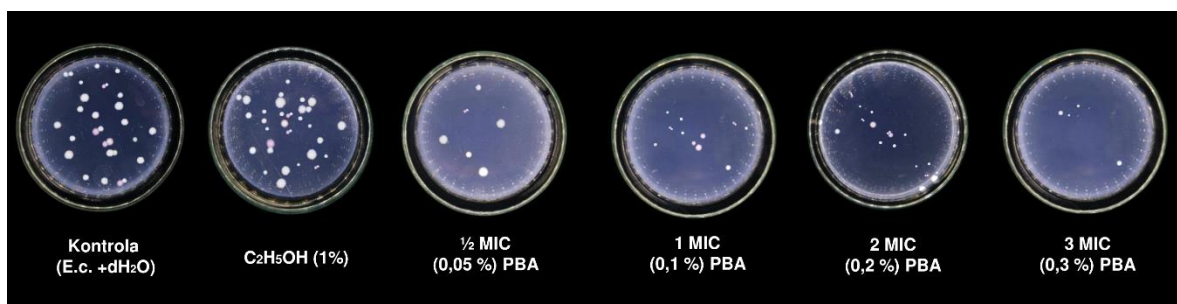
Smanjenje broja kolonija *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice s PBA i 120-minutnom izloženošću plodova usporedno s kontrolama - dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazani su tablicom 4.16 i slikom 4.14. Nakon ispiranja plodova s koncentracijama ½ MIC (0,05 %), 1 MIC (0,1 %), 2 MIC (0,2 %) i 3 MIC (0,3 %) PBA i ekspozicijom plodova u navedenim koncentracijama, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Broj kolonija bakterije *E. coli* nakon ispiranja i ekspozicije plodova rajčice u ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA u navedenom rasponu koncentracija, inhibiran je za 80 %, 65 %, 55 % i 87 % u odnosu na ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje i vremenska ekspozicija plodova rajčice kontaminiranih bakterijom *E. coli* s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA, rezultiralo je smanjenjem broja kolonija bakterije za 82 %, 70 %, 61 % i 88 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %).

Srednje vrijednosti broja kolonija vrste *E. coli*, značajno su manje u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA) u usporedbi sa srednjim vrijednostima broja kolonija u kontrolnim ispiranjima s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.16. Učinak raspona MIC PBA na broj kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem i 120 minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC PBA + E.c.	1 MIC PBA + E.c.	2 MIC PBA + E.c.	3 MIC PBA + E.c.
srednja vrijednost broja kolonija ± SD	32,6 <sup>c</sup> ± 2,5	37,0 <sup>d</sup> ± 2,0	6,6 <sup>a</sup> ± 0,5	11,3 <sup>b</sup> ± 0,5	14,6 <sup>b</sup> ± 0,5	4,3 <sup>a</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05



Slika 4.14 Inhibitorni učinak raspona MIC PBA na bakteriju *Escherichia coli* ispiranjem i 120-minutnom ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim varijantama dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) nakon 72 sata.

Antibakterijski učinak na broj kolonija patogena *E. coli* nakon ispiranja s MIC PBA usporedno s kontrolnim ispiranjem s BA u istom MIC rasponu, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazan je tablicom 4.17. Prema Tukey testu (P <0,05), srednje vrijednosti broja kolonija patogena *E. coli* u varijantama s 1 MIC (0,1 %), 2 MIC (0,2 %) i 3 MIC (0,3 %) PBA u odnosu na ispiranje s MIC koncentracijama BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), značajno su manje. Srednje vrijednosti broja kolonija patogena *E. coli* u varijanti s ½ MIC (0,05 %) PBA, nisu značajno promijenjene u odnosu na srednje vrijednosti broja kolonija u varijanti s BA, dok su značajno manje u odnosu na kontrolno ispiranje s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.17. Antibakterijski učinak PBA na broj kolonija patogena *Escherichia coli* usporedno s kontrolama - BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata.

<i>Escherichia coli</i>				
MIC	dH <sub>2</sub> O+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%)+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD	BA+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD	PBA+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD
½ MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37 <sup>a</sup> ± 2,0	20,0 <sup>b</sup> ± 1,0	20,0 <sup>b</sup> ± 1,5
1 MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37 <sup>a</sup> ± 2,0	11,6 <sup>b</sup> ± 0,5	5,6 <sup>c</sup> ± 0,5
2 MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37 <sup>a</sup> ± 2,0	5,0 <sup>b</sup> ± 0,0	20,3 <sup>c</sup> ± 1,1
3 MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37 <sup>a</sup> ± 2,0	6,6 <sup>b</sup> ± 0,5	23,6 <sup>c</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Antibakterijski učinak na broj kolonija patogena *E. coli* nakon ispiranja i 120-minutne izloženosti plodova u rasponu MIC PBA usporedno s kontrolnim ispiranjem s BA u istom MIC rasponu, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazan je tablicom 4.18. Prema Tukey testu (P <0,05), srednje vrijednosti broja kolonija patogena *E. coli* u varijantama s 1 MIC (0,1%) i 2 MIC (0,2 %) PBA u odnosu na ispiranje s MIC koncentracijama BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), značajno su smanjene. Srednje vrijednosti broja kolonija patogena *E. coli* u varijantama s ½ MIC (0,05 %) i 3 MIC (0,3 %) PBA, nisu značajno promijenjene u odnosu na srednje vrijednosti broja kolonija nakon ispiranja s BA, dok su u odnosu na kontrolno ispiranje s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), značajno smanjene (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.18. Antibakterijski učinak PBA na broj kolonija patogena *Escherichia coli* nakon ispiranja i 120- minutne ekspozicije plodova rajčice usporedno s kontrolama -BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata.

<i>Escherichia coli</i>				
MIC	dH <sub>2</sub> O+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%) srednja vrijednost broja kolonija ± SD	BA+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD	PBA+ E.c. srednja vrijednost broja kolonija ± SD
½ MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37,0 <sup>a</sup> ± 2,0	8,3 <sup>b</sup> ± 0,5	6,6 <sup>b</sup> ± 0,5
1 MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37,0 <sup>a</sup> ± 2,0	4,6 <sup>b</sup> ± 0,5	11,3 <sup>c</sup> ± 0,5
2 MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37,0 <sup>a</sup> ± 2,0	4,6 <sup>b</sup> ± 0,5	14,6 <sup>c</sup> ± 0,5
3 MIC	32,6 <sup>a</sup> ± 2,5	37,0 <sup>a</sup> ± 2,0	3,3 <sup>b</sup> ± 0,5	4,3 <sup>b</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

### 4.3.3. Učinak borne kiseline na veličinu kolonija bakterije *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice

Rezultati mjerenja površine kolonija *E. coli* ispiranjem plodova rajčice s rasponom MIC BA usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazani su tablicom 4.19 i slikom 4.11. Nakon ispiranja plodova s koncentracijama ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Površina kolonija bakterije *E. coli* nakon ispiranja plodova rajčice s ½ MIC, 1 MIC i 2 MIC BA viša je za 60 %, 54 % i 28 % u odnosu na ispiranje s dH<sub>2</sub>O, dok je površina kolonija bakterija nakon ispiranja s 3 MIC BA inhibirana za 50 %. Ispiranje plodova rajčice kontaminiranih bakterijom *E. coli* s ½ MIC, 1 MIC i 2 MIC BA rezultiralo je povećanjem ukupne površine kolonija bakterije za 71 %, 66 % i 47 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %), dok je površina kolonija bakterije nakon ispiranja s 3 MIC BA, inhibirana za 32 %.

Srednje vrijednosti površine kolonija vrste *E. coli* značajno su veće pri ispiranju plodova s ½ MIC, 1 MIC, i 2 MIC BA u usporedbi s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%). Premda je ispiranje s 3 MIC BA smanjilo ukupnu površinu kolonija *E. coli*, ono statistički nije značajno (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.19. Učinak raspona MIC BA na površinu kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O+ E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC BA + E.c.	1 MIC BA + E.c.	2 MIC BA + E.c.	3 MIC BA + E.c.
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	3,4 <sup>a</sup> ± 0,2	2,5 <sup>b</sup> ± 0,1	8,6 <sup>e</sup> ± 0,6	7,4 <sup>d</sup> ± 0,2	4,7 <sup>c</sup> ± 0,6	1,7 <sup>b</sup> ± 0,4

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05

Rezultati mjerenja površine kolonija *E. coli* ispiranjem i 120- minutnom ekspozicijom plodova u otopini raspona MIC BA usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazani su tablicom 4.20 i slikom 4.12. Nakon ispiranja i vremenske ekspozicije plodova u koncentracijama ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Površina kolonija bakterije *E. coli* nakon ispiranja i ekspozicije plodova s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA inhibirana je za 74 %, 97 %, 88 % i 91 % u odnosu na ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje i ekspozicija plodova kontaminiranih bakterijom *E. coli* s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA rezultiralo je smanjenjem površine

kolonija bakterije za 64 %, 96 %, 84 %, 88 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%).

Srednje vrijednosti površine kolonija vrste *E. coli* značajno su manje u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA) u usporedbi sa srednjim vrijednostima površine kolonija nakon kontrolnih ispiranja s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.20. Učinak raspona MIC BA na površinu kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem i ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC BA + E.c.	1 MIC BA + E.c.	2 MIC BA + E.c.	3 MIC BA + E.c.
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	3,4 <sup>d</sup> ± 0,2	2,5 <sup>c</sup> ± 0,1	0,9 <sup>b</sup> ± 0,1	0,1 <sup>a</sup> ± 0,2	0,4 <sup>a</sup> ± 0,0	0,3 <sup>a</sup> ± 0,8

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05

#### 4.3.4. Učinak fenilboronske kiseline na veličinu kolonija bakterije *E. coli* ispiranjem s plodova rajčice

Rezultati mjerenja površine kolonija *E. coli* ispiranjem plodova rajčice s rasponom MIC PBA usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) prikazani su tablicom 4.21 i slikom 4.13. Nakon ispiranja plodova s koncentracijama ½ MIC (0,05 %), 1 MIC (0,1 %), 2 MIC (0,2 %) i 3 MIC (0,3 %) PBA, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Površina kolonija *E. coli* nakon ispiranja plodova rajčice s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA smanjena je za 41 %, 59 %, 53 % i 85 % u odnosu na kontrolno ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje kontaminiranih plodova rajčice s ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA rezultiralo je smanjenjem ukupne površine kolonija bakterije *E. coli* za 20 %, 44 %, 36 % i 80 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%).

Srednje vrijednosti površine kolonija vrste *E. coli* značajno su manje u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA) u usporedbi s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (P <0,05, Tukey test).

Tablica 4.21. Učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem s plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC PBA + E.c.	1 MIC PBA + E.c.	2 MIC PBA + E.c.	3 MIC PBA + E.c.
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	3,4 <sup>e</sup> ± 0,2	2,5 <sup>d</sup> ± 0,1	2,0 <sup>c</sup> ± 0,2	1,4 <sup>b</sup> ± 0,2	1,6 <sup>b</sup> ± 0,4	0,5 <sup>a</sup> ± 0,2

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05

Rezultati mjerenja površine kolonija *E. coli* ispiranjem i 120-minutnom izloženošću plodova rajčice rasponu MIC PBA usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazani su tablicom 4.22 i slikom 4.14. Nakon ispiranja i ekspozicije plodova u koncentracijama ½ MIC (0,05 %), 1 MIC (0,1 %), 2 MIC (0,2 %) i 3 MIC (0,3 %) PBA, zabilježen je rast kolonija bakterije *E. coli*. Površina kolonija bakterije *E. coli* nakon ispiranja i ekspozicije plodova u ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA, inhibirana je za 97 %, 68 %, 94 % i 97 % u odnosu na ispiranje s dH<sub>2</sub>O. Ispiranje i ekspozicija plodova rajčice u ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA rezultiralo je smanjenjem ukupne površine kolonija bakterije *E. coli* za 96 %, 56 %, 92 % i 96 % u odnosu na kontrolno ispiranje s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%).

Srednje vrijednosti ukupne površine kolonija vrste *E. coli* značajno su manje u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA) u usporedbi sa kontrolnim varijantama s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) prema Tukey testu (P <0,05).

Tablica 4.22. Učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija bakterije *Escherichia coli* ispiranjem i ekspozicijom plodova rajčice usporedno s kontrolnim ispiranjem s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1 %) nakon 72 sata.

koncentracija (%)	dH <sub>2</sub> O + E.c.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + E.c.	½ MIC PBA + E.c.	1 MIC PBA + E.c.	2 MIC PBA + E.c.	3 MIC PBA + E.c.
srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	3,4 <sup>d</sup> ± 0,2	2,5 <sup>c</sup> ± 0,1	0,1 <sup>a</sup> ± 0,0	1,1 <sup>b</sup> ± 0,1	0,2 <sup>a</sup> ± 0,0	0,1 <sup>a</sup> ± 0,0

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini P <0,05

Antibakterijski učinak na veličinu kolonija patogena *E. coli* nakon ispiranja s rasponom MIC PBA usporedno s BA u istom rasponu MIC, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) prikazan je tablicom 4.23.

Prema Tukey testu (P<0,05), srednje vrijednosti površine kolonija patogena *E. coli* u varijantama sa svim koncentracijama PBA, u odnosu na ispiranje s BA i dH<sub>2</sub>O, značajno su smanjene. Srednje vrijednosti površine kolonija patogena *E. coli* u varijantama s ½ MIC (0,05 %) i 2 MIC (0,2 %) PBA nisu značajno različite u odnosu na srednje vrijednosti površine kolonija u kontrolnoj varijanti s C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.23 Antibakterijski učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija patogena *Escherichia coli* nakon ispiranja plodova rajčice usporedno s BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata.

<i>Escherichia coli</i>				
MIC	dH <sub>2</sub> O+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%)+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	BA+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	PBA+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD
½ MIC	3,4 <sup>b</sup> ± 0,2	2,5 <sup>ab</sup> ± 0,1	8,6 <sup>c</sup> ± 0,6	2,4 <sup>a</sup> ± 0,2
1 MIC	3,4 <sup>a</sup> ± 0,2	2,5 <sup>b</sup> ± 0,1	7,4 <sup>c</sup> ± 0,2	1,4 <sup>d</sup> ± 0,2
2 MIC	3,4 <sup>b</sup> ± 0,2	2,5 <sup>ab</sup> ± 0,1	4,7 <sup>c</sup> ± 0,6	1,6 <sup>a</sup> ± 0,4
3 MIC	3,4 <sup>a</sup> ± 0,2	2,5 <sup>b</sup> ± 0,1	1,7 <sup>c</sup> ± 0,4	0,5 <sup>d</sup> ± 0,2

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Antibakterijski učinak MIC PBA na veličinu kolonija patogena *E. coli* nakon ispiranja i 120-minutne izloženosti plodova rajčice, usporedno s istim rasponom MIC BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%), prikazan je tablicom 4.24.

Prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ), srednje vrijednosti površine kolonija bakterioznog patogena u varijantama s ½ MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA, ne razlikuju se značajno, dok su srednje srednje vrijednosti površine kolonija u varijanti s 1 MIC PBA značajno veće u odnosu na varijantu s BA. Isto tako, srednje vrijednosti površine kolonija *E. coli* u svim testiranim varijantama (½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC) PBA značajno su manje, u odnosu na srednje vrijednosti površine kolonija u kontrolnim varijantama s dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1%) (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.24. Antibakterijski učinak raspona MIC PBA na površinu kolonija patogena *Escherichia coli* nakon ispiranja i ekspozicije plodova rajčice usporedno s BA, dH<sub>2</sub>O i C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH unutar iste vrijednosti MIC nakon 72 sata.

<i>Escherichia coli</i>				
MIC	dH <sub>2</sub> O+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1%)+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	BA+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD	PBA+ E.c. srednja vrijednost površine kolonija (cm <sup>2</sup> ) ± SD
½ MIC	3,4 <sup>d</sup> ± 0,2	2,5 <sup>c</sup> ± 0,1	0,9 <sup>b</sup> ± 0,1	0,1 <sup>a</sup> ± 0,0
1 MIC	3,4 <sup>d</sup> ± 0,2	2,5 <sup>c</sup> ± 0,1	0,1 <sup>a</sup> ± 0,2	1,1 <sup>b</sup> ± 0,1
2 MIC	3,4 <sup>c</sup> ± 0,2	2,5 <sup>b</sup> ± 0,1	0,4 <sup>a</sup> ± 0,0	0,2 <sup>a</sup> ± 0,0
3 MIC	3,4 <sup>c</sup> ± 0,2	2,5 <sup>b</sup> ± 0,1	0,3 <sup>a</sup> ± 0,8	0,1 <sup>a</sup> ± 0,0

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ) unutar iste vrijednosti MIC



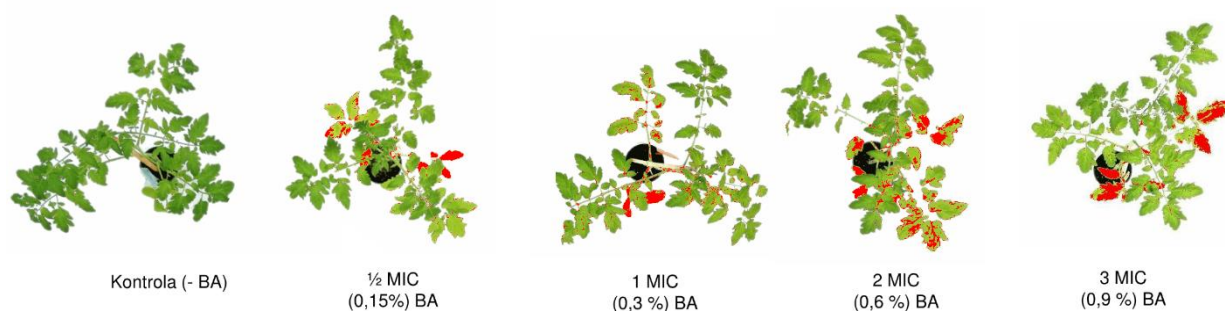
## 4.4. Pokus na rajčici *in vivo*

### 4.4.1. Učinkak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice

Rezultati učinka aplikacije raspona MIC BA (2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na površinu lezija rajčice nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.25 i slikom 4.15. Ukupna površina lezija na listovima zabilježena je na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA. Na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 10 % i 22 % ukupne površine lezija, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC zabilježeno je 34 % i 44 % ukupne površine lezija u odnosu na varijantu bez BA (0 MIC).

Tablica 4.25. Učinkak MIC BA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na površinu lezija rajčice nakon 14 dana.

koncentracija BA (%)	0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	½ MIC	1 MIC	2 MIC	3 MIC
srednja vrijednost površine lezija (cm <sup>2</sup> )	0	9,5	22,3	34,4	44,4



Slika 4.15 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC BA (2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

#### 4.4.1. Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice

Rezultati učinka aplikacije raspona MIC PBA (2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na površinu lezija rajčice nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.26 i slikom 4.16. Ukupna površina lezija na listovima zabilježena je na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA. Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 7 % i 25 % ukupne površine lezija, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 31 % i 29 % ukupne površine lezija u odnosu na kontrolu bez PBA (0 MIC).

Tablica 4.26. Učinak MIC PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na površinu lezija rajčice nakon 14 dana.

koncentracija PBA (%)	0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	½ MIC	1 MIC	2 MIC	3 MIC
srednja vrijednost površine lezija (cm <sup>2</sup> )	0	6,7	24,7	31	29,2



Slika 4.16 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

#### 4.4.2. Učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC BA (aplikacija 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.27.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %), nisu značajno promijenjene unutar raspona MIC i u odnosu na srednje vrijednosti navedenih parametara kontrolne varijante (0 MIC) prema Tukey testu (P <0,05).

Tablica 4.27. Učinak BA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers				
MIC	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	1,88 ± 0,4	2,46 ± 0,7	99,3 ± 4,7	18329,5 ± 1112,2
½ MIC	1,96 ± 0,5	2,77 ± 0,9	100,7 ± 8,7	18203,5 ± 491,8
1 MIC	1,81 ± 0,5	2,49 ± 1	98,3 ± 8,4	18832,1 ± 1112,5
2 MIC	1,68 ± 0,6	2,27 ± 0,9	95,3 ± 12,1	18173,5 ± 937,8
3 MIC	1,67 ± 0,5	2,11 ± 1	95,9 ± 8,5	17485,8 ± 1029

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test, P <0,05)

#### 4.4.3. Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC PBA (2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.28.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), nisu značajno promijenjene unutar raspona MIC i u odnosu na srednje vrijednosti kontrole (0 MIC) prema Tukey testu (P <0,05).

Tablica 4.28. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers				
MIC	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	1,88 ± 0,9	2,46 ± 0,4	99,3 ± 4,7	18329,5 ± 1112,2
½ MIC	1,91 ± 0,7	2,34 ± 0,5	100,3 ± 7,7	18201,7 ± 440,6
1 MIC	2,03 ± 0,8	2,71 ± 0,5	102,1 ± 5,8	18351,3 ± 507,1
2 MIC	1,90 ± 0,9	2,48 ± 0,5	99,6 ± 7,4	18302,7 ± 757,1
3 MIC	1,95 ± 1	2,68 ± 0,5	100,3 ± 7	18158,3 ± 643,6

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test, P <0,05)

Učinak preventivne aplikacije PBA (2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na odabrane fiziološke parametre (CHI ARI, HUE, NIR) rajčice, usporedno s kontrolnim aplikacijama dH<sub>2</sub>O i MIC BA nakon 15 dana, prikazan je tablicama 4.29 – 4.32.

Srednje vrijednosti testiranih fizioloških parametara na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), nisu značajno promijenjene u odnosu na srednje vrijednosti istih parametara kod biljaka u kontrolnim varijantama na koje je aplicirana BA i dH<sub>2</sub>O (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.29. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost CHI ± SD	BA srednja vrijednost CHI ± SD	PBA srednja vrijednost CHI ± SD
½ MIC	1,88 ± 0,9	1,96 ± 0,5	1,91 ± 0,7
1 MIC	1,88 ± 0,9	1,81 ± 0,5	2,03 ± 0,8
2 MIC	1,88 ± 0,9	1,68 ± 0,6	1,90 ± 0,9
3 MIC	1,88 ± 0,9	1,67 ± 0,5	1,95 ± 1

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar iste vrijednosti MIC (Tukey test, P <0,05)

Tablica 4.30. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost ARI ± SD	BA srednja vrijednost ARI ± SD	PBA srednja vrijednost ARI ± SD
½ MIC	2,46 ± 0,7	2,77 ± 0,9	2,34 ± 0,5
1 MIC	2,46 ± 0,7	2,49 ± 1	2,71 ± 0,5
2 MIC	2,46 ± 0,7	2,27 ± 0,9	2,48 ± 0,5
3 MIC	2,46 ± 0,7	2,11 ± 1	2,68 ± 0,5

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar iste vrijednosti MIC (Tukey test, P <0,05)

Tablica 4.31 Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost HUE ± SD	BA srednja vrijednost HUE ± SD	PBA srednja vrijednost HUE ± SD
½ MIC	99,3 ± 4,7	100,7 ± 8,7	100,3 ± 7,7
1 MIC	99,3 ± 4,7	98,3 ± 8,4	102,1 ± 5,8
2 MIC	99,3 ± 4,7	95,3 ± 12,1	99,6 ± 7,4
3 MIC	99,3 ± 4,7	95,9 ± 8,5	100,3 ± 7

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar iste vrijednosti MIC (Tukey test, P <0,05)

Tablica 4.32. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost NIR ± SD	BA srednja vrijednost NIR ± SD	PBA srednja vrijednost NIR ± SD
½ MIC	18329,5 ± 1112,2	18203,5 ± 491,8	18201,7 ± 440,6
1 MIC	18329,5 ± 1112,2	18832,1 ± 1112,5	18351,3 ± 507,1
2 MIC	18329,5 ± 1112,2	18173,5 ± 937,8	18302,7 ± 757,1
3 MIC	18329,5 ± 1112,2	17485,8 ± 1029	18158,3 ± 643,6

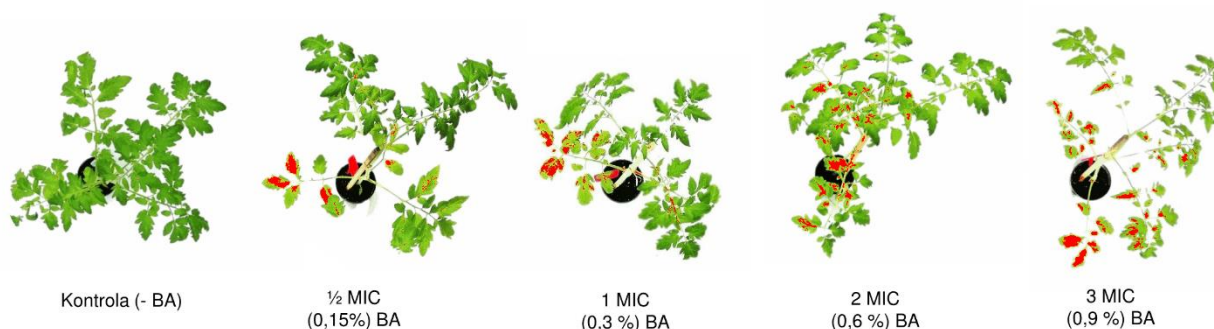
\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar iste vrijednosti MIC (Tukey test, P <0,05)

#### 4.4.1. Učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice

Rezultati učinka aplikacije raspona MIC BA (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na površinu lezija rajčice nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.33 i slikom 4.17. Ukupna površina lezija na listovima zabilježena je na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA. Test biljke na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, pokazuju 6 % i 8 % ukupne površine lezija, dok test biljke na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, pokazuju 25 % i 34 % površine lezija u usporedbi s kontrolnom varijantom bez BA.

Tablica 4.33. Učinak MIC BA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na površinu lezija rajčice nakon 14 dana.

koncentracija BA (%)	0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	½ MIC	1 MIC	2 MIC	3 MIC
srednja vrijednost površine lezija (cm <sup>2</sup> )	0	6,3	8,1	24,5	34,2



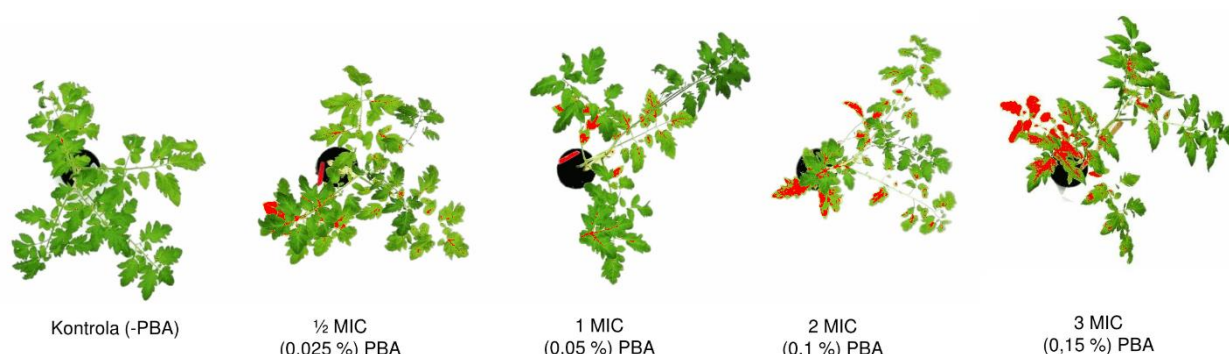
Slika 4.17 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije BA (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

#### 4.4.1. Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na površinu lezija rajčice

Rezultati učinka aplikacije raspona MIC PBA (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na površinu lezija rajčice nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.34 i slikom 4.18. Ukupna površina lezija na listovima zabilježena je na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA. Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 12 % i 11 % ukupne površine lezija, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 31 % površine lezija u odnosu na kontrolnu varijantu bez PBA.

Tablica 4.34. Učinak MIC PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na ukupnu površinu lezija rajčice nakon 14 dana.

koncentracija PBA (%)	0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	½ MIC	1 MIC	2 MIC	3 MIC
srednja vrijednost površine lezija (cm <sup>2</sup> )	0	12	11	30,7	30,6



Slika 4.18 Prikaz ukupne površine lezija rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).



#### 4.4.2. Učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC BA (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.35.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %), nisu značajno promijenjene unutar raspona MIC prema Tukey testu (P <0,05).

Tablica 4.35. Učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers				
MIC BA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	1,88 ± 0,3	2,46 ± 0,7	99,3 ± 4,7	18329,5 ± 1112,2
½ MIC	1,79 ± 0,8	2,28 ± 1	96,3 ± 15,1	17653,3 ± 1017,6
1 MIC	1,83 ± 0,2	2,24 ± 0,2	99,4 ± 3,3	18905,1 ± 1186,9
2 MIC	1,68 ± 0,6	2,02 ± 0,9	94,8 ± 11,1	17331,0 ± 1067,3
3 MIC	1,95 ± 0,3	2,39 ± 0,6	99,4 ± 4,4	17869,8 ± 593,8

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test, P <0,05)

#### 4.4.3. Učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije sterilne destilirane vode) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC PBA (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.36.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), nisu značajno promijenjene, osim srednjih vrijednosti ARI i NIR koje su značajno više na test biljkama na koje je aplicirana ½ MIC PBA u odnosu na ostale MIC varijante unutar raspona koncentracija prema Tukey testu (P <0,05).

Tablica 4.36. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers				
MIC PBA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (dH <sub>2</sub> O)	1,88 ± 0,3	2,46 <sup>a</sup> ± 0,7	99,3 ± 4,7	18329,5 <sup>a</sup> ± 1112,2
½ MIC	2,00 ± 0,3	4,25 <sup>b</sup> ± 0,9	97,6 ± 3,6	28522 <sup>b</sup> ± 1864,5
1 MIC	1,73 ± 0,3	2,25 <sup>a</sup> ± 0,6	96,9 ± 6,7	18685,1 <sup>a</sup> ± 611,6
2 MIC	1,88 ± 0,2	2,51 <sup>a</sup> ± 0,3	99,2 ± 3	18594,5 <sup>a</sup> ± 428,2
3 MIC	1,41 ± 0,5	1,57 <sup>a</sup> ± 0,7	91,5 ± 9,8	17371,5 <sup>a</sup> ± 1475,9

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test, P <0,05)

Učinak preventivne aplikacije PBA na testirane parametre rajčice (7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O) usporedno s kontrolnom aplikacijom dH<sub>2</sub>O i BA unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana, prikazan je tablicama 4.37 – 4.40.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), nisu značajno promijenjene, osim srednjih vrijednosti ARI i NIR biljaka na koje je aplicirana ½ MIC PBA koje su značajno više u usporedbi sa srednjim vrijednostima parametara kontrolnih varijanti na koje je aplicirana dH<sub>2</sub>O i ½ MIC BA, (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.37. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost CHI ± SD	BA srednja vrijednost CHI ± SD	PBA srednja vrijednost CHI ± SD
½ MIC	1,88 ± 0,3	1,79 ± 0,8	1,91 ± 0,7
1 MIC	1,88 ± 0,3	1,83 ± 0,2	2,03 ± 0,8
2 MIC	1,88 ± 0,3	1,68 ± 0,6	1,90 ± 0,9
3 MIC	1,88 ± 0,3	1,95 ± 0,3	1,95 ± 1

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar iste vrijednosti MIC (Tukey test, P <0,05)

Tablica 4.38. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost ARI ± SD	BA srednja vrijednost ARI ± SD	PBA srednja vrijednost ARI ± SD
½ MIC	2,46 <sup>a</sup> ± 0,7	2,28 <sup>a</sup> ± 1	4,25 <sup>b</sup> ± 0,9
1 MIC	2,46 ± 0,7	2,24 ± 0,2	2,25 ± 0,6
2 MIC	2,4 ± 0,7	2,02 ± 0,9	2,51 ± 0,3
3 MIC	2,46 ± 0,7	2,39 ± 0,6	1,57 ± 0,7

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.39. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost HUE ± SD	BA srednja vrijednost HUE ± SD	PBA srednja vrijednost HUE ± SD
½ MIC	99,3 ± 4,7	96,3 ± 15,1	97,6 ± 4,7
1 MIC	99,3 ± 4,7	99,4 ± 3,3	96,9 ± 3,6
2 MIC	99,3 ± 4,7	94,8 ± 11,1	99,2 ± 6,7
3 MIC	99,3 ± 4,7	99,4 ± 4,4	91,5 ± 3

\* nema statistički značajnih razlika između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar iste vrijednosti MIC (Tukey test, P <0,05)

Tablica 4.40. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije dH<sub>2</sub>O na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Solanum lycopersicum</i> L. cv. Rutgers			
MIC	dH <sub>2</sub> O srednja vrijednost NIR ± SD	BA srednja vrijednost NIR ± SD	PBA srednja vrijednost NIR ± SD
½ MIC	18329,5 <sup>a</sup> ± 1112,2	17653,3 <sup>a</sup> ± 1017,6	28522 <sup>b</sup> ± 1864,5
1 MIC	18329,5 ± 1112,2	18905,1 ± 1186,9	18685,1 ± 611,6
2 MIC	18329,5 ± 1112,2	17331,0 ± 1067,3	18594,5 ± 428,2
3 MIC	18329,5 ± 1112,2	17869,8 ± 593,8	17371,5 ± 1475,9

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.4. Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

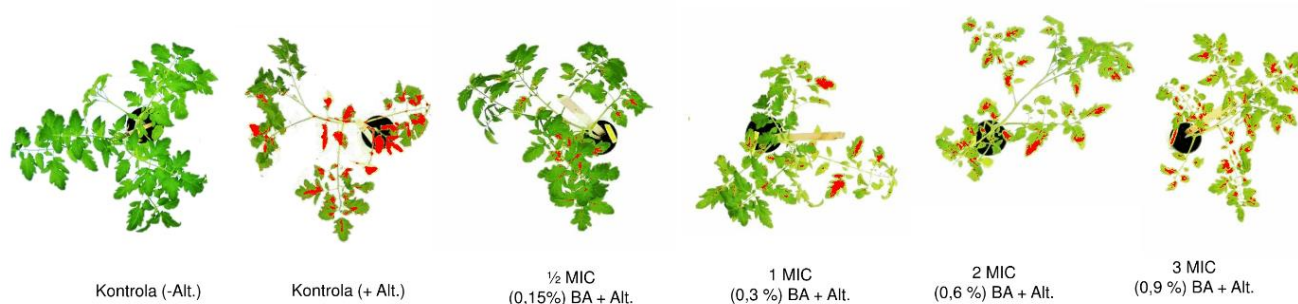
Rezultati prikazuju antimikotički učinak raspona MIC BA (2 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma koje uzrokuje gljivični patogen *A. alternata* na rajčici nakon 14 dana (Tablica 4.41 i slika 4.19). Simptomi koncentrične pjegavosti zabilježeni su na svim test biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA. Na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 17 % i 32 % simptomatske površine, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 79 % i 92 % simptomatske površine u usporedbi s kontrolom varijantnom bez BA (s patogenom).

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC i 2 MIC, značajno su manje u odnosu na srednje vrijednosti simptomatske površine kontrolnih biljaka bez BA i biljaka na koje je aplicirana 3 MIC BA. Srednje vrijednosti 3 MIC i kontrolne varijante koja sadrži samo patogena (0 MIC), statistički nisu različite ( $P < 0,05$ , Tukey test).

Tablica 4.41. Antimikotički učinak MIC BA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na jačinu simptoma na rajčici nakon 14 dana.

koncentracija BA (%)	0 MIC +Alt.	½ MIC +Alt.	1 MIC +Alt.	2 MIC +Alt.	3 MIC +Alt.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	29,8 <sup>d</sup> ± 0,9	5 <sup>a</sup> ± 1,1	9,5 <sup>b</sup> ± 0,5	24 <sup>c</sup> ± 1,8	27,7 <sup>d</sup> ± 1,4

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.19 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC BA (2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata*) u usporedbi s kontrolom (očitanje ImageJ).

#### 4.4.5. Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

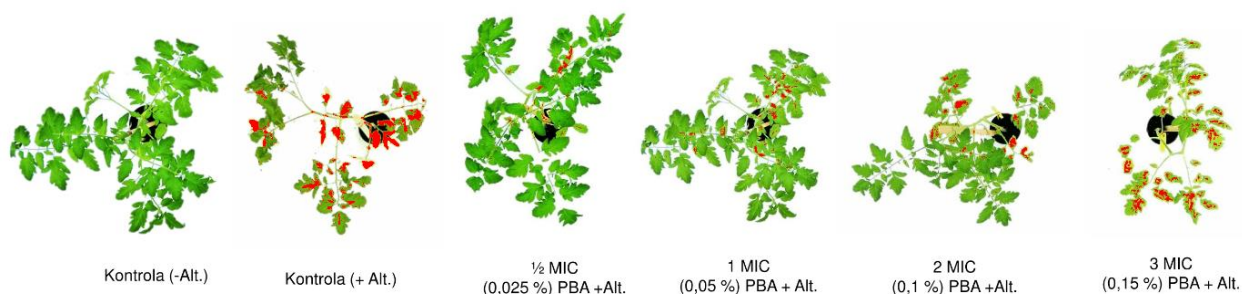
Rezultati antimikotičkog učinka raspona MIC PBA (2 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma koje uzrokuje gljivični patogen *A. alternata* na rajčici nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.42 i slikom 4.20. Simptomi koncentrične pjegavosti zabilježeni su na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA. Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 10 % i 19 % simptomatske površine, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 36 % i 59 % simptomatske površine u usporedbi s kontrolom bez PBA (s patogenom).

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC, značajno su smanjene u odnosu na srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka bez PBA (0 MIC). Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje su primijenjene MIC PBA, međusobno se značajno razlikuju prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ).

Tablica 4.42. Antimikotički učinak MIC PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na jačinu simptoma na rajčici nakon 14 dana.

koncentracija PBA (%)	0 MIC + Alt.	½ MIC + Alt.	1 MIC + Alt.	2 MIC + Alt.	3 MIC + Alt.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	29,8 <sup>e</sup> ± 0,9	2,8 <sup>a</sup> ± 0,2	5,5 <sup>b</sup> ± 0,5	9,6 <sup>c</sup> ± 0,6	17,5 <sup>d</sup> ± 1,7

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.20 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata*) u usporedbi s kontrolom (očitanje ImageJ).

Antimikotički učinak na jačinu simptoma koje uzrokuje gljivični patogen *A. alternata* na rajčici nakon preventivne aplikacije PBA (2 dana prije aplikacije patogena) u usporedbi s aplikacijom dH<sub>2</sub>O i BA unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana, prikazan je tablicom 4.43.

Prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ), srednje vrijednosti simptomatske površine koju uzrokuje patogen *A. alternata* na rajčici u varijantama s 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA značajno su smanjene u odnosu na varijante u kojima je na biljke aplicirana BA u istom rasponu MIC koncentracija i na varijante koje ne sadrže PBA (s patogenom). Srednje vrijednosti simptomatske površine koncentrične pjegavosti u varijanti s ½ MIC (0,025 %) PBA, nisu značajno promijenjene u usporedbi sa srednjim vrijednostima simptomatske površine u varijantama s istom MIC BA, dok su značajno smanjene u odnosu na srednje vrijednosti simptomatske površine u varijanti bez PBA (s patogenom) (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.43. Antimikotički učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na jačinu simptoma na rajčici u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD
½ MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 0,9	5 <sup>b</sup> ± 1,1	2,8 <sup>b</sup> ± 0,2
1 MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 0,9	9,5 <sup>b</sup> ± 0,5	5,5 <sup>c</sup> ± 0,5
2 MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 0,9	24 <sup>b</sup> ± 1,8	9,6 <sup>c</sup> ± 0,6
3 MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 0,9	27,7 <sup>a</sup> ± 1,4	17,5 <sup>b</sup> ± 1,7

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.6. Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona BA (2 dana prije aplikacije patogena *A. alternaria*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.44.

Srednje vrijednosti fizioloških parametara (CHI, ARI i HUE) rajčica na koje je aplicirana BA u testiranim koncentracijama - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %), značajno su više u odnosu na vrijednosti istih parametara kod kontrolnih biljaka bez BA (s patogenom). Na test biljkama na koje je apliciran raspon MIC BA, srednje vrijednosti parametra NIR nisu značajno promijenjene unutar raspona MIC (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.44. Učinak BA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>				
MIC BA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (+Alt.)	0,9 <sup>a</sup> ± 0,4	1 <sup>a</sup> ± 0,5	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	16404 ± 1199
½ MIC	1,7 <sup>b</sup> ± 0,3	2,1 <sup>b</sup> ± 0,5	96,7 <sup>b</sup> ± 4,9	17250,6 ± 618,8
1 MIC	1,5 <sup>ab</sup> ± 0,3	1,7 <sup>ab</sup> ± 0,4	93,6 <sup>b</sup> ± 4,1	17414,1 ± 410,7
2 MIC	1,4 <sup>ab</sup> ± 0,4	1,7 <sup>ab</sup> ± 0,7	91,3 <sup>ab</sup> ± 9,5	17160,6 ± 723,7
3 MIC	1,7 <sup>b</sup> ± 0,3	2,1 <sup>b</sup> ± 0,6	96,4 <sup>b</sup> ± 6,3	17336,6 ± 426,4

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )



#### 4.4.7. Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC PBA (2 dana prije aplikacije patogena *A. alternata*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.45.

Srednje vrijednosti testiranih parametara CHI, ARI i HUE na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA, značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti biljaka na koje nije aplicirana PBA (0 MIC) prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ). Srednja vrijednost parametra NIR na koje je aplicirana 1 MIC PBA, značajno je viša u odnosu na srednje vrijednosti biljaka na koje su aplicirane ostale MIC koncentracije te biljaka bez PBA (Tukey testu,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.45. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>				
MIC PBA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (+Alt.)	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1 <sup>a</sup> ± 0,5	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	16404 <sup>a</sup> ± 1199
½ MIC	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3	2,20 <sup>b</sup> ± 0,6	98,7 <sup>b</sup> ± 4,4	17504,8 <sup>ab</sup> ± 237,1
1 MIC	1,70 <sup>b</sup> ± 0,3	2 <sup>b</sup> ± 0,6	96,6 <sup>b</sup> ± 6,2	17832,1 <sup>b</sup> ± 390,4
2 MIC	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3	2,20 <sup>b</sup> ± 0,6	99 <sup>b</sup> ± 5,1	17450 <sup>ab</sup> ± 763,6
3 MIC	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3	2,40 <sup>b</sup> ± 0,6	99,4 <sup>b</sup> ± 4,9	17376 <sup>ab</sup> ± 719,7

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )

Učinak preventivne aplikacije PBA (2 dana prije aplikacije patogena *A. alternata*) na četiri fiziološka parametra rajčice usporedno s kontrolnim varijantama (BA i bez PBA s patogenom) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana, prikazan je tablicama 4.46 – 4.49.

Srednje vrijednosti testiranih parametara CHI, ARI i HUE test biljka na koje je aplicirana PBA u svim testiranim koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u usporedbi sa srednjim vrijednostima istih parametara biljaka u kontrolnim varijantama koje ne sadrže PBA (samo patogen) (Tukey test,  $P < 0,05$ ). Srednje vrijednosti parametara CHI i HUE na koje je aplicirana 2 MIC PBA, tj. srednje vrijednosti ARI biljaka na koje su aplicirane 1 MIC i 2 MIC PBA, značajno su više u usporedbi

s kontrolnom varijantom (biljke s analognom MIC BA). Kod test biljaka na koje je aplicirana PBA u koncentraciji 1 MIC (0,05 %), srednje vrijednosti parametra NIR značajno su više u usporedbi s vrijednostima NIR biljaka iz kontrolne skupine na koje je aplicirana ista MIC BA i biljaka koje ne sadrže PBA, dok kod ostalih koncentracija (½ MIC, 2 MIC i 3 MIC) PBA, vrijednosti nisu značajno različite u odnosu na srednje vrijednosti NIR kontrolnih varijanti s BA i bez PBA (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.46. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O+Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost CHI ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost CHI ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost CHI ± SD
½ MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,70 <sup>b</sup> ± 0,3	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3
1 MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,50 <sup>b</sup> ± 0,3	1,70 <sup>b</sup> ± 0,3
2 MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,40 <sup>ab</sup> ± 0,4	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3
3 MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,70 <sup>b</sup> ± 0,3	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.47. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost ARI ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost ARI ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost ARI ± SD
½ MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	2,10 <sup>b</sup> ± 0,5	2,20 <sup>b</sup> ± 0,6
1 MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	1,70 <sup>ab</sup> ± 0,4	2 <sup>b</sup> ± 0,6
2 MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	1,70 <sup>ab</sup> ± 0,7	2,20 <sup>b</sup> ± 0,6
3 MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	2,10 <sup>b</sup> ± 0,6	2,40 <sup>b</sup> ± 0,6

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.48. Učinak PBA apliciranih 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost HUE ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost HUE ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost HUE ± SD
½ MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	96,7 <sup>b</sup> ± 4,9	98,7 <sup>b</sup> ± 4,4
1 MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	93,6 <sup>b</sup> ± 4,1	96,6 <sup>b</sup> ± 6,2
2 MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	91,3 <sup>ab</sup> ± 9,5	99 <sup>b</sup> ± 5,1
3 MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	96,4 <sup>b</sup> ± 6,3	99,4 <sup>b</sup> ± 4,9

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.49. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost NIR ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost NIR ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost NIR ± SD
½ MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	17250,6 <sup>a</sup> ± 618,8	17504,8 <sup>ab</sup> ± 237,1
1 MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	17414,1 <sup>a</sup> ± 410,7	17832,1 <sup>b</sup> ± 390,4
2 MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	17160,6 <sup>a</sup> ± 723,7	17450 <sup>ab</sup> ± 763,6
3 MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	17336,6 <sup>a</sup> ± 426,4	17376 <sup>ab</sup> ± 719,7

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.8. Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na multispektralne parametre lista rajčice

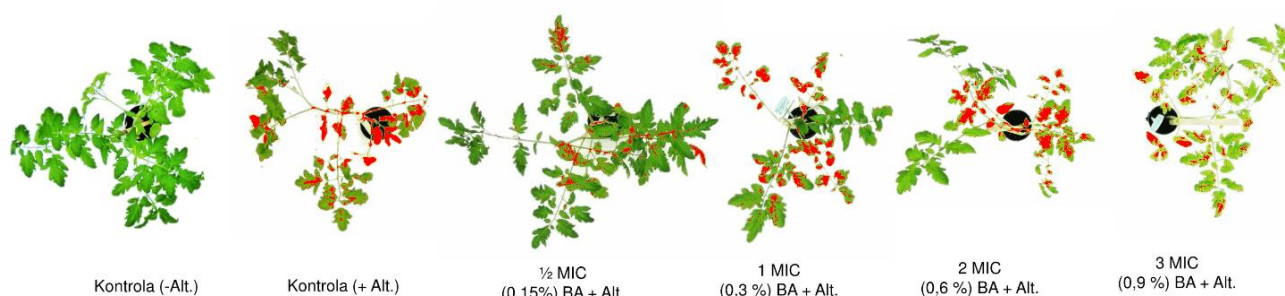
Antimikotički učinak raspona MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma koje uzrokuje gljivični patogen *A. alternata* na rajčici nakon 14 dana, prikazan je tablicom 4.50 i slikom 4.21. Klorotični i nekrotični simptomi zabilježeni su na svim test biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA. Na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC, 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 40 %, 83 % i 78 % simptomatske površine, dok na test biljkama na koje je aplicirana 1 MIC BA, zabilježeno je 2 % više simptomatske površine u odnosu na kontrolu bez BA (s patogenom).

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 3 MIC značajno su smanjene, dok srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana BA u koncentraciji 1 MIC i 2 MIC, nisu značajno promijenjene u odnosu na srednje vrijednosti simptomatske površine kontrolne varijante koja ne sadrži BA ( $P < 0,05$ , Tukey test).

Tablica 4.50. Antimikotički učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na jačinu simptoma u usporedbi s kontrolom nakon 14 dana.

koncentracija BA (%)	0 MIC + Alt.	½ MIC + Alt.	1 MIC + Alt.	2 MIC + Alt.	3 MIC + Alt.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	29,8 <sup>cd</sup> ± 7,1	11,8 <sup>a</sup> ± 1,5	30,4 <sup>d</sup> ± 3,1	24,6 <sup>bc</sup> ± 2,2	23,3 <sup>b</sup> ± 0,4

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.21 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije BA (7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata*) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

#### 4.4.1. Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

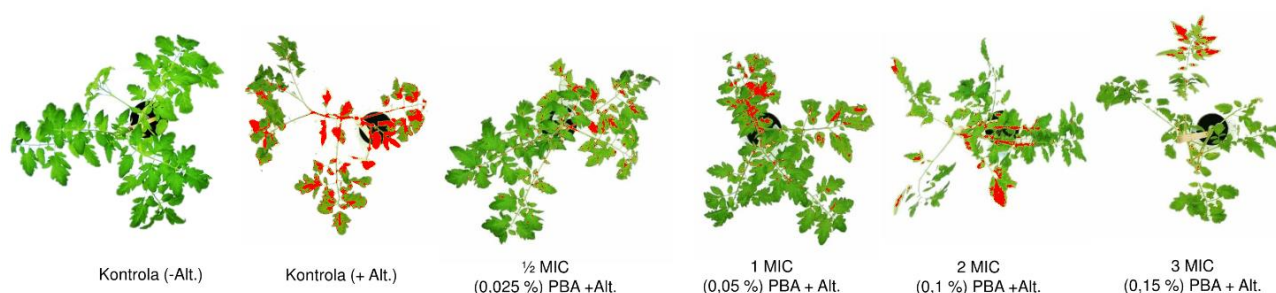
Rezultati prikazuju antimikotički učinak raspona MIC PBA (7 dana od aplikacije patogena) na jačinu simptoma koje uzrokuje gljivični patogen *A. alternata* na rajčici nakon 14 dana (Tablica 4.51. i slika 4.22). Simptomi kloroze i nekroze zabilježeni su na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA. Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 13 % i 40 % simptomatske površine, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC PBA, zabilježeno je 56 % i 59 % simptomatske površine u odnosu na kontrolnu varijantu koja sadrži samo patogena.

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA, značajno su manje u odnosu na srednje vrijednosti kontrolne varijante bez PBA prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ).

Tablica 4.51. Antimikotički učinak MIC PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na jačinu simptoma nakon 14 dana.

koncentracija PBA (%)	0 MIC + Alt.	½ MIC + Alt.	1 MIC + Alt.	2 MIC + Alt.	3 MIC + Alt.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	29,8 <sup>d</sup> ± 1,4	6,0 <sup>a</sup> ± 0,2	12 <sup>b</sup> ± 1,2	16,7 <sup>c</sup> ± 1,6	17,7 <sup>c</sup> ± 1,3

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.22 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije PBA (7 dana od aplikacije gljive *Alternaria alternata*) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

Antimikotički učinak na jačinu simptoma gljivičnog patogena *A. alternata* na rajčici nakon preventivne aplikacije PBA (7 dana prije aplikacije patogena) usporedno s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana, prikazan je tablično (Tablica 4.52).

Prema Tukey testu (P <0,05), srednje vrijednosti simptomatske površine koju uzrokuje patogen *A. alternata* na rajčici, značajno su smanjene u svim varijantama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %) 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA u odnosu na srednje vrijednosti u kontrolnim varijantama iste MIC koncentracije BA i varijantama bez PBA (s patogenom).

Tablica 4.52. Antimikotički učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na jačinu simptoma na rajčici u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD
½ MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 7,1	11,8 <sup>b</sup> ± 1,5	6,0 <sup>c</sup> ± 0,2
1 MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 7,1	30,4 <sup>a</sup> ± 3,1	12 <sup>b</sup> ± 1,2
2 MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 7,1	24,6 <sup>b</sup> ± 2,2	16,7 <sup>c</sup> ± 1,6
3 MIC	29,8 <sup>a</sup> ± 7,1	23,3 <sup>b</sup> ± 0,4	17,7 <sup>c</sup> ± 1,3

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.2. Antimikotički učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *A. alternata*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena *A. alternaria*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.53.

Srednje vrijednosti parametara CHI, HUE i NIR na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %), ne razlikuju se značajno unutar raspona MIC prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ). Kod test biljaka na koje je aplicirana BA u rasponu MIC koncentracija, srednje vrijednosti parametra ARI, značajno su više, u odnosu na srednje vrijednosti ARI kontrolnih biljaka bez BA (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.53. Antimikotički učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije *Alternaria alternata* na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>				
MIC BA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (+Alt.)	0,90 ± 0,4	1 <sup>a</sup> ± 0,5	80,2 ± 10,3	16404 ± 1199
½ MIC	1,60 ± 0,2	2 <sup>b</sup> ± 0,4	95,1 ± 3,7	18184,6 ± 538,8
1 MIC	1,30 ± 0,6	1,60 <sup>ab</sup> ± 0,7	88,2 ± 15,1	17040,6 ± 2403,8
2 MIC	1,60 ± 0,4	2 <sup>ab</sup> ± 0,6	92,8 ± 8,6	17397,6 ± 803
3 MIC	1,50 ± 0,4	1,90 <sup>ab</sup> ± 0,7	92,7 ± 8	16961,8 ± 804,2

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )

#### 4.4.3. Antimikotički učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive na *A. alternata*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC PBA (7 dana prije aplikacije patogena *A. alternata*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.54.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE i NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti parametara u kontrolnim varijantama bez PBA (0 MIC), osim srednjih vrijednosti NIR na biljkama na koje su aplicirane 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC čije srednje vrijednosti nisu značajno različite od vrijednosti istog parametra na test biljkama s ½ MIC i kontrolnim biljkama bez PBA (Tukey testu,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.54. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>				
MIC PBA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (+Alt.)	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1 <sup>a</sup> ± 0,5	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	16404 <sup>a</sup> ± 1199
½ MIC	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3	2,40 <sup>b</sup> ± 0,5	100 <sup>b</sup> ± 5,2	17921,5 <sup>b</sup> ± 509,4
1 MIC	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3	2,30 <sup>b</sup> ± 0,6	98,7 <sup>b</sup> ± 5,6	17083,1 <sup>ab</sup> ± 413,5
2 MIC	1,70 <sup>b</sup> ± 0,2	2 <sup>b</sup> ± 0,4	96,5 <sup>b</sup> ± 3,9	17197,8 <sup>ab</sup> ± 267,2
3 MIC	1,70 <sup>b</sup> ± 0,2	2,20 <sup>b</sup> ± 0,5	97 <sup>b</sup> ± 3,8	17493,8 <sup>ab</sup> ± 772,2

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )

Učinak preventivne aplikacije raspona MIC PBA (7 dana prije aplikacije patogena *A. alternata*) na četiri fiziološka parametra u usporedbi s kontrolnim varijantama istih MIC koncentracija BA i varijantom bez PBA, prikazan je tablicama 4.55 – 4.58.

Srednje vrijednosti CHI, ARI i HUE na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u usporedbi sa srednjim vrijednostima istih parametara kod biljaka u kontrolnim varijantama bez PBA, dok iste srednje vrijednosti (osim 1 MIC) nisu značajno različite u usporedbi sa srednjim vrijednostima parametara biljaka tretiranih s rasponom koncentracija BA (Tukey test,  $P < 0,05$ ). Kod biljaka na koje je aplicirana PBA u koncentraciji



1 MIC, 2 MIC i 3 MIC, srednje vrijednosti parametra NIR, nisu značajno promijenjene u odnosu na srednje vrijednosti istog parametra kod kontrolnih biljaka na koje je aplicirana BA u istim koncentracijama i biljaka bez PBA. Srednje vrijednosti parametra NIR kod test biljaka na koje je aplicirana ½ MIC PBA, značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti NIR kontrolnih biljaka koje ne sadrže PBA, dok u usporedbi sa srednjim vrijednostima NIR kod biljaka na koje je aplicirana BA u istoj koncentraciji, srednje vrijednosti nisu značajno promijenjene (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.55. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije patogena *Alternaria alternata* na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost CHI ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost CHI ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost CHI ± SD
½ MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,60 <sup>b</sup> ± 0,2	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3
1 MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,30 <sup>ab</sup> ± 0,6	1,80 <sup>b</sup> ± 0,3
2 MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,60 <sup>b</sup> ± 0,4	1,70 <sup>b</sup> ± 0,2
3 MIC	0,90 <sup>a</sup> ± 0,4	1,50 <sup>b</sup> ± 0,4	1,70 <sup>b</sup> ± 0,2

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.56. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O+Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost ARI ± SD	BA + Alt. srednja vrijednost ARI ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost ARI ± SD
½ MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	2 <sup>b</sup> ± 0,4	2,40 <sup>b</sup> ± 0,5
1 MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	1,60 <sup>ab</sup> ± 0,7	2,30 <sup>b</sup> ± 0,6
2 MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	2 <sup>b</sup> ± 0,6	20 <sup>b</sup> ± 0,4
3 MIC	1 <sup>a</sup> ± 0,5	1,90 <sup>ab</sup> ± 0,7	2,20 <sup>b</sup> ± 0,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.57. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O+ Alt. srednja vrijednost HUE ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost HUE ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost HUE ± SD
½ MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	95,1 <sup>b</sup> ± 3,7	100 <sup>b</sup> ± 5,2
1 MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	88,2 <sup>ab</sup> ± 15,1	98,7 <sup>b</sup> ± 5,6
2 MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	92,8 <sup>b</sup> ± 8,6	96,5 <sup>b</sup> ± 3,9
3 MIC	80,2 <sup>a</sup> ± 10,3	92,7 <sup>b</sup> ± 8	97 <sup>b</sup> ± 3,8

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.58. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije gljive *Alternaria alternata* na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Alt.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Alternaria alternata</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Alt. srednja vrijednost NIR ± SD	BA+ Alt. srednja vrijednost NIR ± SD	PBA+ Alt. srednja vrijednost NIR ± SD
½ MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	18184,6 <sup>b</sup> ± 538,8	17921,5 <sup>b</sup> ± 509,4
1 MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	17040,6 <sup>a</sup> ± 2403,8	17083,1 <sup>a</sup> ± 413,5
2 MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	17397,6 <sup>a</sup> ± 803	17197,8 <sup>a</sup> ± 267,2
3 MIC	16404 <sup>a</sup> ± 1199	16961,8 <sup>a</sup> ± 804,2	17493,8 <sup>a</sup> ± 772,2

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.4. Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

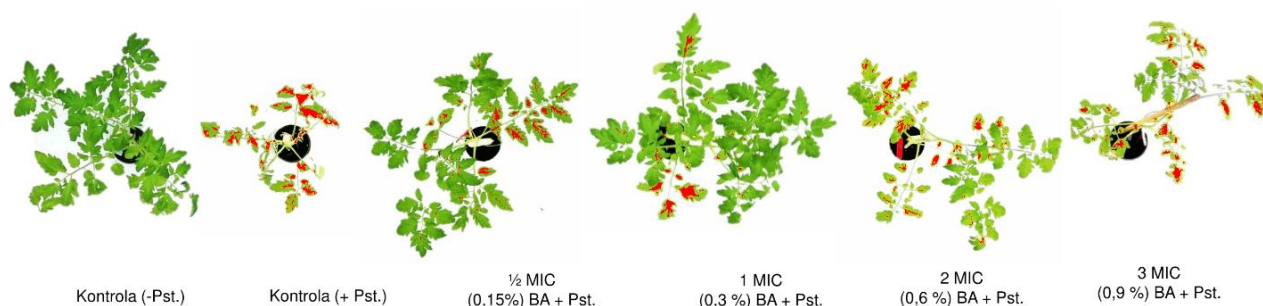
Rezultati antibakterijskog učinka raspona MIC BA (2 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma bakterijske pjegavosti koju uzrokuje patogen *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.59 i slikom 4.23. Klorotični i nekrotični simptomi zabilježeni su na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA. Na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 16 % i 26 % simptomatske površine, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 38 % i 69 % simptomatske površine u usporedbi s kontrolom bez BA (s patogenom).

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC, značajno su manje u odnosu na kontrolnu varijantu bez BA prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ).

Tablica 4.59. Antibakterijski učinak MIC BA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na jačinu simptoma nakon 14 dana.

koncentracija BA (%)	0 MIC +Pst.	½ MIC +Pst.	1 MIC +Pst.	2 MIC +Pst.	3 MIC +Pst.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	40,4 <sup>e</sup> ± 1,7	6,4 <sup>a</sup> ± 0,6	10,5 <sup>b</sup> ± 0,7	15,6 <sup>c</sup> ± 1,9	28,2 <sup>d</sup> ± 1,5

\*različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.23 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije BA (2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) u usporedbi s kontrolom (očitanje ImageJ).

#### 4.4.5. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

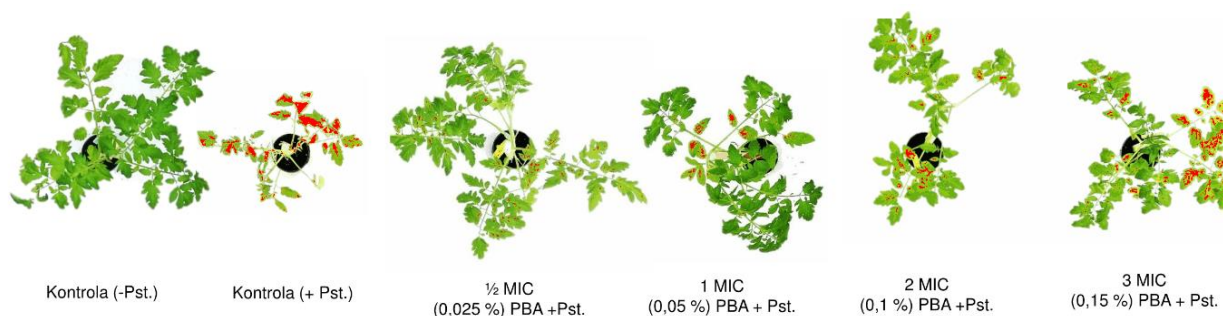
Rezultati antibakterijskog učinka raspona MIC PBA (2 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma bakterijskog patogena *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.60 i slikom 4.24. Klorotični i nekrotični simptomi zabilježeni su na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA. Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 7 % i 11 % simptomatske površine u odnosu na kontrolne varijante, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 18 % i 41 % simptomatske površine u usporedbi s kontrolom koja ne sadrži PBA (s patogenom).

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC, značajno su manje u odnosu na kontrolnu varijantu (bez PBA) prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ).

Tablica 4.60. Antibakterijski učinak MIC PBA aplicirane 2 dan prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na jačinu simptoma nakon 14 dana.

koncentracija PBA (%)	0 MIC +Pst.	½ MIC +Pst.	1 MIC +Pst.	2 MIC +Pst.	3 MIC +Pst.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	40,4 <sup>d</sup> ± 1,7	2,7 <sup>a</sup> ± 0,6	4,7 <sup>ab</sup> ± 0,5	7,7 <sup>b</sup> ± 0,3	16,9 <sup>c</sup> ± 2,0

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.24 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) u usporedbi s kontrolom (očitanja *ImageJ*).

Antibakterijski učinak preventivne aplikacije PBA (2 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma koje uzrokuje bakterija *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici, u usporedbi s kontrolnim varijantama (BA i +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana, prikazan je tablicom 4.61.

Prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ), srednje vrijednosti simptomatske površine na rajčici u svim varijantama -  $\frac{1}{2}$  MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA, značajno su manje u odnosu na srednje vrijednosti simptomatske površine u varijantama s istom MIC koncentracijom BA i varijantom bez PBA (samo s patogenom) (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.61. Antibakterijski učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na jačinu simptoma u usporedbi s kontrolom (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	BA+ Pst. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD
$\frac{1}{2}$ MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 1,7	6,4 <sup>b</sup> ± 0,6	2,7 <sup>c</sup> ± 0,6
1 MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 1,7	10,5 <sup>b</sup> ± 0,7	4,7 <sup>c</sup> ± 0,5
2 MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 1,7	15,6 <sup>b</sup> ± 1,9	7,7 <sup>c</sup> ± 0,3
3 MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 1,7	28,2 <sup>b</sup> ± 1,5	16,9 <sup>c</sup> ± 2,0

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.6. Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja četiri fiziološka parametra nakon aplikacije raspona MIC BA (2 dana prije aplikacije patogena *P. syringae* pv. *tomato*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.62.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE) na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %) i 2 MIC (0,6 %) značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti parametara u kontrolnoj varijanti bez BA, osim vrijednosti biljaka istih parametara na koje je aplicirana 3 MIC (0,9 %) prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ). Srednje vrijednosti ARI i HUE na biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC i 2 MIC, tj. CHI na biljkama na koje je primijenjena ½ MIC i 2 MIC, značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti kontrole bez BA i varijante na kojoj je aplicirana 3 MIC BA. Na test biljkama na koje je aplicirana BA u svim testiranim koncentracijama, srednje vrijednosti NIR više su u odnosu na vrijednosti zabilježene na kontrolnoj skupini koja ne sadrži BA (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.62. Učinak BA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na fiziološke parametre rajčice unutar raspona MIC koncentracija nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>				
MIC BA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (+Pst.)	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	0,94 <sup>a</sup> ± 0,5	82 <sup>a</sup> ± 11	15899,3 <sup>a</sup> ± 598,2
½ MIC	1,71 <sup>bc</sup> ± 0,2	2,22 <sup>bc</sup> ± 0,4	98,3 <sup>bc</sup> ± 4	17307,2 <sup>b</sup> ± 528,9
1 MIC	1,60 <sup>b</sup> ± 0,3	3,18 <sup>c</sup> ± 0,9	96 <sup>bc</sup> ± 4,8	17367,8 <sup>b</sup> ± 533,7
2 MIC	2,21 <sup>c</sup> ± 0,1	2,92 <sup>c</sup> ± 0,3	105,2 <sup>c</sup> ± 2,2	17843,7 <sup>b</sup> ± 262,6
3 MIC	1,43 <sup>ab</sup> ± 0,4	1,68 <sup>ab</sup> ± 0,5	91 <sup>ab</sup> ± 6,4	16937,5 <sup>b</sup> ± 809,7

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )

#### 4.4.7. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC PBA (2 dana prije aplikacije patogena *P. syringae* pv. *tomato*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.63.

Srednje vrijednosti testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti kontrolnih varijanti bez PBA prema Tukey testu (P <0,05).

Tablica 4.63. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na fiziološke parametre rajčice u usporedbi s kontrolom nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>				
MIC PBA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
0 MIC (+Pst.)	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	0,94 <sup>a</sup> ± 0,5	82 <sup>a</sup> ± 11	15899,3 <sup>a</sup> ± 598,2
½ MIC	1,95 <sup>b</sup> ± 0,2	2,50 <sup>b</sup> ± 0,4	101,4 <sup>b</sup> ± 3,6	17875,3 <sup>b</sup> ± 742,9
1 MIC	1,98 <sup>b</sup> ± 0,2	2,62 <sup>b</sup> ± 0,3	102,2 <sup>b</sup> ± 3,8	17687,7 <sup>b</sup> ± 688,5
2 MIC	1,66 <sup>b</sup> ± 0,3	2,14 <sup>b</sup> ± 0,5	97,2 <sup>b</sup> ± 6,4	17538,8 <sup>b</sup> ± 1058,2
3 MIC	1,66 <sup>b</sup> ± 0,2	2,11 <sup>b</sup> ± 0,3	97,5 <sup>b</sup> ± 3,4	17823,5 <sup>b</sup> ± 500,9

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test, P <0,05)

Antibakterijski učinak preventivne aplikacije PBA (2 dana prije aplikacije patogena *P. syringae* pv. *tomato*) na fiziološke parametre (CHI, ARI, HUE, NIR) rajčice u usporedbi s kontrolnom aplikacijom BA i kontrolom bez PBA unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana, prikazan je tablicama 4.64 – 4.67.

Srednje vrijednosti svih parametra (CHI, ARI, HUE i NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u MIC koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su promijenjene u usporedbi s vrijednostima istih parametara u kontrolnim varijantama bez PBA (s patogenom), dok u odnosu na srednje vrijednosti kontrolne varijante s BA, ne razlikuju se značajno. Srednje vrijednosti parametra CHI i ARI, u test biljkama na koje je aplicirana koncentracija 2 MIC PBA, značajno su smanjene u odnosu na srednje vrijednosti istih parametara biljaka na koje je aplicirana BA u istoj vrijednosti MIC (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.64. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O+Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost CHI ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost CHI ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost CHI ± SD
½ MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,71 <sup>b</sup> ± 0,2	1,95 <sup>b</sup> ± 0,2
1 MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,60 <sup>b</sup> ± 0,3	1,98 <sup>b</sup> ± 0,2
2 MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	2,21 <sup>b</sup> ± 0,1	1,66 <sup>c</sup> ± 0,3
3 MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,43 <sup>ab</sup> ± 0,4	1,66 <sup>b</sup> ± 0,2

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ) unutar iste vrijednosti MIC



Tablica 4.65. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice nakon 15 dana u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost ARI ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost ARI ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost ARI ± SD
½ MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,5	2,22 <sup>b</sup> ± 0,4	2,50 <sup>b</sup> ± 0,4
1 MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,5	3,18 <sup>b</sup> ± 0,9	2,62 <sup>b</sup> ± 0,3
2 MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,5	2,92 <sup>b</sup> ± 0,3	2,14 <sup>c</sup> ± 0,5
3 MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,5	1,68 <sup>b</sup> ± 0,5	2,11 <sup>b</sup> ± 0,3

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.66. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost HUE ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost HUE ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost HUE ± SD
½ MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	98,3 <sup>b</sup> ± 4	101,4 <sup>b</sup> ± 3,6
1 MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	96 <sup>b</sup> ± 4,8	102,2 <sup>b</sup> ± 3,8
2 MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	105,2 <sup>b</sup> ± 2,2	97,2 <sup>b</sup> ± 6,4
3 MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	91 <sup>ab</sup> ± 6,4	97,5 <sup>b</sup> ± 3,4

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Tablica 4.67. Učinak PBA aplicirane 2 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost NIR ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost NIR ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost NIR ± SD
½ MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 598,2	17307,2 <sup>b</sup> ± 528,9	17875,3 <sup>b</sup> ± 742,9
1 MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 598,2	17367,8 <sup>b</sup> ± 533,7	17687,7 <sup>b</sup> ± 688,5
2 MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 598,2	17843,7 <sup>b</sup> ± 262,6	17538,8 <sup>b</sup> ± 1058,2
3 MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 598,2	16937,5 <sup>b</sup> ± 809,7	17823,5 <sup>b</sup> ± 500,9

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.8. Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

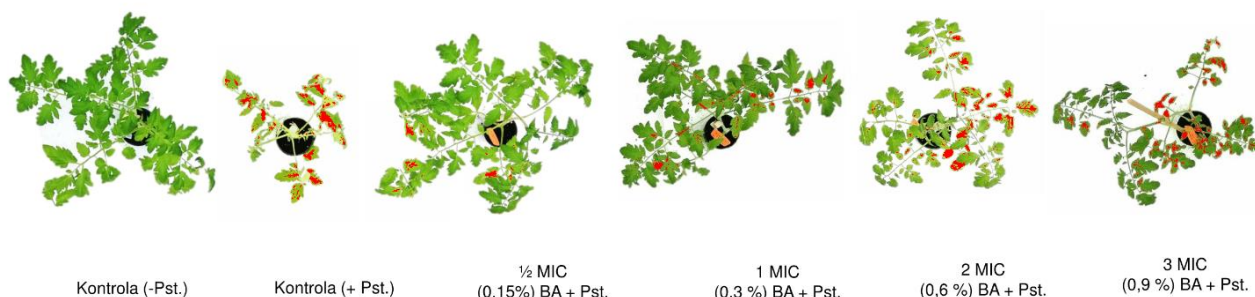
Rezultati antibakterijskog učinka raspona MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma bakterijske pjegavosti koju uzrokuje bakterija *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.68. i slikom 4.25. Klorotični i nekrotični simptomi zabilježeni su na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %) BA. Na test biljkama na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 9 % i 40 % simptomatske površine u odnosu na kontrolne varijante, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 51 % i 58 % simptomatske površine u usporedbi s kontrolom.

Srednje vrijednosti simptomatske površine biljaka na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC BA, značajno su manje u odnosu na kontrolnu varijantu bez BA (s patogenom) prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ). Srednje vrijednosti simptomatske površine test biljaka na koje je aplicirana BA u koncentracijama 2MIC i 3 MIC, nisu značajno različite (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.68. Antibakterijski učinak MIC BA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na jačinu simptoma nakon 14 dana.

koncentracija BA (%)	0 MIC +Pst.	½ MIC +Pst.	1 MIC +Pst.	2 MIC +Pst.	3 MIC +Pst.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	40,4 <sup>d</sup> ± 2,6	3,7 <sup>a</sup> ± 0,5	16,3 <sup>b</sup> ± 1,5	20,7 <sup>c</sup> ± 0,8	23,6 <sup>c</sup> ± 1,8

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.25 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

#### 4.4.9. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na jačinu simptoma bolesti rajčice

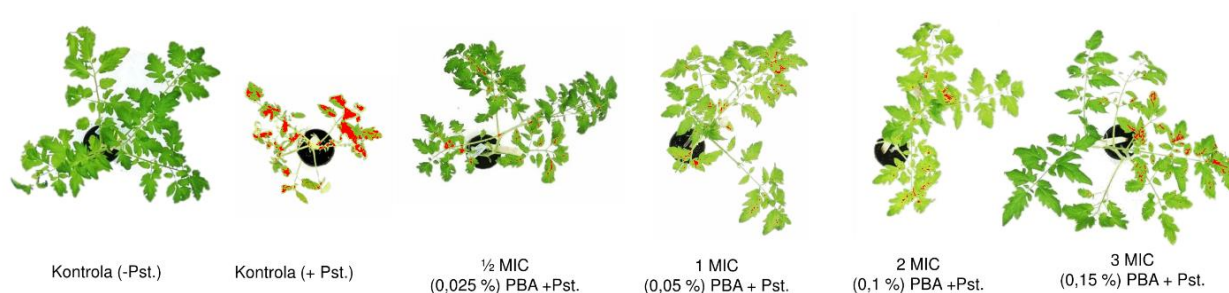
Rezultati antibakterijskog učinka raspona MIC PBA (7 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma bakterijskog patogena *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici nakon 14 dana, prikazani su tablicom 4.69. i slikom 4.26. Klorotični i nekrotični simptomi zabilježeni su na svim biljkama na koje je apliciran raspon koncentracija – ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %). Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC i 1 MIC, zabilježeno je 15 % i 12 % simptomatske površine, dok na test biljkama na koje je aplicirana 2 MIC i 3 MIC, zabilježeno je 5 % i 34 % simptomatske površine u usporedbi s kontrolom bez PBA (s patogenom).

Srednje vrijednosti simptomatske površine rajčica na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC, 2 MIC i 3 MIC PBA, značajno su manje u odnosu na srednje vrijednosti kontrolne varijante bez PBA (s patogenom) prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ). Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC, 1 MIC i 2 MIC, srednje vrijednosti nisu značajno različite (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.69. Antibakterijski učinak MIC PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na jačinu simptoma nakon 14 dana.

koncentracija PBA (%)	0 MIC +Pst.	½ MIC +Pst.	1 MIC +Pst.	2 MIC +Pst.	3 MIC +Pst.
srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	40,4 <sup>c</sup> ± 2,6	6,11 <sup>ab</sup> ± 5,4	4,8 <sup>ab</sup> ± 3,6	2,1 <sup>a</sup> ± 3,1	13,6 <sup>b</sup> ± 5,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu na razini  $P < 0,05$



Slika 4.26 Prikaz simptomatske površine rajčice 14 dana nakon preventivne aplikacije MIC PBA (7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) u usporedbi s kontrolom (očitanje *ImageJ*).

Antibakterijski učinak preventivne aplikacije PBA (7 dana prije aplikacije patogena) na jačinu simptoma koje uzrokuje bakterija *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici usporedno s kontrolnim varijantama (BA i dH<sub>2</sub>O+ Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana, prikazan je tablicom 4.70.

Prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ), srednje vrijednosti simptomatske površine koju uzrokuje patogen *P. syringae* pv. *tomato* na rajčici u varijantama s 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %) PBA, značajno su manje (osim ½ MIC koja je značajno viša), u odnosu na srednje vrijednosti simptomatske površine na kontrolnim varijantama s istom MIC BA i varijantom bez PBA (s patogenom) (Tukey test,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.70. Antibakterijski učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na jačinu simptoma u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 14 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost simptomatske površine (cm <sup>2</sup> ) ± SD
½ MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 2,6	3,7 <sup>b</sup> ± 0,5	6,11 <sup>c</sup> ± 5,4
1 MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 2,6	16,3 <sup>b</sup> ± 1,5	4,8 <sup>c</sup> ± 3,6
2 MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 2,6	20,7 <sup>b</sup> ± 0,8	2,1 <sup>c</sup> ± 3,1
3 MIC	40,4 <sup>a</sup> ± 2,6	23,6 <sup>b</sup> ± 1,8	13,6 <sup>c</sup> ± 5,5

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ) unutar iste vrijednosti MIC

#### 4.4.10. Antibakterijski učinak borne kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije raspona MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena *P. syringae* pv. *tomato*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.71.

Srednje vrijednosti parametra ARI na test biljkama na koje je aplicirana BA u svim testiranim koncentracijama - ½ MIC (0,15 %), 1 MIC (0,3 %), 2 MIC (0,6 %) i 3 MIC (0,9 %), značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti ARI u kontrolnim varijantama (bez BA), dok srednje vrijednosti parametra HUE na test biljkama na koje je aplicirana BA u svim testiranim koncentracijama, nisu značajno promijenjene u odnosu na srednje vrijednosti HUE u kontrolnim varijantama (bez BA). Kod test biljaka na koje je su aplicirane koncentracije ½ MIC, 2 MIC i 3 MIC BA, srednje vrijednosti CHI značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti CHI u kontrolnim varijantama, dok srednje vrijednosti CHI u varijantama s 1 MIC BA, nisu značajno različite u odnosu na srednje vrijednosti parametra u kontroli. Također, kod test biljaka na koje je aplicirana BA u koncentracijama ½ MIC i 3 MIC, srednje vrijednosti NIR, značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti NIR u kontrolnim varijantama i u test varijantama s 1 MIC i 2 MIC BA koje nisu značajno različite u odnosu na srednje vrijednosti NIR u kontroli (Tukey testu,  $P < 0,05$ ).

Tablica 4.71. Učinak BA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na fiziološke parametre rajčice u usporedbi s kontrolom nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>				
MIC BA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
MIC 0 (+Pst.)	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	0,94 <sup>a</sup> ± 0,4	82 ± 11	15899,3 <sup>a</sup> ± 596,2
½ MIC	1,63 <sup>b</sup> ± 0,2	2,24 <sup>b</sup> ± 0,4	94,5 ± 3,3	19139,5 <sup>c</sup> ± 371,8
1 MIC	1,32 <sup>ab</sup> ± 0,4	1,80 <sup>b</sup> ± 0,4	84,6 ± 1,3	16472,8 <sup>ab</sup> ± 216
2 MIC	1,63 <sup>b</sup> ± 0,1	1,97 <sup>b</sup> ± 0,2	94,2 ± 2,7	17421,8 <sup>abc</sup> ± 402,7
3 MIC	1,54 <sup>b</sup> ± 0,4	1,95 <sup>b</sup> ± 0,4	92 ± 6,2	18001,5 <sup>bc</sup> ± 615,4

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )

#### 4.4.11. Antibakterijski učinak fenilboronske kiseline (aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *P. syringae* pv. *tomato*) na multispektralne parametre lista rajčice

Rezultati testiranja fizioloških parametara nakon aplikacije MIC BA (7 dana prije aplikacije patogena *P. syringae* pv. *tomato*) na rajčici nakon 15 dana, prikazani su tablicom 4.72. Srednje vrijednosti svih testiranih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti kontrolnih varijanti (bez PBA) prema Tukey testu ( $P < 0,05$ ).

Tablica 4.72. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na fiziološke parametre rajčice u usporedbi s kontrolom nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>				
MIC PBA	srednja vrijednost CHI ± SD	srednja vrijednost ARI ± SD	srednja vrijednost HUE ± SD	srednja vrijednost NIR ± SD
MIC 0 (+Pst.)	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	0,94 <sup>a</sup> ± 0,4	82 <sup>a</sup> ± 11	15899,3 <sup>a</sup> ± 596,2
½ MIC	1,87 <sup>b</sup> ± 0,3	2,39 <sup>b</sup> ± 0,5	100,1 <sup>b</sup> ± 4,5	17363,0 <sup>b</sup> ± 423
1 MIC	1,65 <sup>b</sup> ± 0,2	2,18 <sup>b</sup> ± 0,1	96,6 <sup>b</sup> ± 4,5	18461,8 <sup>c</sup> ± 697
2 MIC	1,70 <sup>b</sup> ± 0,2	2,20 <sup>b</sup> ± 0,1	95,4 <sup>b</sup> ± 2,1	19187,3 <sup>c</sup> ± 929,9
3 MIC	1,70 <sup>b</sup> ± 0,1	2,23 <sup>b</sup> ± 0,1	97,3 <sup>b</sup> ± 0,4	18662,8 <sup>c</sup> ± 309

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti fizioloških parametara unutar raspona MIC koncentracija (Tukey test,  $P < 0,05$ )

Učinak preventivne aplikacije PBA (7 dana prije aplikacije patogena *P. syringae* pv. *tomato*) na analizirane parametre (CHI, ARI, HUE, NIR) rajčice usporedno s kontrolnim varijantama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana, prikazan je tablicama 4.73 – 4.76.

Srednje vrijednosti parametra CHI na test biljkama na koje je aplicirana PBA u testiranim koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u usporedbi sa srednjim vrijednostima CHI kod biljaka u kontrolnim varijantama na koje je apliciran samo patogen, dok iste vrijednosti (osim 1 MIC) u svim varijantama MIC PBA, nisu značajno promijenjene u usporedbi sa srednjim vrijednostima CHI kod biljaka u kontrolnim varijantama na koje aplicirana ista MIC BA (Tukey test,  $P < 0,05$ )

Tablica 4.73. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na sadržaj klorofila (CHI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost CHI ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost CHI ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost CHI ± SD
½ MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,63 <sup>b</sup> ± 0,2	1,87 <sup>b</sup> ± 0,3
1 MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,32 <sup>ab</sup> ± 0,4	1,65 <sup>b</sup> ± 0,2
2 MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,63 <sup>b</sup> ± 0,1	1,70 <sup>b</sup> ± 0,2
3 MIC	0,92 <sup>a</sup> ± 0,4	1,54 <sup>b</sup> ± 0,4	1,70 <sup>b</sup> ± 0,1

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Srednje vrijednosti ARI na test biljkama na koje je aplicirana PBA u svim testiranim koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u usporedbi sa srednjim vrijednostima ARI kod biljaka u kontrolnim varijantama koje sadrže samo patogena, dok iste vrijednosti u svim varijantama PBA, nisu značajno različite u usporedbi sa srednjim vrijednostima ARI kod biljaka na koje su aplicirane MIC koncentracije BA (Tukey test, P <0,05).

Tablica 4.74. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na sadržaj antocijanina (ARI) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst. srednja vrijednost ARI ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost ARI ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost ARI ± SD
½ MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,4	2,24 <sup>b</sup> ± 0,4	2,39 <sup>b</sup> ± 0,5
1 MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,4	1,80 <sup>b</sup> ± 0,4	2,18 <sup>b</sup> ± 0,1
2 MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,4	1,97 <sup>b</sup> ± 0,2	2,20 <sup>b</sup> ± 0,1
3 MIC	0,94 <sup>a</sup> ± 0,4	1,95 <sup>b</sup> ± 0,4	2,23 <sup>b</sup> ± 0,1

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC



Srednje vrijednosti HUE na test biljkama na koje je aplicirana PBA u svim testiranim koncentracijama - ½ MIC (0,025 %), 1 MIC (0,05 %), 2 MIC (0,1 %) i 3 MIC (0,15 %), značajno su više u usporedbi sa srednjim vrijednostima HUE kod biljaka u kontrolnim varijantama koje sadrže samo patogena. Na test biljkama na koje je aplicirana PBA u koncentracijama ½ MIC, 2 MIC i 3 MIC, srednje vrijednosti parametra HUE značajno su više u odnosu na srednje vrijednosti HUE kod biljaka u kontrolnim varijantama na koje je aplicirana BA u istom rasponu koncentracija.

Tablica 4.75. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na parametar pojavnosti boje (HUE) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst srednja vrijednost HUE ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost HUE ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost HUE ± SD
½ MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	94,5 <sup>b</sup> ± 3,3	100,1 <sup>b</sup> ± 4,5
1 MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	84,6 <sup>a</sup> ± 1,3	96,6 <sup>b</sup> ± 4,5
2 MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	94,2 <sup>b</sup> ± 2,7	95,4 <sup>b</sup> ± 2,1
3 MIC	82 <sup>a</sup> ± 11	92 <sup>ab</sup> ± 6,2	97,3 <sup>b</sup> ± 0,4

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

Srednje vrijednosti NIR na test biljkama na koje je aplicirana ½ MIC, značajno su manje, dok su vrijednosti NIR na biljkama s apliciranom 2 MIC PBA značajno više u usporedbi sa srednjim vrijednostima NIR kod biljaka u kontrolnim varijantama bez PBA i varijantama na koje je aplicirana ista MIC BA. Iste vrijednosti u varijantama s 1 MIC i 3 MIC PBA, nisu značajno promijenjene u usporedbi sa srednjim vrijednostima NIR kod biljaka u kontrolnim varijantama na koje aplicirana BA, ali su značajno više u odnosu na kontrolnu varijantnu koja sadrži samo patogena (Tukey test, P <0,05).

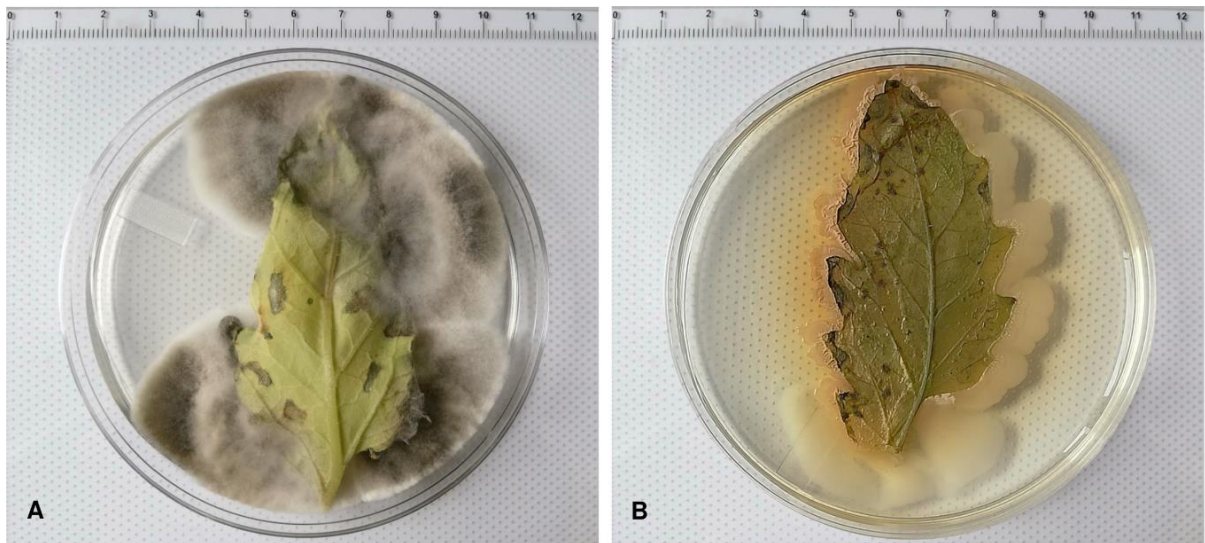
Tablica 4.76. Učinak PBA aplicirane 7 dana prije aplikacije bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* na parametar refleksije blizu infracrvenog zračenja (NIR) rajčice u usporedbi s kontrolama (BA i dH<sub>2</sub>O +Pst.) unutar iste vrijednosti MIC nakon 15 dana.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>			
MIC	dH <sub>2</sub> O +Pst srednja vrijednost NIR ± SD	BA +Pst. srednja vrijednost NIR ± SD	PBA +Pst. srednja vrijednost NIR ± SD
½ MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 596,2	19139,5 <sup>b</sup> ± 371,8	17363,0 <sup>c</sup> ± 423
1 MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 596,2	16472,8 <sup>ab</sup> ± 216	18461,8 <sup>b</sup> ± 697
2 MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 596,2	17421,8 <sup>b</sup> ± 402,7	19187,3 <sup>c</sup> ± 929,9
3 MIC	15899,3 <sup>a</sup> ± 596,2	18001,5 <sup>b</sup> ± 615,4	18662,8 <sup>b</sup> ± 309

\* različita slova označavaju statistički značajnu razliku prema Tukey testu (P <0,05) unutar iste vrijednosti MIC

## 4.5. Rezultati Kochovih postulata

Kochovi postulati za fitopatogene vrste korištene u istraživanju *in vivo*, potvrđeni su u uvjetima *in vitro* prema metodi Mitchell (1997). Rezultati ponovljene morfološke i molekularne identifikacije reizoliranih patogena iz lisnog materijala sa simptomima (gljivične) koncentrične (Slika 4.27 A) i bakterijske pjegavosti (Slika 4.27 B), potvrđuju fitopatogenu gljivu *A. alternata* i bakteriju *P. syringae* pv. *tomato* korištene u istraživanju *in vivo*.



Slika 4.27 Reizolacija gljive *Alternaria alternata* iz lista rajčice sa simptomima koncentrične pjegavosti nakon 5 dana na PDA supstratu (A) i bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* iz lista rajčice sa simptomima bakterijske pjegavosti nakon 3 dana na KB (B).

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Pokus *in vitro* - Metoda *poisoned food*

Rezultati istraživanja antimikotičkog učinka PBA *in vitro* na fitopatogenu gljivu *A. alternata*, pokazuju potpunu inhibiciju rasta micelija gljive pri niskim koncentracijama primijenjene PBA (0,05 %). Ovaj dio istraživanja je u skladu s antimikotičkim učinkom *in vitro* Liu i sur. (1994) u kojem je primijenjena PBA u koncentraciji 0,3 %, u potpunosti inhibirala rast i razvoj bazidiomicetnih gljiva koje uzrokuju propadanje drva japanskog cedra. Uspoređujući rezultate antimikotičkog učinka PBA na bazidiomicetnim gljivama i rezultate ovog dijela istraživanja, značajna razlika je u izraženijoj osjetljivosti askomicetne gljive *A. alternata*, čiji je rast inhibiran pri 6 puta nižoj koncentraciji PBA (0,05 %). Nadalje, prilikom istraživanja antimikotičkog učinka BA na navedenog patogena, uočen je rast micelija na svim hranjivim podlogama s testiranim rasponom koncentracija BA tj. potpuna supresija micelija gljive nije uočena niti u jednoj varijanti. Uočene razlike antimikotičkog učinka testiranih boronskih kiselina u širokom rasponu koncentracija na rast micelija *A. alternata* mogu biti posljedica mogućnosti da neke koncentracije BA imaju stimulatívni učinak na rast micelija gljive na hranjivoj podlozi što potvrđuje istraživanje Singh i Khanna (1969). Alternativno, budući da je rast gljive smanjen kod svih testiranih koncentracija BA u sličnoj mjeri, razlike među njima mogu biti posljedica eksperimentalnih varijacija. Morfološke karakteristike micelija uzgojenog na podlozi s različitim koncentracijama BA, razlikuju se u odnosu na kontrolu. Micelij je manje obojen i manje razgranat za razliku od micelija koji raste na supstratu bez BA. To bi moglo biti zato što BA u određenoj koncentraciji dovodi do smanjenja sporulacije *A. alternata* iako nema značajnog smanjenja rasta micelija između medija koji sadrže različite koncentracije BA. Kako je gljiva *A. alternata* folijarni patogen, čija patogenost ovisi o sporulaciji i načinu širenja konidija (Reis i sur., 2006), inhibicija sporulacije je važna karakteristika u smanjenju procesa širenja bolesti. Premda BA nema antimikotički učinak u testiranim koncentracijama, sukladno smanjenju brzine rasta i sporulacije gljive *A. alternata*, može se zaključiti da BA ima fungistatski učinak pri 6 puta većoj koncentraciji od primijenjene koncentracije PBA. U studiji *in vitro* Bhalerao i sur. (2019), metoda *poisoned food* pokazala je da BA u koncentraciji od 1 % i 2 % inhibira rast i razvoj patogene gljive *A. solani* dok je u studiji Patel i sur. (2005) BA primijenjena u koncentraciji od 0,2 %, smanjila klijanje spora *Alternaria* sp. za 44 %, u koncentraciji od 0,5 % za 39 % i u koncentraciji od 1 % za 36 % u odnosu na kontrolu nakon 48 sati inkubacije. Među prvim istraživanjima učinka BA na fitopatogene vrste gljiva, uočeno je da je *A. alternata* tolerantna na BA (Singh i Khanna, 1969), što je potvrđeno ovim istraživanjem *in*

*vitro*. Premda je riječ o fungistatskom učinku BA na gljivu *A. alternata*, 0,3 % BA prihvaćena je kao MIC BA budući da gljiva na mediju s navedenom koncentracijom, gotovo da ne i razvija spore.

Osim antimikotičkog učinka, rezultati ovog istraživanja *in vitro* potvrđuju i antibakterijski učinak PBA na bakterioznog patogena *P. syringae* pv. *tomato* pri nižim koncentracijama PBA (0,05 %) što se očituje u potpunoj inhibiciji bakterijskih kolonija u svim testiranim koncentracijama višim od 0,04 %. Za razliku od PBA, potpuna inhibicija bakterijskih kolonija zabilježena je na hranjivom mediju koji sadrži najveću testiranu koncentraciju BA (0,3 %) (Martinko i sur., 2021) što je u skladu s rezultatima istraživanja Yilmaza i sur. (2012) prema kojima MIC BA od 0,76 % ima antibakterijski učinak na medicinski značajnu vrstu *Pseudomonas aeruginosa*. Slični rezultati postignuti su i u istraživanju Sayin i sur. (2016), gdje MIC BA iznosi između 0,07 % i 0,15 % što sugerira da različiti mediji i primijenjene koncentracije BA mogu biti razlog za takve varijacije MIC-a, kao što su primijetili Caroline i Campbell (1990). Također, različite vrste unutar roda *Pseudomonas* mogu biti različito osjetljive na BA (Caroline i Campbell, 1990). Zanimljivo je da u protokolu pripreme selektivnog King B agara za detekciju *Pseudomonas syringae*, BA se koristi kao dodatak smjesi (Mohan i Schaad, 1985) što potvrđuje kako BA u određenoj koncentraciji stimulira rast i razvoj bakterije na hranjivoj podlozi. Primijećeno je kako na mediju s 0,05 % BA broj kolonija bakterije *P. syringae* pv. *tomato* je veći u odnosu na broj kolonija kontrolne petrijevke bez BA, dok je rast bakterije u potpunosti reduciran na podlozi s istom koncentracijom PBA. Premda je broj kolonija bakterioznog patogena bio veći za 12 % u odnosu na kontrolu, ukupna površina kolonija bakterije na istom mediju s BA reducirana je za 78 % u odnosu na površinu kolonija kontrolne petrijevke. Evidentno je kako je patogen u prisustvu BA u hranjivoj podlozi razvio veći broj kolonija, ali manje ukupne površine što ne upućuje na stimulativni učinak BA već razlog takvih varijacija vjerojatno je posljedica interaktivnog odgovora bakterija na biokemijske karakteristike hranjivog medija s inhibitornim čimbenikom, a to potvrđuje nekoliko istraživanja (Cooper i sur., 1968; Jeanson i sur., 2015). Zanimljivo je kako je PBA u niskoj koncentraciji (0,05 %) smanjila broj kolonija bakterioznog patogena, dok je učinak navedene koncentracije PBA na veličinu kolonija patogena pokazao jednak učinak iste koncentracije BA. Temeljem antibakterijskog učinka boronskih kiselina, određena MIC PBA iznosi 0,05 %, dok MIC BA iznosi 0,3 % za bakteriju *P. syringae* pv. *tomato*.

Slični rezultati redukcije broja i veličine bakterijskih kolonija zabilježeni su u dijelu laboratorijskog istraživanja s kontaminirajućom bakterijom *E. coli* kojim je dokazan antibakterijski učinak boronskih kiselina na broj kolonija *E. coli* pri relativno niskim koncentracijama (0,1 % MIC PBA i 0,3 % MIC BA), gdje PBA ima veći antibakterijski učinak

u odnosu na BA kojoj je utvrđena 3 puta veća inhibitorna koncentracija od koncentracije primijenjene PBA. Jednako kao i u dijelu istraživanja s patogenom *P. syringae* pv. *tomato*, broj i veličina kolonija bakterije *E. coli* nisu proporcionalni s povećanjem koncentracije boronskih kiselina u hranjivom mediju već su promijenjivi, ali reducirani u odnosu na kontrolnu varijantu. Također, antibakterijski učinak PBA pri 0,05 % na broj kolonija bakterija *E. coli* značajniji je u odnosu na istu koncentraciju BA, a na veličinu kolonija pokazuje jednako inhibitoran učinak kao i BA. Promatranjem broja i veličine kolonija uslijed rasta na podlogama koje sadrže (P)BA, bakterije razvijaju veći broja kolonija, ali su manje, tj. ukupna površina kolonija je manja što upućuje na mogući obrambeni mehanizam bakterija kao odgovor na inhibitorni učinak boronskih kiselina prisutnih u hranjivoj podlozi.

## **5.2. Pokus *in vitro* - Metoda inaktivacija kontaminirajuće bakterije *E. coli* ispiranjem plodova rajčice**

Da su eksperimentalne varijacije posljedica različitih medija i koncentracija boronskih kiselina (Caroline i Campbell, 1990), ali i laboratorijskih metoda, najbolje se primijeti u rezultatima inhibitornog učinka boronskih kiselina na bakteriju *E. coli* testiranog metodom ispiranja kontaminiranih plodova rajčice u otopinama MIC koncentracija (P)BA, prethodno određenih *poisoned food* metodom u laboratorijskim uvjetima. Rezultati ovog pokusa *in vitro* dokazali su da PBA pri niskoj koncentraciji (0,05 %), nakon simuliranog ispiranja kontaminiranih plodova rajčice u toj otopini, dovodi do značajno većeg inhibitornog učinka na broj (za 39 %) i na površinu (za 30 %) kolonija bakterije *E. coli*, u odnosu na kontrolno ispiranje sterilnom destiliranom vodom. Pri tome je učinak PBA (0,05 %) imao značajno viši inhibitorni učinak (72 %) na površinu kolonija *E. coli*, dok je na broj kolonija taj učinak bio isti u usporedbi s 3 puta većom koncentracijom BA. Zanimljivo je da je u varijanti bez ekspozicije, najmanja korištena koncentracija PBA (0,05 %), značajno (za 39 %) inhibirala populaciju bakterije *E. coli* na hranjivoj podlozi u odnosu na kontrolu sa sterilnom destiliranom vodom i etanolom (za 46 %), dok značajna razlika u inhibitornom učinku nije primijećena u usporedbi s BA tj. boronske kiseline su imale isti učinak na bakteriju. Također, potpuna inhibicija populacije *E. coli* nije primijećena ni pri najvišoj koncentraciji PBA (0,3 %). Temeljem pregleda literature i pretpostavke kako će izloženost kontaminiranih plodova rajčice u otopini boronskih kiselina dovesti do veće inhibicije bakterije, ovaj dio istraživanja *in vitro* nadopunjen je uvođenjem vremenske ekspozicije u trajanju od 120 min. Trajanje ekspozicije određeno je preliminarnim pokusom kojim je dokazano da ekspozicija plodova

rajčice u otopinama boronskih kiselina ne dovodi do raspucavanja ploda niti do promjene boje, što bi ukazivalo na negativan učinak kiselina na plod rajčice, na što su upozorili Zhang i sur. (2019). S dužom vremenskom izloženošću plodova otopini niske koncentracije PBA (0,05 %), zabilježen je inhibitorni učinak na broj (za 21 %), ali značajno veći učinak na površinu (za 89 %) kolonija bakterije *E. coli*, u odnosu na učinak istog MIC-a BA. U ostalim varijantama, inhibitorni učinak se također očitovao u značajnom smanjenju površine kolonija *E. coli* što je proporcionalno povećanju primijenjenih MIC koncentracija PBA. Premda je broj kolonija bakterija na hranjivim podlogama varirao, povećanje broja kolonija u odnosu na kontrolne varijante nije zabilježeno. U pokusu sa 120-minutnim izlaganjem niskoj koncentraciji PBA (0,05 %) uočeno je značajno veće smanjenje površine kolonija bakterije *E. coli* (89 %) u odnosu na smanjenje površine postignuto istom koncentracijom BA, što čini primjetnu razliku u redukciji površine kolonija *E. coli* s ekspozicijom plodova od one zabilježene u varijantama bez produžene vremenske ekspozicije (za 72 %). Također, evidentno je da je veći inhibitorni učinak na bakteriju *E. coli*, već pri nižim koncentracijama, postignut ekspozicijom kontaminiranih plodova rajčice otopini PBA (97 %) u odnosu na inhibitorni učinak bez vremenske ekspozicije plodova (za 30 %) u istoj otopini. S druge strane, kod ispiranja kontaminiranih plodova rajčice s nižim koncentracijama BA, zamijećen je stimulativni učinak BA na povećanje površine kolonija *E. coli* bez ekspozicije u odnosu na kontrolne varijante, što nije primijećeno kod ispiranja s PBA. Usprkos razlici u laboratorijskim metodama aplikacije BA, rezultati inhibicije bakterije *E. coli* ispiranjem plodova s BA u varijanti s vremenskom ekspozicijom, potvrđuju rezultati dobiveni u radu Yilmaza (2012), gdje je 0,76 % BA u hranjivom mediju inhibirala bakteriju *E. coli*, dok inhibicija bakterije u navedenoj koncentraciji BA nije bila potpuna u varijanti bez ekspozicije. Predloženo je kako određena vremenska izloženost bakterijske stanice boronskim kiselinama dovodi do veće inhibicije bakterijskih kolonija *E. coli*. To potvrđuju rezultati dobiveni u prvom dijelu istraživanja *in vitro* gdje je zabilježena potpuna inhibicija rasta kolonija bakterije *E. coli* korištenjem metode *poisoned food*, kojom je bakterija izložena kontinuiranoj absorpciji boronskih kiselina zajedno s hranjivim komponentama iz medija, što nije slučaj u ovom dijelu pokusa *in vitro*. Pretpostavlja se kako je razlika u inhibitornom učinku boronskih kiselina između metoda posljedica razlike u vremenskoj izloženosti bakterija *E. coli* boronskim kiselinama. Da je vremenska ekspozicija značajna za inhibiciju kontaminirajućih bakterija u otopini boronskih kiselina sugeriraju rezultati istraživanja Shen i sur. (2013), koji potvrđuju bolju inaktivaciju bakterije *E. coli* u vodenoj otopini klora uz uvođenje vremenske ekspozicije. Također, potvrđeno je da inaktivacija patogena *E. coli* ovisi o učinkovitosti i koncentraciji spoja te vremenu ekspozicije bakterije (P)BA, što je dokazano dobivenim rezultatima istraživanja *in vitro*. Poznato je da učinkovitost

antibakterijskih spojeva ovisi o sposobnosti da prodru u stanicu preko stanične membrane te postignu letalnu koncentraciju na ciljnom mjestu unutar stanice u svrhu antimikrobnog djelovanja (Virto i sur., 2005). Veća inhibicija bakterije *E. coli*, nakon vremenske ekspozicije, sugerira da se PBA prilikom ulaska u bakterijsku stanicu degradirala do toksičnog fenilnog spoja, što je dovelo do ugibanja bakterijskih stanica (Freeman, 2010) u odnosu na bakterije koje nisu bile dovoljno vremenski izložene PBA koja, pretpostavljeno, nije ušla u sve stanice bakterija. Komparacijom dobivenih rezultata oba pokusa *in vitro* uočene su razlike između inhibitornog učinka na *E. coli* korištenjem otopljene PBA u destiliranoj vodi uz ekspoziciju (pri čemu je antibakterijski učinak postignut pri 0,05 %) i inhibitornog učinka PBA otopljene u hranjivom mediju (antibakterijski učinak pri 0,1 %). Dobivene rezultate moguće je objasniti rezultatima istraživanja Virto i sur. (2005) kojima je dokazano da je inaktivacija bakterije *E. coli* klorom otopljenim u destiliranoj vodi, značajno veća od inaktivacije bakterija koje su bile izložene kloru u organskom mediju. Njihovi rezultati sugeriraju kako su oštećenja stanične membrane bakterije veća u vodi u odnosu na organski medij koji je spriječio propusnost stanične membrane i prodiranje klora u stanicu bakterije.

### 5.3. Pokus *in vivo* na rajčici

Dobiveni rezultati inhibicije gljivičnog i bakterioznog patogena rajčice nakon aplikacije boronskih kiselina u laboratorijskim uvjetima, istraženi su i u uvjetima plastenika. Pokusom *in vivo*, testiran je učinak BA i njenog derivata PBA u suzbijanju simptoma koncentrične pjegavosti (kod rajčica zaraženih gljivom *A. alternata*) i bakteriozne pjegavosti (kod rajčica zaraženih bakterijom *P. syringae* pv. *tomato*). Praćenjem izgleda i intenziteta lezija na listovima testiranih rajčica, kao i mjerenjem četiri odabrana fiziološka parametra koji odražavaju zdravlje biljaka, rezultati su pokazali da BA i PBA djeluju profilaktički na gljivičnu i bakterijsku infekciju. Takav učinak postignut je smanjenjem jačine simptoma gljivične i bakterijske bolesti rajčice i sprječavanjem negativnog utjecaja na fiziološke parametare koji nastupaju nakon zaraze rajčica patogenima.

Rezultati učinka boronskih kiselina aplicirani u rasponu MIC koncentracija (2 dana i 7 dana prije aplikacije vode) i kvantificirani na temelju ukupne površine lezija (uglavnom kloroza i nekroza) pomoću računalnog programa *ImageJ*, bilježe veću ukupnu površinu lezija na listovima rajčica u odnosu na biljke iz kontrolne skupine na koje nisu aplicirane (P)BA. Računalni program *ImageJ* zabilježio je čak i blage depigmentacije na lisnoj površini, a uočena ograničena područja blage depigmentacije uglavnom su klorotične lezije. Sukladno kvantifikaciji promjene obojenja lisne površine pomoću *ImageJ*, primijećeno je



kako PBA (aplicirana preventivno 2 dana prije aplikacije vode) pri niskim koncentracijama (0,025 %), uzrokuje smanjenu pojavu lezija (za 30 %) na listovima rajčice, dok ista koncentracija PBA (primijenjena 7 dana prije aplikacije vode) uzrokuje značajno više lezija (za 48 %) u usporedbi s učinkom 6 puta veće koncentracije BA. Primjetno je da je ukupna površina lezija proporcionalna porastu koncentracija uslijed preventivne aplikacije boronskih kiselina na listovima test rajčica. Premda je pomoću programa *ImageJ* zabilježena viša ukupna površina lezija na rajčicama na koje su aplicirane boronske kiseline (< 50 %), vrijednosti analiziranih fizioloških parametara istih biljaka nisu promijenjene u odnosu na vrijednosti istih parametara biljaka iz kontrolne skupine bez tretmana s (P)BA. Zanimljivo je da ne postoji razlika između vrijednosti fizioloških parametara kao posljedice aplikacije PBA, u odnosu na vrijednosti analiziranih parametara biljaka na koje je aplicirana BA u istraženom rasponu koncentracija. Ukratko, rezultati dobiveni pomoću *ImageJ*, ne prate rezultate dobivene analizom fizioloških parametara rajčica iz varijante u kojoj su aplicirane P(BA), premda se promjene u fiziologiji rajčica naziru. Interesantno je kako aplikacija kiselina na površinu listova rajčica nije dovela do smanjenja ili povećanja analiziranih fizioloških parametara u odnosu na biljke koje nisu bile tretirane s (P)BA. Razlog neproporcionalnosti podataka (dobivenih pomoću *ImageJ* i analize fizioloških parametara rajčica) sugerira kako aplikacija boronskih kiselina nije imala utjecaj na fiziološke procese u rajčicama tj. primjena P(BA) nije štetna za rajčice u rasponu istraženih koncentracija.

Nadalje, uočen je paradoksalan učinak. Preventivna aplikacija (P)BA na rajčice zaražene gljivičnim i bakterioznom patogenom rezultirala je značajnim smanjenjem jačine simptoma bolesti rajčice nakon 14 dana, u odnosu na zaražene rajčice bez (P)BA. Određivanjem jačine simptoma koncentrične i bakteriozne pjegavosti rajčice već pri nižoj koncentraciji PBA (0,05 %) (aplicirana 2 dana prije aplikacije patogena), uočen je značajno veći antimikotički učinak na gljivu *A. alternata* (42 %) i bakteriju *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (55 %) u odnosu na učinak BA aplicirane u 6 puta većoj koncentraciji. Preventivna aplikacija iste koncentracije PBA (aplicirana 7 dana prije aplikacije patogena), značajno je smanjila jačinu simptoma koncentrične pjegavosti rajčice (za 61 %) (Martinko i sur., 2022), te jačinu simptoma bakteriozne pjegavosti (za 71 %) u odnosu na aplikaciju BA u istoj MIC koncentraciji. Dakle, PBA primijenjena u niskoj koncentraciji značajnije smanjuje simptome bolesti (osobito bakteriozne pjegavosti) u odnosu na isti MIC BA kada se duže nalazi na površini lista rajčice (7 dana) prije aplikacije patogena. Premda je povećanje viših koncentracija (P)BA proporcionalno povećanju jačine simptoma bolesti na rajčicama, najviša aplicirana koncentracija obje kiseline ne dovodi do značajne jačine simptoma u usporedbi s onima u kontrolnoj skupini biljaka (prema rezultatima *ImageJ*).

Rezultati dobiveni analizom fizioloških parametara testiranih rajčica (na koje su aplicirane boronske kiseline i patogeni) prate rezultate značajnog smanjenja jačine simptoma bolesti dobivene programom *ImageJ*. Analizom fizioloških parametara nakon 15 dana od postavljanja pokusa, utvrđeno je značajno povećanje vrijednosti svih parametara kod rajčica na koje je aplicirana PBA 7 dana prije aplikacije gljive (28 % CHI, 31 % ARI, 11 % HUE, 11 % NIR) (Martinko i sur., 2022) i bakterije (20 % CHI, 18 % ARI, 13 % HUE, 0,5 % NIR), u odnosu na vrijednosti istih parametara analiziranih kod zaraženih rajčica na koje je aplicirana 6 puta veća koncentracija BA. Usporedbom učinka PBA s BA na fiziološke parametre zaraženih rajčica, uočeno je da PBA ne dovodi do značajnih promjena u vrijednostima parametara u odnosu na fiziološke parametre zaraženih biljaka na koje je aplicirana BA pri aplikaciji provedenoj 2 dana prije aplikacije patogena, dok kod ranije aplikacije (7 dana prije aplikacije patogena), dolazi do značajnog porasta parametara.

Korištenje fenotipizacijske tehnike s multispektralnim fotografijama biljaka daje uvid u fiziološku pozadinu odgovora rajčice na utjecaj patogeneze i aplikacije boronskih kiselina. Analizom određenih parametara (CHI, ARI, HUE, NIR) utvrđena je fiziološka pozadina testiranih biljaka rajčice i utjecaj apliciranih (P)BA. Budući da su antocijanini nefotosintetski pigmenti povezani s otpornošću biljaka na stres uzrokovan napadom patogena (Ustin i sur., 2009), analiziran je sadržaj antocijanina biljaka rajčice korištenih u ovom istraživanju. Poznato je da infekcija biljaka patogenima dovodi do sinteze antocijanina kao kratkotrajnih zaštitnih spojeva u vegetativnom tkivu biljaka (Field i sur., 2001; Wrolstad, 2006; Lev-Yadun i Gould, 2009; Kiferle i sur., 2015; Sivankalyani i sur., 2016) zbog čega se sadržaj antocijanina povećava (Dixon i Paiva 1995; Gould, 2004; de Vries i sur., 2018) kao odgovor na induciranu otpornost biljke. Novija istraživanja dokazuju da infekcija rajčice gljivičnim patogenom *Botrytis cinerea* (Turnbull, 2019), pogotovo virulentnijim sojevima (Meng i sur., 2020) te bakterijskim patogenom *P. syringae* pv. *tomato* (Dadáková i sur., 2020), dovodi do pojačane sinteze antocijanina, što pozitivno utječe na obrambeni odgovor rajčice u patogenezi. Značajno povećanje sadržaja antocijanina u biljkama *Arabidopsis thaliana* nakon infekcije bakterijom *P. syringae* pv. *tomato*, dovelo je do smanjenja simptoma bolesti temeljem rezultata dobivenih kombinacijom multispektralnih i fluorescentnih fotografija u radu Romero-Pérez i sur. (2021). Međutim, nakupljanjem antocijanina oko mjesta infekcije s ciljem apsorpcije viška svjetlosti i sprječavanja razgradnje klorofila (Lu i sur., 2017), smanjuje se učestalost i ozbiljnost fotoinhibicije kao što se i ubrzava fotosintetski oporavak biljke (Feild i sur., 2001; Gould, 2004). Budući da sadržaj antocijanina i klorofila u listovima daju vrijedne informacije o fiziološkom statusu biljaka, postoji potreba za procjenom ovih biokemijskih parametara vegetacije (Gitelson i sur., 2009). Navedeni radovi idu u prilog dobivenim rezultatima ovog istraživanja *in vivo*, koji pokazuju značajno povećanje sadržaja

antocijanina ( $\approx 60\%$ ) i klorofila ( $\approx 50\%$ ) u varijantama gdje je na biljke rajčice aplicirana PBA (0,05 %) zajedno s patogenima *A. alternata* i *P. syringae* pv. *tomato*, u odnosu na kontrolne rajčice (bez PBA i patogena). Povećanje sadržaja antocijanina u navedenoj varijanti upućuje na aktivaciju obrambenog odgovora biljke što potvrđuje proces patogeneze u rajčicama od strane apliciranih uzročnika bolesti. Može se pretpostaviti kako je indukcija prirodnog obrambenog odgovora rajčice doprinijela povećanju sadržaja antocijanina kako bi se umanjila posljedica patogeneze u biljaka inficiranih patogenima i štetan utjecaj na klorofil. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju i činjenicu koju iznose Štambuk i sur. (2021) da je vrijednost pojavnosti boje (HUE), proporcionalna ukupnom klorofilu biljke. Temeljem navedenog, može se postaviti gruba procjena o fotosintezi lista (Štambuk i sur., 2021). Stoga ne čudi da je u varijantama pokusa gdje je na rajčice aplicirana PBA zajedno s patogenima, nakon 15 dana utvrđeno značajno povećanje parametra HUE ( $\approx 20\%$ ), što je proporcionalno povećanju sadržaja klorofila u istim varijantama u odnosu na kontrolne varijante (bez PBA i patogena). U varijantama gdje su na biljke rajčice aplicirane boronske kiseline bez patogena, značajne promjene parametra HUE (pa tako i sadržaja klorofila) nisu zabilježene u usporedbi s vrijednostima istog parametara u kontrolnim biljkama (bez PBA i BA). Rezultati upućuju na pretpostavku da je proces patogeneze potaknuo indukciju prirodnog obrambenog odgovora test biljaka rajčice dovodeći do sinergije fitohormona koji sudjeluju u procesu obrane s folijarno apliciranim spojevima bora što za posljedicu ima ograničavanje patogena u procesu patogeneze i smanjenje fiziološkog oštećenja rajčice od strane patogena. Poznato je da biljke induciraju obrambene odgovore korištenjem čvrsto reguliranih mreža fitohormona (Pye i sur., 2013) među kojima je salicilna kiselina tj. endogena signalna molekula koja igra ključnu ulogu u obrani biljaka od infekcije patogenima (Uppalapati 2007; Pye i sur., 2013; El-Shennawy i Abd El, 2018). O tome svjedoče radovi (Ogawa i sur., 2006; Kim i Hwang, 2014; Hao i sur., 2018; Zhao i sur., 2019; Lefevere, 2020) u kojima se ističe povećanje razine salicilne kiseline nakon infekcije biljke fitopatogenima. Osim u ograničavanju patogeneze, povećanje razine salicilne kiseline ublažava simptome fitotoksičnosti nastale uslijed deficita ili suficita bora, kako ističu Nawaz i sur. (2020). U prilog tome navodi se istraživanje El-Shennawy i Abd El (2018) gdje je kombinacija salicilne kiseline s BA značajno smanjila jačinu simptoma koncentrične pjegavosti rajčice što je dovelo do povećanja sadržaja klorofila u testiranim biljkama. Aplikacijom boronskih kiselina, pretpostavljena sinergija spojeva bora i mreže fitohormona (nastala kao posljedica indukcije obrambenog odgovora rajčice), dovela je do povećanja sadržaja klorofila (CHI), time i parametra pojavnosti boje (HUE), a u nekim varijantama i do povećanja parametra refleksije blizu infracrvenog zračenja ( $\approx 15\%$  NIR). Zanimljivo je da se povećanje parametra NIR odnosi na zdrave biljke (Peñuelas i Filella,

1998; Li i sur., 2014). Na ovaj parametar ne utječe pigment lista već ga određuju optička svojstva lista vezana uz morfologiju lista, debljinu, sadržaj vode te raspršivanje svjetlosti unutar lista. Raspršivanjem svjetlosti unutar lista, svjetlost se lomi na površini stanica koje u zdravom listu nisu dregradirane što vrijednost NIR čini višom. Budući da uslijed napada patogena dolazi do degradacije stanica biljke, svjetlost se unutar lista slabije lomi što rezultira smanjenjem vrijednosti NIR (Merzlyak i sur., 2003). Zanimljivo je kako su fiziološki parametri značajno bili viši kod zaraženih rajčica na koje su aplicirane (P)BA, u odnosu na kontrolne biljke koje nisu sadržavale patogena ali su bile tretirane boronskim kiselinama.

Povećanje lezija na površini listova rajčica tretiranih s (P)BA bez patogena, proporcionalno je povećanju koncentracija apliciranih kiselina no temeljem fenotipizacije, razlog povećanja lezija s rastom koncentracija nije posljedica fitotoksičnosti u varijantama pokusa gdje su rajčice tretirane s (P)BA. Činjenica da različite koncentracije boronskih kiselina dovode do fitotoksičnosti zbog suficita ili deficita bora (Nawaz i sur., 2020), vrijedi ukoliko je bor uspješno usvojen od strane biljke. Folijarna aplikacija bora (najčešće u obliku borne kiseline) može dovesti do pojave ožegotina jer se koncentracija bora povećava isključivo u listovima (Du i sur., 2020; Dinh i sur., 2021). Premda bor u obliku borne kiseline ulazi u biljku pasivnom difuzijom (jer lako prolazi kroz membrane biljnih stanica), transport ovog mikronutrijenta predstavlja problem zbog čega folijarna aplikacija bora nije toliko učinkovita kao aplikacija u korijen (Dinh i sur., 2021). Takva saznanja mogu objasniti značajnu ukupnu površinu lezija i neznčajne fiziološke promjene rajčica tretiranih s (P)BA u odnosu na biljke iz kontrolne skupine (bez PBA i BA). Pretpostavka je kako je folijarna aplikacija boronskih kiselina dovela do otežanog transporta bora kroz biljku što je uzrokovalo pojavu ožegotina na lisnim plojkama zbog zadržavanja bora najviše u listovima. Temeljem istraživanja Dinh i sur. (2021) u kojem se navodi kako folijarna aplikacija bora dovodi do povećanja koncentracije isključivo u listovima (ali ne utječe posljedično na suhu tvar biljke, time niti na fotosintetske procese), za pretpostaviti je kako je to vjerojatan razlog neznčajnih promjena u fiziologiji rajčica tretiranih boronskim kiselinama. Takav slučaj nije uočen u varijantama gdje je na biljke, osim boronskih kiselina, apliciran gljivični tj. bakteriozni patogen. Budući da fitohormoni sudjeluju u transportu bora (Gómez-Soto i sur., 2019), povećanje razine fitohormona kao odgovora na proces patogeneze u biljkama, moglo bi objasniti zašto su biljke rajčice na koje su aplicirane boronske kiseline zajedno s patogenima, pokazale manje simptoma i pozitivan fiziološki odgovor u odnosu na biljke na koje su aplicirane boronske kiseline bez patogena.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Testiranjem antibakterijskog i antimikotičkog učinka različitih koncentracija PBA i BA na odabrane uzročnike bolesti rajčice u uvjetima *in vitro*, potvrđeno je da PBA pri niskoj koncentraciji (0,05 %) potpuno inhibira rast testiranih patogena rajčice, kako fitopatogene gljive *Alternaria alternata*, tako i fitopatogene bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. BA jednak učinak na bakteriju *P. syringae* pv. *tomato* postiže tek kad je primijenjena u 6 puta većoj koncentraciji u odnosu na PBA, dok ista koncentracija BA nije uspjela potpuno zaustaviti rast gljive *A. alternata*.

2. Antibakterijski i antimikotički učinak PBA i BA na jačinu simptoma bolesti rajčice *in vivo*, testiran je u uvjetima plastenika. Utvrđeno je da folijarna aplikacija PBA pri nižim koncentracijama (0,05 %), značajno smanjuje površinu lezija koje su simptomi gljivične koncentrične pjegavosti (42 - 61 %) i bakteriozne pjegavosti rajčice (55 - 71 %), u usporedbi s BA primijenjenom u 6 puta većoj koncentraciji.

3. Uz mjerenje površine lezija određivan je i učinak na četiri fiziološke značajke testnih biljaka rajčice na koje je je aplicirana BA i PBA. Aplikacija BA i PBA u koncentracijama 0,15-0,9 % i 0,025-0,03 % nije uzrokovala značajne promjene mjerenih parametara rajčica. Za razliku od toga, u biljkama zaraženim gljivom *A. alternata* detektirane su značajne i specifične promjene u vrijednostima mjerenih fizioloških parametara. Predtretmanom s BA i PBA inokuliranih biljaka, u njima nisu uočene navedene promjene, iz čega proizlazi da BA i PBA imaju profilaktičko djelovanje u odnosu na zarazu tom gljivom.

4. Rezultati pokusa *in vivo* dodatno proširuju raspon koncentracija PBA koje se mogu sigurno primijeniti na rajčicu jer nisu pokazale negativan fiziološki učinak na zrelim biljkama. Može se zaključiti da se BA kao i PBA mogu razmatrati kao sredstva za suzbijanje gljivične koncentrične pjegavosti te bakteriozne pjegavosti rajčice. Dobiveni rezultati daju orijentaciju kako primijeniti PBA u učinkovitim dozama koje u dovoljnoj mjeri suprimiraju koncentričnu i bakterioznu pjegavost rajčice, a nemaju značajan učinak na biljku, pri čemu su posebno zanimljive niske koncentracije PBA (0,05 %).

5. Usporedbom antimikrobnog učinka boronskih kiselina u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, ustanovljen je, pri njihovoj primjeni u niskim koncentracijama, značajan učinak i PBA i BA na testirane patogene, pri čemu je PBA bila učinkovita pri nižim koncentracijama u usporedbi s BA.

6. Istraživanjem antibakterijskog učinka PBA i BA na populaciju bakterije *E. coli* na plodovima rajčice, dokazano je da ispiranje bakterijama kontaminiranih plodova rajčice s nižim koncentracijama PBA (0,05 %), značajno smanjuje populaciju bakterije *E. coli* (uz 120-minutno izlaganje dovodi do inhibicije rasta od 89 %, a bez produljenog izlaganja 72 %) s

plodova rajčice, dok je za postizanje istog efekta bila potrebna primjena BA u 6 puta većoj koncentraciji. 120-minutno izlaganje bakterije *E. coli* moglo bi proširiti mogućnost primjene PBA u pripremi rajčice za konzumaciju u svježem stanju u prehrambenoj industriji. Evidentno je da PBA ima pozitivne karakteristike potencijalnog dekontaminacijskog sredstva kada je primijenjena u učinkovitim koncentracijama koje u dovoljnoj mjeri inhibiraju bakteriju *E. coli*, a nemaju negativan učinak na vidljiva svojstva ploda niti na konzumente.

7. Temeljem navedenog, ova disertacija je prvo istraživanje baktericidnog i fungicidnog učinka PBA na uzročnike bolesti zeljastih domaćinskih biljaka uz usporedbu s rezultatima učinka medicinski značajne BA.

8. Ostvarenim ciljevima i potvrdom postavljenih hipoteza, postignut je preduvjet za nastavak istraživanja PBA kao potencijalnog sredstva za suzbijanje ekonomski značajne fitopatogene bakterije i gljive u uzgoju rajčice, ali i za razmatranje PBA kao potencijalnog dekontaminanta svježih plodova rajčice od patogene bakterije *E. coli*. S obzirom na sužavanje izbora dostupnih sredstava za suzbijanje biljnih patogena (ograničavanje upotrebe bakrovih derivata i sl.) i razvitak rezistentnosti fitopatogenih gljiva i bakterija, u nastavku istraživanja ovih ekološki prihvatljivih spojeva koji imaju visoku učinkovitost u niskim koncentracijama, bilo bi značajno proučiti mogućnosti kurativnog učinka PBA i BA na različite uzročnike biljnih bolesti, kao i opcije njihovog formuliranja i aplikacije na biljke.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Abdulkhair W. M. i Alghuthaymi M. A. (2016). Plant Pathogens, Plant Growth, Everlon Cid Rigobelo, IntechOpen, DOI: 10.5772/6532. preuzeto s: <https://www.intechopen.com/chapters/52387>; 23.03.2021.
2. Adamczyk-Woźniak A., Komarowska-Porokhnyavets O., Misterkiewicz B., Novikov V.P., Sporyński A. (2012). Biological activity of selected boronic acids and their derivatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 26(7), 390–393. DOI:10.1002/aoc.2880
3. Allen, A.H. i Tankard, A.R. (1904). The determination of boric acid in cider, fruits, etc. *Analyst*, 29, 301-304. DOI: 10.1039/AN9042900301
4. Ali S.E., Gamil A.A.A., Skaar I., Evensen O., Charo-Karisa H. (2019). Efficacy and safety of boric acid as a preventive treatment against *Saprolegnia infection* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Scientific Reports*, 9(1): 18013. DOI: 10.1038/s41598-019-54534-y
5. Alstat G.E. (1944). Tomato diseases in Texas. *Plant Disease Reporter*, 28: 530.
6. Alubaidy G. F. A. A., Basheer S. M., Saied. (2007). Effects of Gentian Violet and Boric Acid on Growth of The Fungi: *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* and *P. expansum*; *Rafidain Journal of Science*, 18 (5): 1-5 DOI: 10.33899/rjs.2007.42374
7. Armitage A. D. (2013). *Alternaria alternata* leaf spot pathogens : genetics, evolutionary history and diagnostics. PhD thesis, University of Warwick. preuzeto s: <http://wrap.warwick.ac.uk/62072/> ; 12.04.2021.
8. Arsenijević M. (1986). Bakterioze biljaka, Naučna knjiga, Beograd.
9. Avenot H. F. i Michailides T. J. (2007). Resistance to Boscalid Fungicide in *Alternaria alternata* Isolates from Pistachio in California. *Plant Disease*, 91(10), 1345–1350. DOI:10.1094/pdis-91-10-1345
10. Avenot H., Morgan D. P., Michailides T. J. (2007). Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine (pyraclostrobin + boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing *Alternaria* late blight of pistachios in California. *Plant Pathology*, 57(1), 135–140.
11. Barquero J.F. (2013). "Boronic Acids as Penicillinase Inhibitors". CUNY AcademicWorks. preuzeto s: [https://academicworks.cuny.edu/gc\\_etds/1798/](https://academicworks.cuny.edu/gc_etds/1798/); 27.06.2021.
12. Bassil E., Hu H., Brown P.H. (2004). Use of Phenylboronic Acids to Investigate Boron Function in Plants. Possible Role of Boron in Transvacuolar Cytoplasmic Strands and

- Cell-to-Wall Adhesion, Pomology Department, University of California, Davis, California  
136(2):3383-95; 195616; DOI: 10.1104/pp.104.040527
13. Basu P. K. (1966). Conditions for symptomological differentiation of bacterial canker, spot and speck on tomato seedlings . Canadian Journal of Plant Science, 46 : 525-530. DOI: 10.4141/cjps66-088
  14. Bellés J. M., Garro R., Fayos J., Navarro P., J. Primo, Conejero V. (1999). Gentisic Acid As a Pathogen-Inducible Signal, Additional to Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions, 12(3), 227–235. DOI:10.1094/mpmi.1999.12.3.227
  15. Brown, J. C. i Ambler, J. E. (1973). Genetic Control of Uptake and a Role of Boron in Tomato1. Soil Science Society of America Journal, 37(1), 63–. DOI:10.2136/sssaj1973.0361599500370001002
  16. Brown, J. C. (1979). Effects of Boron Stress on copper enzyme activity in tomato. Journal of Plant Nutrition, 1(1), 39–53. DOI:10.1080/01904167909362698
  17. Bessadat N., Berruyer R., Hamon B., Bataille-Simoneau N., Benichou S., Kihal M., Simoneau P. (2016). *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. European Journal of Plant Pathology, 148(1), 181–197. DOI:10.1007/s10658-016-1081-9
  18. Bhalerao J. B, Chavan R. A., Balu Dharbale B., Kendre A. H., Mete V. S. (2019). Study on *in-vitro* efficacy of botanicals and chemicals against *Alternaria solani* associated with post-harvest rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). J. Pharmacogn Phytochem ;8(5):2045-2049. preuzeto s: <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue5/PartAL/8-5-452-927.pdf>; 09.04.2020.
  19. Bonnen A. M. i Hammerschmidt R. (1989). Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 35(6), 463–474. DOI:10.1016/0885-5765(89)90088-x
  20. Bower C. K. i Daeschel M. A. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. Int. J. Food Microbiol. Sep 15;50(1-2): 33-44. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00075-6.
  21. Bradke T. M., Hall C., Carper S.W., Plopper G.E. (2008). Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. Cell Adhes Migr 2:153–160. DOI: 10.4161/cam.2.3.6484
  22. Brotherton R.J., Weber C.J., Gulbert C.R., Little J.L. (1985). Boron Compounds. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Fifth Ed., Vol. A4. str. 309-330. preuzeto



- s: <https://dokumen.tips/download/link/ullmanns-encyclopedia-of-industrial-chemistry-boron-compounds>; 06.04.2021.
23. Bryan M.K. (1933). Bacterial speck of tomatoes. *Phytopathology*, 23: str. 897-904.
  24. Cai R., Lewis J., Yan S., Liu H., Clarke C.R., Campanile F., Vinatzer, B. A. (2011). The Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Is Genetically Monomorphic and under Strong Selection to Evade Tomato Immunity. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002130. DOI:10.1371/journal.ppat.1002130
  25. Caroline P., Campbell R. (1990). Strategies of microbial cell survival in contact lens cases. *Contact Lens Forum* 15:27–36.
  26. Chaerani, R. i Voorrips, R. E. (2006). Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6), 335–347. DOI:10.1007/s10327-006-0299-3
  27. Clake P.H. i Slater J.H. (1986). Evolution of enzyme structure and function in *Pseudomonas*. In *The Bacteria - A Treatise on Structure and Function*. Vol. X. The Biology of *Pseudomonas*. Ed. J.R. Sokatch. Academic Press.
  28. Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, 23rd Edition, Washington
  29. Conlin K. C. (1983). Effectiveness of Selected Chemicals in Inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *in vitro* and in Controlling Bacterial Speck *Plant Dis.* 67 , str. 639 — 644
  30. Cooper L., Dean A.C.R., Hinshelwood C. (1968). Factors Affecting the Growth of Bacterial Colonies on Agar Plates; *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* Vol. 171, No. 1023, str. 175-199. DOI: 10.1098/rspb.1968.0063
  31. Dadáková K., Heinrichová T., Lochman J., Kašparovský T. (2020). Production of Defense Phenolics in Tomato Leaves of Different Age. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(21), 4952. DOI: 10.3390/molecules25214952
  32. De Seta F., Schmidt M., Vu B., Essmann M., Larsen, B. (2009). Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida vaginitis*. *J Antimicrob Chemother*, 63(2), 325–336. DOI:10.1093/jac/dkn486
  33. de Vries S., von Dahlen J.K., Schnake A., Ginschel S., Schulz B., Rose L.E. (2018). Broad-spectrum inhibition of *Phytophthora infestans* by fungal endophytes. *FEMS Microbiol Ecol* 94:fiy37. DOI: 10.1093/femsec/fly037
  34. Devash Y., Okon Y., Henis Y. (1980). Survival of *Pseudomonas tomato* in soil and seeds. *Phytopath Z.* 99:175-185. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1980.tb03777.x

35. Dinh A.Q., Naeem A., Sagervanishi A., Mühling K.H. (2021). One-Time Foliar Application and Continuous Resupply via Roots Equally Improved the Growth and Physiological Response of B-Deficient Oilseed Rape. *Plants*, 10(5):866. DOI: 10.3390/plants10050866
36. Dixon R.A. i Paiva N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085. DOI: org/10.1105/tpc.7.7.1085
37. Du W., Zhi-Yong. P., Hussain S.B, Zhong-Xing H., Shu-Ang P.,Yong-Zhong L. (2020). Foliar Supplied Boron Can Be Transported to Roots as a Boron-Sucrose Complex via Phloem in Citrus Trees. *Frontiers in Plant Science*, 11(), 250 DOI:10.3389/fpls.2020.00250
38. El Gobashy S.F., Mikhail W.Z.A., Ismail A.M. i sur. (2018). Phylogenetic, toxigenic and virulence profiles of *Alternaria* species causing leaf blight of tomato in Egypt. *Mycol Progress* 17, 1269–1282 DOI: 10.1007/s11557-018-1442-1
39. El-Gazzar, N. i Ismail A. M. (2020). The potential use of Titanium, Silver and Selenium nanoparticles in controlling leaf blight of tomato caused by *Alternaria alternata*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101708. DOI:10.1016/j.bcab.2020.101708
40. Elias M., Mühlen G.S., McKey D., Roa, A.C., Tohme J. (2004). Genetic Diversity of Traditional South American Landraces of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): An Analysis Using Microsatellites. *Economic Botany*, 58(2), 242–256. preuzeto s: [https://www.jstor.org/stable/4256811?seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/4256811?seq=1#metadata_info_tab_contents) 10.05.2021.
41. El-Shennawy M.Z. i Abd El A.M. (2018). Evaluation of Some Antioxidants against Tomato Early Blight Disease All Agricultural Botany Department, Faculty of Agriculture, Menoufiya University, Egypt Vol. 63, No.3, str. 157-164. preuzeto s [https://alexja.journals.ekb.eg/article\\_81831\\_25c37f21d6b2adc1640330edd2083fdc.pdf](https://alexja.journals.ekb.eg/article_81831_25c37f21d6b2adc1640330edd2083fdc.pdf) 11.02.2021.
42. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology; Infectious Diseases (ESCMID) (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. , 9(8), 0–0. DOI:10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x
43. Fallik E., Bashan Y., Okon Y., Cahaner Ta., Kedar N. (1983). Inheritance And Sources Of Resistance To Bacterial Speck Of Tomato Caused By *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *Ann. Appl. Bid.*, 102, str. 365-371. preuzeto s: <http://bashanfoundation.org/publications/inheritance.pdf> 10.05.2021.

44. Field T. S., Lee D. W., Holbrook N. M. (2001). Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of redosier dogwood. *Plant Physiol.* 127, str. 566–574. DOI: 10.1104/pp.010063
45. Fitosanitarni informacijski sustav, FIS (2022). preuzeto s <https://fis.mps.hr/trazilicaszb/> 10.01.2022.
46. Food and Agriculture Organization - Faostat. Production quantities by country. Rome: FAOSTAT (2017). preuzeto s <https://www.fao.org/faostat/en/#home>; 14.06.2020.
47. Freeman A., Village Y., Segal R., Dror Y. (2010). Methods and compositions for treating fungal infections, Pub. No.: US 2004/022014.6 A1. preuzeto s <https://patentimages.storage.googleapis.com/02/6b/2f/a0a7dd363f4ba6/US20040220146A1.pdf>; 23.06.2020.
48. Gitelson A. A., Gritz Y., Merzlyak M. N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Physiol.* 160, 271–282. DOI: 10.1078/0176-1617-00887.
49. Gitelson A. A., Merzlyak M. N., Chivkunova O. B. (2001). Optical Properties and Non-destructive Estimation of Anthocyanin Content in Plant Leaves. *Photochem. Photobiol.* 74, 38–45. DOI: 10.1562/0031-8655(2001)074<0038:opane0>2.0.co;2.
50. Gitelson A. A., Chivkunova O. B., Merzlyak M. N. (2009). Nondestructive estimation of anthocyanins and chlorophylls in anthocyanic leaves. *American Journal of Botany*, 96(10), 1861–1868. DOI:10.3732/ajb.0800395
51. Gómez-Soto D., Galván S., Rosales E., Bienert P., Abreu I., Bonilla I. Bolaños L., Reguera M. (2019). Insights into the role of phytohormones regulating pAtNIP5;1 activity and boron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 287(), 110198– DOI:10.1016/j.plantsci.2019.110198
52. González-Bello C. (2017). Antibiotic Adjuvants – A Strategy to Unlock Bacterial Resistance to Antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (), S0960894X17308284–. DOI:10.1016/j.bmcl.2017.08.027
53. Goode M. J. i Sasser M. (1980). Prevention–The key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Dis.* 64:831-834 DOI: 10.1094/PD-64-831
54. Gormez A., Sahin F., Gulluce M., Aslan I. (2013). Identification And Characterization Of *Pseudomonas Syringae* Isolated From Apricot Trees In The Erzurum Province Of Turkey And Evaluation Of Cultivar Reaction *Journal of Plant Pathology* Vol. 95, No. 3, str. 525-532. DOI: 10.4454/JPP.V95I3.016

55. Gould K.S. (2004). Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (5), str. 314–320. DOI:10.1155/s1110724304406147
56. Grogan R. G., Kimble K. A., Schneider R. W., Ioannou N. (1974) Investigations of fungal and bacteria diseases of processing tomatoes. Progress report for Processing Tomato Advisory 155. Board. Department of Plant Pathology, University of California, Davis, California, USA.
57. Grover R.K. i Moore J.D. (1962). Toximetric studies of fungicides against brown rot organism *Sclerotinia fruticola*. *Phytopathology*;52: str. 876–879
58. Gu G., Hu J., Cevallos-Cevallos J.M., Richardson S.M., Bartz J.A., van Bruggen A.H.C. (2011). Internal colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in tomato plants. *PLoS ONE* 6(11):e27340. DOI:10.1371/journal.pone.0027340
59. Gu L., Bai Z., Jin B., Hu Q., Wang H., Zhuang G., Zhang H. (2010). Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere. *J. Environ. Sci.*, 22, str. 134–141
60. Guilbaud C., Morris C.E., Barakat M., Ortet P., Berge O. (2015). Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(1), fiv146. DOI:10.1093/femsec/fiv146
61. Gullino M.L., Gilardi G., Sanna M. i sur. (2009). Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato. *Phytoparasitica* 37, 461. DOI: 0.1007/s12600-009-0055-2
62. Guo X., Chen J.R., Brackett R.E., Beuchat L.R. (2001). Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Appl Environ Microbiol* 67:4760–4764
63. Gupta D., Madramootoo C.A. (2017). Fate and Transport of *Escherichia coli* in Tomato Production. *Expo Health* 9, 13–25. DOI: 10.1007/s12403-016-0217-7
64. Guzmán C., Bagga M., Kaur A., Westermarck J., Abankwa D. (2014). ColonyArea: An *ImageJ* Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. *PLoS ONE*, 9(3), e92444. DOI:10.1371/journal.pone.0092444
65. Haccius B. i Garrecht M. D. (1963). Phenylborsäure induzierte "Lanzettblüttrigkeit" bei *Solanum lycopersicum*. *Naturwissenschaften*; 50:133-4; DOI.org/10.1007/BF00600631
66. Hall D. G. (2011). Boronic Acids (Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials) || Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. 1–133. DOI:10.1002/9783527639328.ch1

67. Hao Q., Wang W., Han X., Wu J., Lyu B., Chen F. i sur. (2018). Isochorismate-based salicylic acid biosynthesis confers basal resistance to *Fusarium graminearum* in barley. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1995–2010. DOI: 10.1111/mpp.12675
68. Housh A. B, Matthes M. S., Gerheart A., Wilder S. L., Kil K.E., Schueller M., Guthrie J.M., McSteen P., Ferrieri R. (2019). Assessment of a 18F-Phenylboronic Acid Radiotracer for Imaging Boron in Maize. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(3), 976. DOI: 10.3390/ijms21030976
69. Huang L.L., Jin Y.J., Zhao D. i sur. (2014). A fast and biocompatible living virus labeling method based on sialic acid-phenylboronic acid recognition system. *Anal Bioanal Chem* 406, 2687–2693. DOI: 10.1007/s00216-014-7651-9
70. Hufnagel D. A., Depas W. H., Chapman M. R. (2015). The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiology spectrum*, 3(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014
71. Hussein G. S. (2019). The Use Of Pcr To Detect *Alternaria Alternata* Fungi Which Isolated From Tomato Fruit, *Biochem. Cell. Arch.* Vol. 19, No. 2, pp. 4203-4206. DOI : 10.35124/bca.2019.19.2.4203
72. Ibekwe A. M., Watt P. M., Shouse P. J., Grieve C. M. (2004). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in irrigation water on soils and plants as validated by culture method and real-time PCR. *Can J Microbiol.*;50(12):1007-1014. DOI:10.1139/w04-097
73. IBM Corp. (2020). *IBM SPSS Statistics for Windows*, Armonk, NY: IBM Corp. preuzeto s: <https://hadoop.apache.org/> ; 11.03.2020.
74. Jacobs R. T., Plattner J. J., Nare B., Wring S. A., Chen D., Freund Y., Gaukel E. G., Orr M D., Perales J. B., Jenks M. i sur. (2011). Benzoxaboroles: A new class of potential drugs for human African trypanosomiasis. *Future Med. Chem.* 2011;3:1259–1278. DOI: 10.4155/fmc.11.80.
75. Jeanson S., Flourey J., Gagnaire V., Lortal S., Thierry A. (2015). Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Frontiers in Microbiology*, 6(), –. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01284
76. Kiferle C., Fantini E., Bassolino L., Povero G., Spelt C., Buti S., Gonzali, S. i sur. (2015). Tomato R2R3-MYB Proteins SIAN1 and SIAN2: Same Protein Activity, Different Roles. *PLOS ONE*, 10(8), e0136365. DOI:10.1371/journal.pone.0136365
77. Kim D. S. i Hwang B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *J. Exp. Bot.* 65, 2295–2306. DOI: 10. 1093/jxb/eru109
78. Knapp S., Peralta I.E. (2016). The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. In: Causse M., Giovannoni J., Bouzayen M., Zouine M.

- (eds) The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI:10.1007/978-3-662-53389-5\_2
79. Kohno J., Kawahata T., Otake T., Morimoto M., Mori H., Ueba N., Nishio M., Kinumaki A., Komatsubara S., Kawashima K. (1996). Boromycin, an anti-HIV antibiotic. *Biosci Biotechnol Biochem*, 60(6), 1036-7. DOI: 10.1271/bbb.60.1036. PMID: 8695905.
  80. Kumar A., Kumar V., Gull A., Nayik G.A. (2020). Tomato (*Solanum Lycopersicon*). In: Nayik G.A., Gull A. (eds) *Antioxidants in Vegetables and Nuts - Properties and Health Benefits*. Springer, Singapore. DOI:10.1007/978-981-15-7470-2\_10
  81. La Torre A., Iovino V., Caradonia F. (2018). Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 57, no. 2, str. 201-236, DOI: org/10.14601/Phytopathol\_Mediterr-23407
  82. Laflamme B., Middleton M., Lo T., Desveaux D., Guttman, D. S. (2016). Image-based quantification of plant immunity and disease. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29, 919–924. DOI: 10.1094/MPMI-07-16-0129-TA
  83. Lanna Filho R., de Souza R. M., Ferreira A., Quecine M. C., Alves E., de Azevedo J.L. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. *Australasian Plant Pathol.* 42, 643–651. DOI: 10.1007/s13313-013-0233-z
  84. Lee E., Li X., Oh J., Kwon N., Kim G., Kim D., Yoon J. (2020). A boronic acid-functionalized phthalocyanine with an aggregation-enhanced photodynamic effect for combating antibiotic-resistant bacteria. *Chemical Science*. DOI:10.1039/d0sc01351j
  85. Lefevre H., Bauters L., Gheysen G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. DOI:10.3389/fpls.2020.00338
  86. Li X.L., Ma Z.H., Zhao L.L., Li J.H., Wang H.G. (2014). Application of near infrared spectroscopy to qualitative identification and quantitative determination of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici and *P. recondita* f. sp. tritici. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.*;34(3):643-7. Chinese. PMID: 25208382. preuzeto s: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25208382/> (01.06.2021.)
  87. Li Y., Yang D., Cui J. (2017). Graphene oxide loaded with copper oxide nanoparticles as an antibacterial agent against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *RSC Advances*, 7(62), 38853–38860. DOI: 10.1039/C7RA05520J
  88. Liu X., Laks P. E., Pruner M. S. (1994). A preliminary report on the wood preservative properties of phenylboronic acid. *Forest Products Journal*, 44(6), 46- 48

89. Lopalco A., Lopodota A. A., Laquintana V., Denora N., Valentino J. (2020). Boric Acid, a Lewis Acid with Unique and Unusual Properties: Formulation Implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (), S0022354920302082– DOI:10.1016/j.xphs.2020.04.015
90. Louws F.J., Wilson M., Campbell H.L., Cuppels D.A., Jones J.B., Shoemaker P.B., Sahin F., Miller S.A. 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. in plants. Klumer, Dordrecht, the Netherlands. Hatcher, P.E., N.D. Paul, P.G. *Plant Dis.* 85:481–488. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.5.481
91. López-Gresa M. P., Maltese F., Bellés J. M., Conejero V., Kim H. K., Choi Y. H., Verpoorte R. (2010). Metabolic response of tomato leaves upon different plant–pathogen interactions. , 21(1), 89–94. DOI:10.1002/pca.1179
92. López-Gresa M. P., Torres C., Campos L., Lisón P., Rodrigo I., Bellés J.M., Conejero V. (2011). Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. , 74(0), 216–228. DOI:10.1016/j.envexpbot.2011.06.003
93. Lu Y., Chen Q., Bu Y., Luo R., Hao S., Zhang J., Tian J., Yao Y. (2017). Flavonoid Accumulation Plays an Important Role in the Rust Resistance of Malus Plant Leaves. *Frontiers in Plant Science*, 8(), 1286–. DOI:10.3389/fpls.2017.01286
94. Ma Z., Felts D., Michailides T. J. (2003). Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(2), 66–74. DOI:10.1016/j.pestbp.2003.08.002
95. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(6), 614–629. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
96. Marasović M., Ivanković S., Stojković R., Đermić D., Galić B., Miloš M. (2017). *In vitro* and *in vivo* antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32:1299– 1304. DOI:10.1080/14756366.2017.1384823
97. Martinko K., Tolvajčić P., Đermić E., Đermić D. Determination of minimum inhibitory concentration of boric acid on phytopathogenic bacterium *Pseudomonas tomato*. In: Rozman V., Antunović Z., editors. *Proceedings of 56th Croatian and 16th International Symposium on Agriculture; 2021 Sep 5-10; Vodice, Croatia.* Osijek: VIN Grafika; 2021. p. 393-397.
98. Martinko K., Ivanković S., Lazarević B., Đermić E., Đermić D. Control of Early Blight Fungus (*Alternaria alternata*) in Tomato by Boric and Phenylboronic Acid. *Antibiotics* 2022, 11, 320. DOI: 10.3390/antibiotics11030320

99. Martins P.M.M., Merfa M.V., Takita M.A, De Souza A.A. (2018). Persistence in Phytopathogenic Bacteria: Do We Know Enough? *Front Microbiol.* 9. DOI :10.3389/fmicb.2018.01099
100. Maškova Z., Tančinova D., Barborakova Z., Felšociova S., Cisarova M. (2012). Comparison of occurrence and toxinogenicity of *Alternaria* spp. isolated from samples of conventional and new crossbred wheat of Slovak region. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(4):552-562. preuzeto s <https://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2012/01/Maskova.pdf>; 05.12.2020.
101. Mathan D. S. (1965). Phenylboric acid, a chemical agent simulating the effect of the lanceolate gene in the tomato. *American Journal of Botany*, 52(2), str. 185–192. DOI:10.1002/j.1537-2197.1965.tb06774.x
102. Matsumoto A., Sato N., Miyahara Y. (2009). Label free carbohydrate detection by using phenylboronic acid gate-modified field effect transistor Vol. 9 (4) e214-e217,ISSN 1567-1739, DOI: 10.1016/j.cap.2009.06.012
103. Matthes M. i Torres-Ruiz R.A. (2017). Boronic Acids as Tools to Study (Plant) Developmental Processes?, *Plant Signaling & Behavior*, DOI: 10.1080/15592324.2017.1321190
104. Matthes M. S., Janlo M. R. i McSteen P.(2020). From element to development: the power of the essential micronutrient boron to shape morphological processes in plants, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 71, No. 5, 1681–1693. DOI:10.1093/jxb/eraa042REVIEW PAPER
105. McGay M. (2019) History of Rutgers tomato, which dates back to 1920s. *The Daily Targum*. preuzeto s: <https://dailytargum.com/article/2019/05/history-of-rutgers-tomato-which-dates-back-to-1920s> ; 10.02.2022.
106. Mears P.J., Koirala S., Rao C.V. Golding I., Chemla Y.R. (2014). *Escherichia coli* swimming is robust against variations in flagellar number. *eLife*, 3, e01916. DOI:10.7554/eLife.01916
107. Meena M., Zehra A., Dubey M.K., Aamir M., Gupta V.K., Upadhyay R.S. (2016). Comparative Evaluation of Biochemical Changes in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Infected by *Alternaria alternata* and Its Toxic Metabolites (TeA, AOH, and AME). *Frontiers in Plant Science*, 7. DOI:10.3389/fpls.2016.01408
108. Meier U. (2001). Growth stages of mono and dycotyledonous plant, BBCH Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. Monograph, 2. Edition. preuzeto s [https://www.politicheagricole.it/flex/AppData/WebLive/Agrometeo/MIEPFY800/BBCH\\_engl2001.pdf](https://www.politicheagricole.it/flex/AppData/WebLive/Agrometeo/MIEPFY800/BBCH_engl2001.pdf);19.09.2020.



109. Meng L., Mestdagh H., Ameye M., Audenaert K., Höfte M., Van Labeke M.C. (2020). Phenotypic variation of *Botrytis cinerea* isolates is influenced by spectral light quality. *Front. Plant Sci.* 11:1233. DOI: 10.3389/fpls.2020.01233
110. Merzlyak M.N., Gitelson A.A., Chivkunova O.B. i sur. (2003). Application of Reflectance Spectroscopy for Analysis of Higher Plant Pigments. *Russian Journal of Plant Physiology* 50, 704–710. DOI: 10.1023/A:1025608728405
111. Milborrow B. V. (1964). 2,6-Dichlorobenzonitrile and Boron Deficiency, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 15 (3) 515–524, DOI: 10.1093/jxb/15.3.515
112. Michaelis A. i Becker B. (1880). About monophenylboron chloride and the valence of boron. *Ber Dtsch Chem Ges (Eur J Inorg Chem)*, 13(1), 58-61. (in German) DOI: 10.1002/cber. 18800130118
113. Mitchell J.K. (1997). Fun Microbiology: Using a Plant Pathogenic Fungus to Demonstrate Koch's Postulates. *The American Biology Teacher*, 59(9), str. 574–577. DOI:10.2307/4450385
114. Moghaddam G. A., Rezayatmand Z., Nasr Esfahani M., Khozaei M. (2019). Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, *Alternaria alternata*. *Plant Physiology and Biochemistry*. DOI:10.1016/j.plaphy.2019.08.011
115. Mohan S.K., Schaad N.W. (1985). Semiselective agar media for isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic to beans (Abstr.) *Phytopathology* 75 :1351. preuzeto s: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n10\\_1390.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n10_1390.PDF) ; 03.03.2021.
116. Moyano L., Lopéz-Fernández M. P., Carrau A., Nannini J.M., Petrocelli S., Orellano E. G., Maldonado S. (2019). Red light delays programmed cell death in non-host interaction between *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and tobacco plants. *Plant Science*, 110361. DOI:10.1016/j.plantsci.2019.110361
117. Mulcahy G. (1993). The characterization of *Pseudomonas* species from a commercial bioaugmentation product. School of Biological Sciences Dublin City University. preuzeto s [https://doras.dcu.ie/19099/1/Geraldine\\_Mulcahy\\_20130620113053.pdf](https://doras.dcu.ie/19099/1/Geraldine_Mulcahy_20130620113053.pdf); 10.06.2021.
118. Nagrale D. T., Gaikwad A. P, Sharma L. (2013). Morphological and cultural characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keisslerblight of gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex J.D. Hook), *Journal of Applied and Natural Science* 5 (1): 171-178. DOI: 10.31018/jans.v5i1.302
119. Ratmahzai N., Zaitoun A.A., Madkour M.H., Ahmady A.E., Hazim Z., Mousa M.A.A. (2016). Morphological, pathogenic, cultural and physiological variability of the isolates

- of *Alternaria solani* causing early blight of tomato. Int. J. Of adv. Res. 4 (nov). 808-817. ISSN: 2320-5407. DOI: 10.21474/IJAR01/2151
120. Nashwa S.M.A. i Abo-Elyousr K.A.M. (2012). Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomatoplants under greenhouse and field conditions. Plant Protect. Sci., 48: 74-79. DOI: 10.17221/14/2011-PPS
  121. Nawaz M., Ishaq S., Ishaq H., Khan N., Iqbal N., Ali S., Rizwan M., Alsahli A. A., Alyemeni M. N. (2020). Salicylic Acid Improves Boron Toxicity Tolerance by Modulating the Physio-Biochemical Characteristics of Maize (*Zea mays* L.) at an Early Growth Stage. Agronomy.10(12):2013. DOI: 10.3390/agronomy10122013
  122. Neales T.F. (1967). The boron nutrition of the diatom, *Cylindrothoea fusiformis*, grown on agar, and the biological activity of some substituted phenylboronic acids. Australian Journal of Biological Sciences 20(1) 67 – 76. DOI: 10.1071/BI9670067
  123. Nguyen C. i Carlin F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit Rev Food Sci Nutr 34(4):371–401. DOI: 10.1080/10408399409527668
  124. Odhnoff C. (1961). Boron Deficiency and Growth. Physiol. Plant. io, 984. The Influence of Boric Acid and Phenyl Boric Acid on the Growth of Bean (*Phaseolus vulgaris*). Physiol Plant 14: 187–220. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1961.tb08152.x
  125. Ogawa D., Nakajima N., Seo S., Mitsuahara I., Kamada H., Ohashi, Y.J.P.B. (2006). The phenylalanine pathway is the main route of salicylic acid biosynthesis in Tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. Plant Biotechnol. 23, 395–398.
  126. Okabe N. (1933). Bacterial leaf spot of tomato. Journal of the Society of Tropical Agriculture, Taiwan 5: 26-36.
  127. Ölmez H. i Kretzschmar U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. LWT - Food Science and Technology, 42(3), 686–693. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.08.001
  128. Palanti S., Feci E., Predieri G., Vignali F. (2012). A wood treatment based on siloxanes and boric acid against fungal decay and coleopter *Hylotrupes bajulus*. International Biodeterioration & Biodegradation, 75, 49–54. DOI:10.1016/j.ibiod.2012.07.019
  129. Palleroni N.J. (1986). Taxonomy of *Pseudomonas*. In The Bacteria - A Treatise on Structure and Function. Vol. X. The Biology of *Pseudomonas*. Ed. J.R. Sokatch. Academic Press. ISBN-13 : 978-0124125087. DOI: 10.1007/BF00873084
  130. Parkunan V., Li S., Fonsah E. G., Ji P. (2013). First Report of *Alternaria* Leaf Spot of Banana Caused by *Alternaria alternata* in the United States. Plant Dis.; 97(8):1116. PMID: 30722507. DOI: 10.1094/PDIS-01-13-0007-PDN.

131. Patel N.A. i sur. (2005). Efficacy of chemicals in controlling fruit rot of tomato caused by *Alternaria tomato*. Indian J. Agric. Res., 39 (1) : 72 - 75. preuzeto s: <http://arccarticles.s3.amazonaws.com/webArticle/articles/ijar2391014.pdf>; 10.06.2021.
132. Patyka V., Buletsa N., Pasichnyk L., Zhitkevich N., Kalinichenko A., Gnatiuk T., Butsenko L. (2016). Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria. Ecol. Chem. Eng. S 2016, 23, 311–331. DOI: 10.1515/eces-2016-0022
133. Pavón M.Á., González I., Pegels N., Martín R., García T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. Food Control, 21(12), 1745–1756. DOI:10.1016/j.foodcont.2010.08.004
134. Peñuelas J. i Filella I., (1998). Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status, Trends in Plant Science, 3:151–156. DOI: 10.1016/S1360-1385(98)01213-8
135. Peppoloni S., Pericolini E., Colombari B., Pinetti D., Cermelli C., Fini F., Blasi E. (2020). The  $\beta$ -Lactamase Inhibitor Boronic Acid Derivative SM23 as a New Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. Frontiers in Microbiology, 11. DOI:10.3389/fmicb.2020.00035.
136. Pianietti A., Sabatini L., Bruscolini F., Chiaverini F., Cecchetti G. (2004). Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. Epidemiol. Infect. 132(2):231–238 DOI:10.1017/s095026880300181x
137. Plank L.D., Harvey J.D. (1979). Generation time statistics of *Escherichia coli* B measured by synchronous culture techniques. J. Gen. Microbiol.115(1):69-77 PMID: 393798. DOI: 10.1099/00221287-115-1-69.
138. Praeger U., Herppich W.B., Hassenberg K. (2018). Aqueous chlorine dioxide treatment of horticultural produce: Effects on microbial safety and produce quality—a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58(2), 318–333. DOI:10.1080/10408398.2016.1169157.
139. Preston G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular Plant Pathology, 1(5), 263–275. DOI:10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x
140. Pye M.F., Hakuno F., MacDonald J. D., Bostock R. M. (2013). Induced resistance in tomato by SAR activators during predisposing salinity stress. Frontiers in Plant Science, 4. DOI:10.3389/fpls.2013.00116
141. Pyke N.B. (1980). Studies on bacterial speck of tomatoes caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* : a thesis presented in fulfilment of a Masterate of Science by thesis

- only at Massey University. preuzeto s: <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/13792>; 10.06.2021.
142. Qadoos M., Kahn M.I., Suleman M., Khan H., Aqeel M. i Rafiq M. (2016). Comparison of poison food technique and drenchmethod for *In Vitro* control of *Alternaria* sp., the cause of leaf spot of bitter gourd. Journal of Agricultural Science and Soil Sciences , Vol. 4(9) str. 126-130. preuzeto s: <https://meritresearchjournals.org/asss/Content/2016/September/Qadoos%20et%20a.pdf>;19.09.2020.
  143. Ramezani Y., Taheri P. Mamarabadi, M. (2019). Identification of *Alternaria* spp. associated with tomato early blight in Iran and investigating some of their virulence factors. J. Plant Pathol. 101, 647–659 DOI:10.1007/s42161-019-00259-w
  144. Rangasamy K., Athiappan M., Devarajan N., Parray J.A. (2017). Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides. Microb. Pathog. 2017, 105, 153–165. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.02.011
  145. Reid W.D. (1948). Tomato speck of tomato. N.Z. Journal of Science and Technology, 30: 5-8.
  146. Reis R. F., de Goes A., Mondal S. N., Shilts T., Brentu F.C. Timmer L.W. (2006). Effect of Lesion Age, Humidity, and Fungicide Application on Sporulation of *Alternaria alternata*, the Cause of Brown Spot of Tangerine. Plant Disease, 90(8), 1051–1054. DOI:10.1094/pd-90-1051
  147. Rhodes K.S. (1966). Colonial morphology of *Escherichia coli* on tergitol-7 medium. Appl Microbiol, 14:2 152-5. preuzeto s: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.14.2.152-155.1966>;11.6.2021.
  148. Rodrigues T., Maffia L. A., Dhingra O. D., Mizubuti E.S.G. (2010). *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG, BrazilTropical Plant Pathology, vol. 35, 4, 203-212. DOI: [org/10.1590/S1982-56762010000400001](https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000400001)
  149. Romero-Pérez A., Ameye M., Audenaert K., Van Damme E. (2021). Overexpression of F-Box Nictaba Promotes Defense and Anthocyanin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* After *Pseudomonas syringae* Infection. Frontiers in plant science, 12, 692606. DOI:10.3389/fpls.2021.692606
  150. Ron E.Z. i Davis B.D. (1971). Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine. Journal of bacteriology, 107(2), 391–396. DOI:10.1128/jb.107.2.391-396.1971
  151. Rotem J. (1994). The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity., ix + 326 pp. American Phytopathological Society, St Paul, USA. English language. ISBN

152. Rowe P. (2009). *Escherichia coli* O157:H7, other verotoxin-producing *E. coli* and the hemolytic uremic syndrome in childhood. *Can. J. Infect. Dis.* 6, 105–110. DOI: 10.1155/1995/803560
153. Roy A.C., Rasal-Monir M., Biswas S., Fatima S., Alamin M., Kabir M.H. (2020). Effect of Foliar Spray of Boron on the Growth and Quality of Exotic Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Bangladesh. *Asian Plant Research Journal*, 4(4), 17-24. DOI:10.9734/aprj/2020/v4i430092
154. Santamaría-Hernando S., Rodríguez-Herva J.J., Martínez-García P.M., Río-Álvarez I., González-Melendi P., Zamorano J., López-Solanilla E. (2018). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* exploits light signals to optimize virulence and colonization of leaves. *Environmental Microbiology*. DOI:10.1111/1462-2920.14331
155. Sayin Z., Ucan U.S., Sakmanoglu A. (2016). Antibacterial and Antibiofilm Effects of Boron on Different Bacteria. *Biol Trace Elem Res* 173, 241–246. DOI: 10.1007/s12011-016-0637-z
156. Schneider C., Rasband W, Eliceiri K. (2012) NIH Image to *ImageJ*: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012, 9, 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089
157. Sebastian J., Kolattukudy P.E. (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 263(1), 77–85. DOI:10.1016/0003-9861(88)90615-7
158. Shamshiri R.R., Jones J.W., Thorp K.R., Ahmad D., Man, H.C., Taheri S. (2018). Review of optimum temperature, humidity, and vapour pressure deficit for microclimate evaluation and control in greenhouse cultivation of tomato: a review. *International Agrophysics*, 32(2), 287–302. DOI:10.1515/intag-2017-0005
159. Shen C., Luo Y., Nou X., Wang Q., Millner P. (2013). Dynamic Effects of Free Chlorine Concentration, Organic Load, and Exposure Time on the Inactivation of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and Non-O157 Shiga Toxin–Producing *E. coli*. *Journal of Food Protection*, 76(3), 386–393. DOI:10.4315/0362-028x.jfp-12-320
160. Sherf A.F., MacNab A.A. (1986). *Vegetable diseases and their control*. Wiley, New York. ISBN: 978-0-471-05860-1
161. Shiomi D., Mori H., Niki H. (2009). Genetic mechanism regulating bacterial cell shape and metabolism. *Communicative & integrative biology*, 2(3), 219–220. DOI:10.4161/cib.2.3.7930
162. Shu X., Singh M., Karampudi N., Bridges D.F., Kitazumi A., Wu V., De Los Reyes B.G. (2021). Responses of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* to ozone

- treatment on non-host tomato: Efficacy of intervention and evidence of induced acclimation. *PLoS one*, 16(10), e0256324. DOI: 10.1371/journal.pone.0256324
163. Shulman S.T., Friedmann H.C., Sims R.H. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clinical Infectious Diseases*, Vol 45 (8) 1025–1029, DOI: 10.1086/521946
  164. Simmons E.G. (2007) *Alternaria*: an identification manual, CBS biodiversity series 6. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
  165. Simmons E.G. (1967). Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia*, 59
  166. Simmons E.G. (1981). *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*, 13, 16-34.
  167. Simmons E.G. (2003). *Alternaria* themes and variations (310-335) species on Malvaceae. *Mycotaxon*, 88, 163-217
  168. Singh R.S. i Khanna R.N. (1969). Effect of certain inorganic chemicals on growth and spore germination of *Alternaria tenuis* auct., the fungus causing core rot of mandarin oranges in India. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 37(1), 89–96. DOI:10.1007/bf02051337
  169. Sivankalyani V., Feygenberg O., Diskin S., Wright B., Alkan N. (2016). Increased anthocyanin and flavonoids in mango fruit peel are associated with cold and pathogen resistance. *Postharvest Biol. Technol.* 111, 132–139. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.08.001
  170. Smith H.W. (1965). Observations on the Flora of the Alimentary Tract of Animals and Factors Affecting Its Composition. *The Journal of pathology and bacteriology*. 89:95–122. PMID: 14263502.
  171. Solomon E.B., Pang H.J., Matthews K.R. (2003). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *J Food Prot* 66(12):2198–2202. DOI:10.4315/0362-028x-66.12.2198
  172. Stamova L. (2009). Resistance To *Pseudomonas Syringae* Pv. *tomato* Race 1. *Acta Hortic.* 808, 219-222. DOI:10.17660/ActaHortic.2009.808.33
  173. Sundin G.W. i Bender C.L. (1993). Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *American Society for Microbiology* .Vol. 59, No. 4., 1018-1024. DOI: 10.1128/aem.59.4.1018-1024.1993
  174. Štambuk P., Šikuten I., Preiner D., Nimac A., Lazarević B., Marković Z., Tomaz I. (2021). Screening of Croatian Native Grapevine Varieties for Susceptibility to *Plasmopara viticola* Using Leaf Disc Bioassay, Chlorophyll Fluorescence, and Multispectral Imaging. *Plants*, 10(4), 661. DOI:10.3390/plants10040661

175. Tack I.L.M.M., Nimmegeers P., Akkermans S., Hashem I., Van Impe J. F. M. (2017). Simulation of *Escherichia coli* Dynamics in Biofilms and Submerged Colonies with an Individual-Based Model Including Metabolic Network Information. *Frontiers in Microbiology*, 8(), 2509–. DOI:10.3389/fmicb.2017.02509
176. Tate K.G. i van der Mespel G.J. (1976). Combating bacterialspeck in tomatoes . *New Zealand Commercial Grower*. 16-18.
177. Thévenon M.F., Tondi G., Pizzi A. (2010). Friendly wood preservative system based on polymerized tannin resin-boric acid for outdoor applications. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 12(3). DOI:10.4067/s0718-221x2010000300009
178. Thomma B.P. (2003) *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol Plant Pathol*. 1;4(4):225-36. PMID: 20569383. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x.
179. Toriki A. i Furuse. K. (1988). Termite-controlling agents containing borate esters. *Japan Kokai Tokkyo Koho JP 02,129,108 (90,129,108)*. preuzeto s: <https://patents.google.com/patent/JPH02129108A/en> ;15.08.2020.
180. Torsell K. (1956). Chemistry of arylboric acids. VI. Effects of arylboric acids on wheat roots and the role of boron in plants. *Physiol. Plant.* 9, 652. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1956.tb07827.x
181. Trippier P.C. i McGuigan C. (2010). Boronic acids in medicinal chemistry: anticancer, antibacterial and antiviral applications. *Med. Chem. Commun.* 1, 183. DOI: 10.1039/C0MD00119H
182. Troncoso-Rojas R. i Tiznado-Hernández M. E. (2014). *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). *Postharvest Decay*, Sci. Direct. 147–187. DOI:10.1016/b978-0-12-411552-1.00005-3
183. Tukey J.W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5(2):99–114. preuzeto s: <http://webpace.ship.edu/pgmarr/Geo441/Readings/Tukey%201949%20-%20Comparing%20Individual%20Means%20in%20the%20Analysis%20of%20Variance.pdf>; 02.10.2021.
184. Turnbull C. (2019). Changes in pigment accumulation as indicators of physical stress in *Eucalyptus pauciflora*. *Field Studies in Ecology*, 2(1). preuzeto s: <https://studentjournals.anu.edu.au/index.php/fse/article/view/220>;12.03.2021.
185. Uppalapati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel B.N., Anand A., Mysore K.S., Bender, C.L. (2007). The Phytotoxin Coronatine Contributes to Pathogen Fitness and Is Required for Suppression of Salicylic Acid Accumulation in Tomato Inoculated with

- Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8), 955–965. DOI:10.1094/mpmi-20-8-0955
186. Uppalapati S.R., Ishiga Y., Wangdi T., Urbanczyk-Wochniak E., Ishiga T., Mysore, K.S., Bender C.L. (2008). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on Tomato Seedlings: Phenotypic and Gene Expression Analyses of the Virulence Function of Coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(4), 383–395. DOI: 10.1094/MPMI-21-4-0383
187. Ustin S.L., Gitelson A.A., Jacquemoud S., Schaepman M., Asner G.P., Gamon J., Zarco-Tejada P.(2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy, *Remote Sens. Environ.*, vol. 113, str. S67–S77. DOI: 10.5167/uzh-23317
188. Venette J.R., Lamey H.A., Smith R.C. (1996). Bacterial spot and bacterial speck of tomato. North Dakota State University and U.S. Department of Agriculture. preuzeto s <https://library.ndsu.edu/ir/bitstream/handle/10365/17253/PP-736-1996.pdf?sequence=2&isAllowed=y> ;12.03.2020.
189. Virto R., Mañas P., Alvarez I., Condon S., Raso J. (2005). Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5022–5028. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005
190. von Wulffen J., RecogNice-Team, Sawodny O., Feuer R. (2016). Transition of an Anaerobic *Escherichia coli* Culture to Aerobiosis: Balancing mRNA and Protein Levels in a Demand-Directed Dynamic Flux Balance Analysis. *PLoS one*, 11(7), e0158711. DOI: 10.1371/journal.pone.0158711
191. Walker J.C. (1952). *Diseases of vegetable crops*, 1st edn. MacGraw-Hill, New York, str. 190 - 191
192. Wang Y., Bao Y., Shen D., Feng W., Yu T., Zhang J., Zheng X. D. (2008). Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology*, 123(3), 234–239. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.002
193. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and directsequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322. preuzeto s: <http://pdf.xuebalib.com:1262/3x0d5gC6z4eF.pdf>; 09.12.2020.
194. Wieczorek D., Lipok J., Borys K.M., Adamczyk-Woźniak A., Sporzyński A. (2014). Investigation of fungicidal activity of 3-piperazine-bis(benzoxaborole) and its



- boronic acid analogue. *Applied Organometallic Chemistry*, 28(5), str. 347–350. DOI:10.1002/aoc.3132
195. Wilkie P.J. i Dye. D.W. (1974b). *Pseudomonas tomato* in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 17: 131-135. DOI: 10.1080/00288233.1974.10420991
  196. Lev-Yadun S. i Gould K.S. (2008). Role of Anthocyanins in Plant Defence. In: Winefield C., Davies K., Gould K. (eds) *Anthocyanins*. Springer, New York, NY. DOI:10.1007/978-0-387-77335-3\_2
  197. Wrolstad R.E (2006). Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science* 69: C 419-C 425. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10709.x
  198. Xin X.F., Kvitko B. He, S. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* 16, 316–328. DOI:10.1038/nrmicro.2018.17
  199. Yalinkiliç M.K., Yoshimura T., Takahashi, M. (1998). Enhancement of the biological resistance of wood by phenylboronic acid treatment. *J Wood Sci* 44, 152–157. DOI:10.1007/BF00526262
  200. Yang L.N., He M.H., Ouyang H.B. i sur. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiol* 19, 205. DOI: 10.1186/s12866-019-1574-8
  201. Yılmaz M.T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk J. Med Sci* 42:1423–1429. preuzeto s: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/128377>; 24.02.2020.
  202. Young J.M., Dye D.W., Bradbury J.F., Panagopoulos C.G., Robbs C. F. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21:153- 177. DOI: 10.1080/00288233.1978.10427397
  203. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It, DOI: 10.3390/molecules25061340
  204. Zhang H., Dolan H.L., Ding Q., Wang S., Tikekar R.V. (2019). Antimicrobial action of octanoic acid against *Escherichia coli*O157:H7 during washing of baby spinach and grape tomatoes. *Food Research International*, 108523. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108523
  205. Zhang W., F. Jiang and J. Ou. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.*,1 , 125 —144. preuzeto s: [http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2011-1\(2\)/Global-pesticide-consumption-pollution.pdf](http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2011-1(2)/Global-pesticide-consumption-pollution.pdf); 05.07.2021.

206. Zhao Y., Damicone J.P., Demezas D.H., Rangaswamy V., Bender C.L. (2007). Bacterial leaf spot of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Disease* 84, 1015–1020. preuzeto s: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1015>; 03.03.2021.
207. Zhao X., Chen S., Wang S., Shan W., Wang X., Lin Y. i sur. (2019). Defensive responses of tea plants (*Camellia sinensis*) against tea green leafhopper attack: a multi-omics study. *Front. Plant Sci.* 10:1705. DOI: 10.3389/fpls.2019.01705
208. Zheng H.H., Zhao J., Wang T.Y., Wu X.H. (2015). Characterization of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases in China. *Plant Pathology*, 64(2), 425–433. DOI:10.1111/ppa.12274
209. Zorzoli R., Pratta G.R., Rodríguez G.R., Picardi L.A. (2007). Advances in biotechnology: tomato as a plant model system. *Functional Plant Science and Biotechnology* 1(1), 146-159. preuzeto s: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/FPSB\\_1\(1\)/FPSB\\_1\(1\)146-159o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0706/FPSB_1(1)/FPSB_1(1)146-159o.pdf) ; 05.02.2020.

# ŽIVOTOPIS

Katarina Martinko je rođena 04. veljače 1992. godine u Zagrebu. Od 2016. godine, zaposlena je kao asistentica pri Zavodu za fitopatologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Nakon završene srednje škole X. Gimnazija Ivan Supek u Zagrebu 2010. godine, postaje sveučilišnom prvostupnicom završetkom prediplomskog studija Zaštita bilja 2013. godine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U sklopu diplomskog studija Fitomedicine, 2015. obavlja obaveznu stručnu praksu u mikološkom laboratoriju Zavoda za fitopatologiju te time stiče znanje i interes za područje biljne mikologije. Diplomirala je 2015. na diplomskom studiju Fitomedicina Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s prosjekom ocjena 4.80 time i dodijeljenom najvećom pohvalom *Summa cum laude*. U veljači 2016. započinje rad na Zavodu za fitopatologiju kao suradnik unutar stručnog osposobljavanja za rad bez zasnivanja radnog odnosa. Početkom lipnja 2016. godine, zapošljava se u svojstvu asistent na Zavodu za fitopatologiju gdje radi i danas. Znanstveni interesi usmjereni su na slijedeća područja: fitopatologija, mikologija, bakteriologija (morfologija, dijagnostika i taksonomija gljiva i bakterija), značaj gljiva i bakterija u ekološkoj poljoprivredi te biološko suzbijanje patogenih gljiva i bakterija. Autor je Završnog rada pod naslovom *Testiranje antibiotskog učinka Trichoderma viride naspram Fusarium subglutinans* napisanog i obranjenog 2013. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Snježana Topolovec-Pintarić. Zbog interesa za područje mikoriznih gljiva iz roda *Trichoderma*, 2015. postaje autorom Diplomskog rada *Interakcija Trichoderma viride i Fusarium solani u prisutnosti Raxil TM GEL 206* predvođena mentorstvom izv. prof. dr. sc. Snježane Topolovec-Pintarić. Godine 2017. upisuje poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Edyte Đermić i komentora dr. sc. Damira Đermića. U cilju stručne edukacije, iste godine završava napredni tečaj metoda u molekularnoj biologiji unutar tvrtke InovaGen. – *Izolacija, kvalitativna i kvantitativna analiza nukleinskih kiselina* temeljem čega stječe znanje usmjereno na područje molekularne dijagnostike gljiva i bakterija u fitopatologiji.

## Znanstvene publikacije

1. **Martinko** K., Ivanković S., Lazarević B., Đermić E., Đermić D. Control of Early Blight Fungus (*Alternaria alternata*) in Tomato by Boric and Phenylboronic Acid. *Antibiotics* 2022, 11, 320. DOI: 10.3390/antibiotics11030320
2. **Martinko** K., Ivanković S., Đermić E., Đermić D. Phenylboronic acid as a novel agent for controlling plant pathogenic bacteria. *Pest Manag Sci.* 2022 Mar 18. DOI: 10.1002/ps.6872. Epub ahead of print. PMID: 35301783
3. **Martinko** K., Ivanković S., Đermić E., Đermić D. *In vitro* antifungal effect of phenylboronic and boric acid on *Alternaria alternata*. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 2022;73. DOI: 10.2478/aiht-2022-73-3620
4. Topolovec-Pintarić S., **Martinko**, K. (2020). Downy Mildew of Basil: A New Destructive Disease Worldwide / Plant Diseases Current Threats and Management Trends /Topolovec-Pintarić, S. (ur.). London: IntechOpen, str. 1-15 DOI:10.5772/intechopen.91903

## Sudjelovanje na konferencijama

1. **Martinko** K., Tolvajčić P., Đermić E., Đermić, D. (2021). Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije borne kiseline u suzbijanju fitopatogene bakterije *Pseudomonas tomato* / Proceedings of 56th Croatian and 16th International Symposium on Agriculture / Rozman, V.; Antunović, Z. (ur.). Osijek: VIN Grafika. str. 393-397
2. Topolovec-Pintarić S., Vinceković M., Jalšenjak N., **Martinko** K., Žutić I., Đermić, E. (2017). Prototip biognojiva: mikrokapsule na osnovu *Trichoderma viride* i kalcija // 52. Hrvatski I 12. Međunarodni Simpozij Agronoma 52nd Croatian And 12th International Symposium On Agriculture / prof. dr. sc. S. Vila prof. i dr. sc. Z. Antunović (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 100-104
3. Topolovec-Pintarić S., Vinceković M., Jalšenjak N., **Martinko**, K., Žutić I., Đermić, E. (2017). Prototip biognojiva: mikrokapsule na osnovu *Trichoderma viride* i kalcija / 52. Hrvatski I 12. Međunarodni Simpozij Agronoma 52nd Croatian And 12th International Symposium On Agriculture / prof. dr. sc. S. Vila prof. i dr. sc. Z. Antunović (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 47-47
4. Vinceković M., Topolovec-Pintarić S., Jalšenjak N., Žutić I., Đermić, E., Jurić, S., Viskiće, M., Bujan M., **Martinko**, K. (2017). Simultaneous encapsulation of bioactive agents in protection and plant nutrition // 52. Hrvatski I 12. Međunarodni Simpozij Agronoma 52nd Croatian And 12th International Symposium On Agriculture / prof. dr. sc. S. Vila prof. i dr. sc. Z. Antunović (ur.). Osijek: Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. str. 47-47

# PRILOZI

## Sekvence izolata

> Izolat *Alternaria alternata* ITS 1/ITS 2

```
AGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGC
TGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCCCCACC
ACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATT
ACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG
```

> Izolat *Alternaria alternata* ITS 1 /ITS 4

```
AGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGC
TGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCCCCACC
ACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATT
ACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG
CGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCT
TTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATT
GGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAA
GGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
CGCTGAACCTAA
```

> Izolat *Pseudomonas syringe* pv. *tomato*

```
GAGGACCTGAGTATTGGCTTGTGAGTACATGTCGCTGATATTGCCAATGCCGCCAG
TACCGCTGGCAACACAATGCGTGACATGTAGCGGTGGTTCACCTCAGAAGCCACGTT
GGCCAACAGGGTGTCTCCTGAAGCGCATA
```