

# Utjecaj ishrane dušikom i borom na fenolni profil vegetativnih organa masline (*Olea europaea* L.) i njegov protugljivični učinak na *Verticillium dahliae* Kleb.

---

Grozić, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:344653>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Kristina Grozić

**Utjecaj ishrane dušikom i borom na  
fenolni profil vegetativnih organa  
masline (*Olea europaea* L.) i njegov  
protugljivični učinak na *Verticillium  
dahliae* Kleb.**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Agriculture

Kristina Grozić

**The effect of nitrogen and boron  
fertilization on the phenolic profile of  
olive (*Olea europaea* L.) vegetative  
organs and its antifungal effect on  
*Verticillium dahliae* Kleb.**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Kristina Grozić

**Utjecaj ishrane dušikom i borom na  
fenolni profil vegetativnih organa  
masline (*Olea europaea* L.) i njegov  
protugljivični učinak na *Verticillium  
dahliae* Kleb.**

DOKTORSKI RAD

Mentori: izv.prof.dr.sc. Joško Kaliterna

dr.sc. Igor Pasković

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Agriculture

Kristina Grozić

**The effect of nitrogen and boron  
fertilization on the phenolic profile of  
olive (*Olea europaea* L.) vegetative  
organs and its antifungal effect on  
*Verticillium dahliae* Kleb.**

DOCTORAL THESIS

Supervisors: assoc. prof. Joško Kaliterna, PhD

Igor Pasković, PhD

Zagreb, 2024

## **Bibliografski podatci:**

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

- Znanstveno polje: Poljoprivreda/Agronomija
- Znanstvena grana: Agrokemija
- Institucija: Institut za poljoprivredu i turizam
- Voditelji doktorskog rada: izv.prof.dr.sc. Joško Kaliterna, dr.sc. Igor Pasković
- Broj stranica: 116
- Broj Tablica: 9
- Broj Slika: 11
- Broj Grafikona: 17
- Broj literaturnih referenci: 224
- Datum obrane doktorskog rada: 02.02.2024.
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:
  - prof.dr.sc. Darko Vončina
  - prof.dr.sc. Marija Pecina
  - dr.sc. Igor Palčić

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 09. ožujka 2021. godine, te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj 18. svibnja 2021. godine.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA O IZVORNOSTI**

Ja, **Kristina Grozić**, izjavljujem da sam samostalno izradila ovaj doktorski rad pod naslovom:

**Utjecaj ishrane dušikom i borom na fenolni profil vegetativnih organa masline (*Olea europaea* L.) i njegov protugljivični učinak na *Verticillium dahliae* Kleb.**

Svojim potpisom jamčim:

Da sam jedini autor ovoga dokorskog 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, 02.02.2024. godine.



---

Potpis doktorandice

## Ocjena doktorskog rada

Kristina Grozić, mag. ing. agr. je doktorski rad pod naslovom: „**Utjecaj ishrane dušikom i borom na fenolni profil vegetativnih organa masline (*Olea europaea* L.) i njegov protugljivični učinak na *Verticillium dahliae* Kleb.**“ obranila 02.02.2024. pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr.sc. Darko Vončina

*Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet*

---

2. prof. dr. sc. Marija Pecina

*Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet*

---

3. dr.sc. Igor Palčić

*Institut za poljoprivredu i turizam*

---

Disertacija je ocijenjena od strane istog povjerenstva.



## INFORMACIJE O MENTORU

izv.prof.dr.sc. Joško Kaliterna

Joško Kaliterna rođen je 27. svibnja 1978. godine u Splitu gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirao je u lipnju 2006. godine na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2008. godine zapošljava se na Zavodu za fitopatologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao znanstveni novak na projektu „Identifikacija fitopatogena molekularnim i drugim metodama“ (MZOS), voditelja prof. dr. sc. Bogdana Cvjetkovića, professor emeritus, a potom od 2010. do 2013. na projektu „Horologija fitopatogenih gljiva na vrstama od posebne važnosti u flori Hrvatske“ (MZOS), voditelja prof. dr. sc. Tihomira Miličevića. Doktorsku disertaciju na temu „Identifikacija, patogenost i rasprostranjenost vrsta gljiva iz porodica Botryosphaeriaceae i Diaporthaceae na vinovoj lozi u Hrvatskoj“ obranio je 2013. godine.

Znanstveno se usavršavao u međunarodno priznatim institucijama u zemlji i inozemstvu, i to na Institutu „Ruđer Bošković“ u Zagrebu, u Portugalu u Centru za mikrobiološke resurse, Sveučilišta Novi Lisabon, u Italiji na Zavodu za zaštitu bilja i primijenjenu mikrobiologiju, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Bariju, te u Francuskoj, u institutu INRA. Odlukom Vijeća biotehničkog područja Sveučilišta u Zagrebu 2022. godine izabran je u znanstveno-nastavno zvanje i na radno mjesto izvanrednog profesora.

Na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu od 2008. godine sudjelovao je u izvođenju nastave kao suradnik ili nositelj na ukupno šest predmeta preddiplomskih studija, sedam predmeta diplomskih studija i jednom predmetu poslijediplomskog doktorskog studija (nositelj predmeta „Zaštita povrća i ukrasnog bilja od štetočinja“, „Bolesti ukrasnog bilja“, „Interakcija biljka patogen“, „Štetočinje povrća“). Surađivao je i na predmetu „Mikologija“ studija Biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno surađuje kako na nacionalnim tako i na međunarodnim projektima i to na stručnim, nastavnim i znanstvenim projektima. Prema bazi Web of Science Joško Kaliterna ima H-indeks 5, šest radova indeksiranih u Web of Science Core Collection bazi, jedan u Emerging Sources Citation Indeks (ESCI), te 11 radova u CAB abstracts bazi. Citiranost radova iznosi 132 (129 bez samocitata). Bio je član Hrvatskog društva biljne zaštite (HDBZ), a redoviti je član Hrvatskog mikrobiološkog društva (HMD). Od 2021. godine urednik je sekcije znanstvenog časopisa „Agriculturae Conspectus Scientificus - Poljoprivredna Znanstvena Smotra“, a od iste godine je izabran i obnaša funkciju predstojnika Zavoda za fitopatologiju Odsjeka za fitomedicinu Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Engleskim jezikom se aktivno služi u jeziku i pismu, a njemačkim jezikom služi se pasivno.

## INFORMACIJE O MENTORU

dr. sc. Igor Pasković, viši znanstveni suradnik

Dr. sc. Igor Pasković, viši znanstveni suradnik, rođen je 27. svibnja 1977. godine u Rijeci, oženjen je i otac četvero djece. Nakon završene Prve hrvatske sušačke gimnazije u Rijeci te višegodišnjeg profesionalnog bavljenja glazbom, 2000. godine upisuje diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja, na Agronomskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem diplomira u veljači 2008. godine. Iste se godine zapošljava kao znanstveni novak u Splitu, na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša, gdje je sudjelovao u provođenju više znanstvenih i stručnih projekata kao i nastave na kolegiju Smjernice ishrane bilja u hortikulturi i krajobraznoj arhitekturi u sklopu preddiplomskog međusveučilišnog studija Mediteranska poljoprivreda. Poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“ upisuje 2009. na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorsku disertaciju na temu Mineralni sastava tkiva masline pri primjeni modificiranih zeolita u alkalnom tlu obranio je 2013. godine. Nakon trogodišnjeg radnog iskustva izvan sustava znanosti i visokog obrazovanja od 2016. godine zaposlen je na Institutu za poljoprivredu i turizam (IPTPO), gdje je od 2019. godine predsjednik Znanstvenog vijeća Instituta, a od 2021. predstojnik Zavoda za poljoprivredu i prehranu.

Bio je ili je voditelj tri DOK projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ): „Projekt razvoja karijere mladih istraživača-izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2021-02-6617; DOK-2020-01-3872; DOK-2018-09-1841) kao i uspostavnog istraživačkog projekta HRZZ-UIP-2017-05-8464 „Bilinogojstvom do sekundarnih biljnih metabolita: primjena mineralnih hraniva i elicitora za povećanje koncentracije fenola u listu masline“ u sklopu kojeg je i izrađena ova disertacija. Trenutno je i voditelj studije slučaja (CSS6) u sklopu Obzor 2020 projekta: „Sustainable plant protection transition: a global health approach (SPRINT)“ (glavni partner Wageningen University, Nizozemska) te voditelj HRZZ bilateralnog HR-SLO projekta IP-2022-10-8305 „Proteinski hidrolizati kao prirodni preparati u održivom maslinarstvu“. Također, bio je i suradnik na više znanstvenih i stručnih projekata, član različitih panela Hrvatske zaklade za znanost, član znanstvenih ili organizacijskih odbora više znanstvenih i stručnih skupova kao i voditelj VIP projekta Ministarstva poljoprivrede „Optimizacija gnojidbe pri uzgoju industrijske rajčice primjenom mikoriznih gljiva“.

Kao autor ili koautor objavio je ukupno 55 znanstvenih radova, od toga 37 radova u kategoriji a1 (23 Q1 (12 kao glavni autor); 4 Q2; 5 Q3 (1 kao glavni autor); 5 Q4 (3 kao glavni autor)), 11 radova u kategoriji a2 (10 kao glavni autor) i 5 radova u kategoriji a3 (4 kao glavni autor)). Znanstveno se usavršavao u raznim međunarodnim institucijama. Trenutno je i naslovni docent na Fakultetu zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci.



Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom "Bilinogojstvom do sekundarnih biljnih metabolita: primjena mineralnih hraniva i elicitora za povećanje koncentracije fenola u listu masline" (UIP-2017-05-8464). Rad doktorandice Kristine Grozić sufinanciran je iz „Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ Hrvatske zaklade za znanost DOK-2018-09-1841.

Institut za poljoprivredu  
i turizam



Institute of Agriculture  
and Tourism

Matična institucija, Institut za poljoprivredu i turizam, sufinancirala je i materijalnom potporom podržala provođenje istraživanja potrebnih za izradu ovog rada.

## SAŽETAK

Maslina je voćna vrsta prirodno raširena na području Mediterana, a na području Republike Hrvatske zastupljen je i opisan značajan broj sorata ove gospodarski značajne kulture. Pravilna gnojidba masline neophodna je u proizvodnji visoko kvalitetnih maslinovih ulja. Gnojidba dušikom (N) i borom (B) može imati pozitivan ili negativan utjecaj na maslinu i okoliš. Navedeni makro- i mikroelementi mogu različito utjecati na razvoj masline i metaboličke promijene na njezinim vegetativnim organima. Nadalje, gnojidba N i B može utjecati na toleranciju masline prema različitim štetnim organizmima. Fenolni spojevi sudjeluju u obrambenom odgovoru masline, a mogu značajno doprinijeti toleranciji na verticilijsko venuće masline (*Verticillium dahliae* Kleb). Stoga, cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj primjene različitih molarnih koncentracija N i B na koncentraciju fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima (korijen, izbojak, list) masline kako bi se ispitalo učinak ekstrakata fenola na izolat *V. dahliae* V-263 u uvjetima *in vitro*. Kako bi se utvrdio utjecaj gnojidbe N i B na rast i razvoj masline, utvrđena su vegetativna svojstva izbojka (duljina izbojka, broj internodija, broj listova) i korijena (duljina, volumen, površina i promjer korijena) masline. S ciljem određivanja koncentracije N (g/kg ST) i B (mg/kg ST) te koncentracije fenola (mg/100 g ST) masline analizirani su uzorci korijena, izbojka i lista. Nadalje, protugljivični učinak ekstrakata fenola masline (korijen, izbojak, list), prethodno modificiranih primjenom gnojidbenih tretmana s N ili B, istražen je u uvjetima *in vitro*. Primjena gnojidbenih tretmana značajno je utjecala na vegetativna svojstva masline. Primjena viših molarnih koncentracija N i B pozitivno je utjecala na njihovo usvajanje korijenom te daljnju translokaciju u ostale vegetativne organe masline. Primjena gnojidbenih tretmana s N i B različito je utjecala na koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST), utvrđenih u vegetativnim organima masline. Ekstrakti fenola vegetativnih organa masline imali su različit inhibitorski učinak na klijavost konidija, porast i morfološka obilježja micelija *V. dahliae* V-263 u uvjetima *in vitro*.

**Ključne riječi:** Istarska bjelica, fenolni spojevi, flavonoidi, izbojak, korijen, list, oleuropein, tolerancija na patogene, gnojidba masline, verticilijsko venuće.

## EXTENDED SUMMARY

### **The effect of nitrogen and boron fertilization on the phenolic profile of olive (*Olea europaea* L.) vegetative organs and its antifungal effect on *Verticillium dahliae* Kleb.**

Olive (*Olea europaea* L.) has great cultural and economic importance in the Mediterranean basin. Olive oil production is an important source of revenue for many countries in the region and contributes to the growth of their economies. The production of olives and olive oil depends on numerous factors, including the correct application of nutrients. When it comes to olive production and the environment, the type of fertilization used can make a significant difference. Nitrogen (N) and boron (B) fertilization, in particular, can have varying effects on olive production.

Fertilization can greatly impact olive growth, nutrient uptake and distribution, phenolic content in olive, and olive tolerance to phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb. This study aimed to investigate the effects of N and B fertilization on their content in various parts of olive, including the roots, stem, and leaves. Additionally, this study aimed to evaluate the impact of these nutrients on olive growth traits. This study also examined the effect of N and B fertilization on the phenolic content (root, stem, leaves) and the antifungal activity of phenolic extracts on *V. dahliae* V-263.

Fertilization experiments were conducted separately for N (experiment 1) and B (experiment 2). Seven different treatments were adopted in each experiment, representing seven molar concentrations of either N or B. The control treatments were N0 and B0. The study was conducted on one-year-old plantlets of the Istarska bjelica cultivar, which were grown in an inert substrate under controlled conditions. Measurements were taken periodically, including air temperature, substrate moisture, substrate pH, and olive growth traits. At the end of the experiment, samples of roots, stems, and leaves were collected and prepared for further analysis. The growth traits of olive roots were analyzed at the end of the experiment. Chemical analyses were conducted to evaluate the content of N (g/kg dry weight (DW)) or B (mg/kg DW), total and individual phenolic compounds (mg/100 g DW) in roots, stems, and leaves. *In vitro* antifungal activity of phenolic extracts, obtained from fertilization treatments with N or B, was assessed against *V. dahliae* V-263 (experiment 3 a,b; experiment 4).

The growth traits of olive were positively affected by the applied N fertilization treatments (N1 – N6), resulting in a greater root and shoot growth compared to the growth resulting from control treatment N0. The uptake and translocation of N from roots to stem and leaves were significantly affected by the application of different N fertilization treatments (N0 – N6).

The lowest content of N (g/kg DW) in olive (root, stem, leaves) was found in the control fertilization treatment N0. The content of total and individual phenolic compounds was negatively affected by the applied fertilization treatments (N4 – N6). This study reports the antifungal activity of phenolic extracts (EF), EF-N0 – EF-N6, (root, stem, leaves) modified by N fertilization treatments (N0 – N6). The application of phenolic extracts (treatments EF-N0 – EF-N6) on *V. dahliae* V-263 had no inhibitory effect on the conidial germination, therefore showing lack of antifungal activity.

The application of higher molar concentrations of B (fertilization treatments B3 – B6) positively affected olive growth traits when compared to the control fertilization treatment B0. The lowest content of B (mg/kg DW) was observed in the control fertilization treatment B0 of all investigated parts of olive. The applied fertilization treatments B1 – B6 had varying effects on the content of total and individual phenolic compounds (mg/100 g DW) in the different parts of olive. The results of this study demonstrated that the phenolic extracts of roots and leaves had a significant antifungal effect on *V. dahliae* V-263. Specifically, phenolic extracts of roots (treatments EF-B0, EF-B3, and EF-B4), as well as phenolic extracts of stems (treatment EF-B2), significantly inhibited the conidial germination of *V. dahliae* V-263 therefore exhibiting antifungal effect. Additionally, significant inhibitory and antifungal effects were observed on the mycelium growth of *V. dahliae* V-263 when phenolic extracts from olive roots (treatments EF-B0 – EF-B6) and leaves (treatments EF-B0, EF-B2 – B5) were applied. The applied phenolic extracts (treatments EF-B0 – EF-B6) had different effects on the morphological characteristics of *V. dahliae* V-263 mycelium *in vitro*.

The findings of this study contribute to a better understanding of the complex interaction between nutrient fertilization, phenolic compounds, and the relation between modified phenolic extracts and *V. dahliae* V-263 conidial germination and mycelium growth. Further studies are required to identify the effect of N or B fertilization on the content of phenolic compounds in the olive tree and their role in olive tolerance to *V. dahliae* V-263.

**Key words:** flavonoids, Istarska bjelica, leaves, phenolic compounds, pathogen tolerance, oleuropein, olive fertilization, root, stem, Verticillium wilt.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja.....	4
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....	5
2.1. Istarska bjelica – opis i značaj.....	5
2.2. Ishrana masline .....	6
2.2.1. Dušik .....	6
2.2.2. Bor.....	8
2.3. Fenolni spojevi .....	10
2.3.1. Utjecaj dušika na koncentraciju fenolnih spojeva.....	12
2.3.2. Utjecaj bora na koncentraciju fenolnih spojeva.....	12
2.3.3. Utjecaj fenolnih spojeva na tolerantnost biljaka na patogene .....	13
2.4. <i>Verticillium dahliae</i> .....	14
2.4.1. Taksonomska pripadnost i morfološke karakteristike .....	14
2.4.2. Populacijska struktura .....	15
2.4.3. Rasprostranjenost vrste .....	17
2.4.4. Simptomi i štetnost verticilijskog venuća.....	18
2.4.5. Životni ciklus i epidemiologija.....	21
2.4.6. Utjecaj ishrane masline na razvoj vrste <i>Verticillium dahliae</i> .....	22
2.4.7. Utjecaj fenolnih spojeva na <i>Verticillium dahliae</i> .....	23
3. MATERIJAL I METODE RADA .....	26
3.1. Gnojidbeni pokusi s dušikom i borom.....	26
3.1.1. Postavljanje pokusa .....	26
3.1.2. Eksperimentalni dizajn .....	26
3.1.3. Uvjeti uzgoja.....	27
3.1.4. Određivanje vegetativnih svojstava masline .....	30
3.1.5. Uzorkovanje lista, izbojka i korijena .....	30
3.1.6. Određivanje vegetativnih svojstava korijena .....	30
3.1.7. Kemijske analize vegetativnih organa masline .....	31
3.1.8. Kvantitativna analiza koncentracije dušika i bora.....	31
3.1.9. Kvantitativna analiza koncentracije fenolnih spojeva .....	33
3.2. Istraživanje protugljivičnog učinka ekstrakata fenola na <i>Verticillium dahliae</i> .....	34

3.2.1.	Eksperimentalni dizajn .....	34
3.2.2.	Dobivanje ekstrakata fenola masline i priprava matičnih otopina u DMSO....	36
3.2.3.	Priprava inokuluma <i>Verticillium dahliae</i> .....	37
3.2.4.	Učinak ekstrakata fenola masline na klijanje konidija <i>Verticillium dahliae</i> .....	37
3.2.5.	Protugljivični učinak ekstrakata fenola masline na porast i morfološka obilježja micelija <i>Verticillium dahliae</i> .....	39
3.3.	Statistička analiza podataka .....	40
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	43
4.1.	Gnojdbeni pokusi s dušikom i borom.....	43
4.1.1.	Vegetativna svojstva masline .....	43
4.1.2.	Koncentracija dušika i bora u maslini .....	53
4.1.3.	Koncentracija fenolnih spojeva u maslini .....	54
4.1.4.	Diskriminantna analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS-DA) .....	60
4.2.	Protugljivični učinak ekstrakata fenola na <i>Verticillium dahliae</i> .....	64
4.2.1.	Protugljivični učinak ekstrakata fenola na klijavost konidija <i>Verticillium dahliae</i> .....	64
4.2.2.	Protugljivični učinak ekstrakata fenola na porast i morfološka obilježja micelija <i>Verticillium dahliae</i> .....	70
5.	RASPRAVA.....	76
5.1.	Gnojdbeni pokusi s dušikom i borom.....	76
5.1.1.	Vegetativna svojstva masline, koncentracija dušika i bora u maslini .....	76
5.1.2.	Koncentracija fenolnih spojeva u maslini .....	79
5.2.	Protugljivični učinak ekstrakata fenola na <i>Verticillium dahliae</i> .....	84
6.	ZAKLJUČCI.....	91
7.	POPIS LITERATURE .....	93
	ŽIVOTOPIS AUTORA .....	114



## POPIS KRATICA

B – bor

B0 – B6 – gnojidbeni tretmani s borom (B), gdje tretman B0 predstavlja najnižu primijenjenu molarnu koncentraciju B (kontrolni tretman), a tretman B6 najvišu primijenjenu molarnu koncentraciju B.

DMSO – dimetilsufoksid

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ICP-AES – atomski emisijski spektrofotometar s induktivno spregnutom plazmom

N – dušik

N0 – N6 – gnojidbeni tretmani s dušikom (N), gdje tretman N0 predstavlja najnižu primijenjenu molarnu koncentraciju N (kontrolni tretman), a tretman N6 najvišu primijenjenu molarnu koncentraciju N.

NCBI - National Center for Biotechnology Information

*O. europaea* – *Olea europaea* L.

Okr/min – okretaja/minuti

*p.a.* – *pro analysis*

PDA – krumpir dekstrozni agar

PDB – krumpir dekstrozni bujon

UV-VIS – UV-VIS spektrofotometrija

*V. dahliae* – *Verticillium dahliae* Kleb.

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Utjecaj gnojidbenih tretmana (N0 – N6) na duljinu, površinu, promjer i volumen korijena masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4)...	51
Tablica 2. Utjecaj gnojidbenih tretmana (B0 – B6) na duljinu, površinu, promjer i volumen korijena masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4)...	52
Tablica 3. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana (N0 – N6) na koncentraciju dušika (N g/kg ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4).....	53
Tablica 4. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana (B0 – B6) na koncentraciju bora (B mg/kg ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4).....	54
Tablica 5. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6) na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4).....	56
Tablica 6. Povezanost između koncentracije dušika (N g/kg ST) i koncentracije fenolnih spojeva (mg/100 g ST) utvrđenih u vegetativnim organima masline (korijen, izbojak, list) istraženih gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6).....	57
Tablica 7. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana s B (B0 – B6) na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4).....	59
Tablica 8. Povezanost između koncentracije bora (B mg/kg ST) i koncentracije fenolnih spojeva (mg/100 g ST) utvrđenih u vegetativnim organima masline (korijen, izbojak, list) istraženih gnojidbenih tretmana s B (B0 – B6).....	60
Tablica 9. Protugljivični učinak ekstrakata fenola (EF-B0 – EF-B6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) na inhibiciju porasta (% inhibicije) micelija <i>Verticillium dahliae</i> V-263 u uvjetima <i>in vitro</i> (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4).....	71

## POPIS SLIKA

Slika 1. Micelij, mikrosklerociji, konidiofori i konidiji vrste <i>Verticillium dahliae</i> .....	15
Slika 2. Rasprostranjenost vrste <i>Verticillium dahliae</i> .....	17
Slika 3. Simptomi verticilijskog venuća na maslini.....	20
Slika 4. Izolat <i>Verticillium dahliae</i> V-263 na hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar.....	37
Slika 5. Utjecaj gnojdbenih tretmana s dušikom (N0 – N6) na razvoj lista masline.....	43
Slika 6. Utjecaj gnojdbenih tretmana s borom (B0 – B6) na razvoj lista masline.....	44
Slika 7. Utjecaj primjene gnojdbenih tretmana s dušikom (N0 – N6) na razvoj korijena masline.....	51
Slika 8. Utjecaj primjene gnojdbenih tretmana s borom (B0 – B6) na razvoj korijena masline.....	52
Slika 9. Utjecaj primjene ekstrakata fenola korijena (EF-B0 – EF-B6) na morfološka obilježja micelija <i>Verticillium dahliae</i> V-263.....	73
Slika 10. Utjecaj primjene ekstrakata fenola izbojka (EF-B0 – EF-B6) na morfološka obilježja micelija <i>Verticillium dahliae</i> V-263.....	74
Slika 11. Utjecaj primjene ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6) na morfološka obilježja micelija <i>Verticillium dahliae</i> V-263.....	75

## POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Minimalna, prosječna i apsolutna maksimalna temperatura zraka (°C) u razdoblju provođenja pokusa.....	28
Grafikon 2. Minimalna, prosječna i maksimalna relativna vlaga zraka (%) u razdoblju provođenja pokusa.....	28
Grafikon 3. Prosječna vlažnost supstrata (%) u razdoblju provođenja pokusa.....	29
Grafikon 4. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (N0 – N6) i period mjerenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na duljinu izbojka (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	45
Grafikon 5. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (N0 – N6) i period mjerenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj internodija masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4)....	46
Grafikon 6. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (N0 – N6) i period mjerenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj listova masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	47
Grafikon 7. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (B0 – B6) i period mjerenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na duljinu izbojka masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4)....	48
Grafikon 8. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (B0 – B6) i period mjerenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj internodija masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4)....	49
Grafikon 9. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (B0 – B6) i period mjerenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj listova masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	50
Grafikon 10. Razdvajanje gnojidbenih tretmana s dušikom (N0 – N6) temeljem koncentracije N (g/kg ST) i koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (g/100 mg ST; hidroksitirozol, tirozol, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein) određenih u vegetativnim organima masline (korijen – K, izbojak – I, list – L).....	62
Grafikon 11. Razdvajanje gnojidbenih tretmana s borom (B0 – B6) temeljem koncentracije B (g/kg ST) i pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST; hidroksitirozol, tirozol, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein) određenih u vegetativnim organima masline (korijen – K, izbojak – I, list – L).....	63
Grafikon 12. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola korijena masline (ekstrakti fenola EF-N0 – EF-N6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) <i>Verticillium dahliae</i> V-263 (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	65
Grafikon 13. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola izbojka masline (ekstrakti fenola EF-N0 – EF-N6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) <i>Verticillium dahliae</i> V-263 (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	66
Grafikon 14. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola lista masline (ekstrakti fenola EF-N0 – EF-N6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti	

konidija (apsorbancija pri 505 nm) <i>Verticillium dahliae</i> V-263 (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	67
Grafikon 15. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola korijena masline (ekstrakti fenola EF-B0 – EF-B6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) <i>Verticillium dahliae</i> V-263 (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	68
Grafikon 16. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola izbojka masline (ekstrakti fenola EF-B0 – EF-B6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) <i>Verticillium dahliae</i> V-263 (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	69
Grafikon 17. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola lista masline (ekstrakti fenola EF-B0 – EF-B6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) <i>Verticillium dahliae</i> V-263 (srednja vrijednost ± standardna pogreška, n = 4).....	70

## 1. UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) se tradicionalno uzgaja na području Mediterana zbog proizvodnje ploda i maslinovog ulja. Fenolni spojevi masline doprinose toleranciji masline na ekonomski značajne gljivične bolesti (Nicholson i Hammerschmidt, 1992; Báidez i sur., 2007).

Na području priobalne Hrvatske opisane su mnogobrojne sorte masline, a među opisanim sortama Istarska bjelica predstavlja značajan udio ukupnog fonda stabala (Strikić i sur., 2012). Visoku zastupljenost ove sorte u Republici Hrvatskoj opravdavaju agronomske karakteristike poput redovitog i visokog prinosa, kasnijeg perioda dozrijevanja, visoke koncentracije fenolnih spojeva u plodu ili listu, visoke tolerancije na niske temperature, sušu i salinitet (Perica i sur., 2008; Lukić i sur., 2018; Pasković i sur., 2020).

Ishrana masline dušikom (N) i borom (B) neophodna je za normalan rast i razvoj stabla, prinos i kvalitetu ploda te koncentraciju fenola u vegetativnim organima masline (Fernández-Escobar, 2019; Pasković i sur., 2019). Analizom koncentracije N i B u potpuno razvijenom listu, tijekom perioda ljetnog ili zimskog mirovanja, moguće je odrediti razinu opskrbljenosti masline navedenim elementima te prilagoditi gnojidbu njezinim stvarnim potrebama (Fernández-Escobar, 2019). Ishrana N i B ima značajnu ulogu u toleranciji masline na abiotičke i biotičke čimbenike (Fernández-Escobar, 2019), a utvrđen je i snažan utjecaj gnojidbe N i B na koncentraciju fenola u ulju ili listu masline (Erel i sur., 2013; Pasković i sur., 2019). Primjena N u maslinarskoj proizvodnji vrlo često je prekomjerna, a primjena B uglavnom ne zadovoljava godišnje potrebe masline za tim mikroelementom (Fernández-Escobar, 2019; Othman i Leskovar, 2019).

Kao esencijalni biogeni elementi, N i B sastavni su dio fizioloških i metaboličkih procesa biljke (Broadley i sur., 2012; Hawkesford i sur., 2012). Dušik sudjeluje u primarnoj građi biljke i sastavni je dio proteina, enzima i nukleinskih kiselina (Othman i Leskovar, 2019). Bor ima značajnu ulogu u strukturi i funkciji biljnih membrana, sudjeluje u metabolizmu N i fenolnih spojeva, metabolizmu i prijenosu ugljikohidrata te staničnom disanju (Bolaños i sur., 2004; Wimmer i sur., 2019).

Dušik nema direktnu ulogu u metabolizmu fenolnih spojeva, a primjena viših koncentracija N značajno utječe na vegetativni porast i premještanje ugljika u primarne strukture biljke koja se odvija nauštrb biosinteze sekundarnih metabolita kao što su fenolni spojevi (Heimler i sur., 2017). Viša koncentracija N u biljci inhibira biosintezu fenolnih spojeva ili njihovih prekursora zbog kompeticije između biosinteze proteina i biosinteze fenola. Istraživanjima provedenima na maslini utvrđena je snažna veza između primijenjene koncentracije N i koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju (Erel i sur., 2013). U prethodnim je istraživanjima utvrđeno da primjena viših molarnih koncentracija N (11 mmol N/L hranive

otopine) u ishrani masline negativno utječe na koncentraciju fenolnih spojeva (65 mg/kg ST) u maslinovom ulju, dok primjena nižih molarnih koncentracija N (0,4 mmol N/L hranive otopine) može značajno povećati koncentraciju fenolnih spojeva (275 mg/kg ST) u maslinovom ulju (Dag i sur., 2009). U dostupnoj literaturi do sad provedena istraživanja primarno su bila usredotočena na učinak N na svojstva priroda masline i kvalitete maslinovih ulja, dok je veza između koncentracije N i fenolnih spojeva u korijenu, izbojku i listu masline još uvijek nedovoljno istražena (Fernández-Escobar, 2019).

Ishrana masline s B utječe na fenolni profil odnosno sastav i koncentraciju fenola lista masline. Poznato je da B sudjeluje u metabolizmu fenola i da odnos između koncentracije B i fenolnih spojeva nije linearan (Wimmer i sur., 2019). Nedostatak B može povećati koncentraciju fenolnih spojeva u vegetativnim organima masline, što je posljedica izraženijeg nakupljanja fenola u postojećim staničnim strukturama ili direktnog učinka B na metaboličke procese koji dovode do biosinteze fenolnih spojeva (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005). Uslijed ograničenog porasta biljke, kao posljedica nedostatka B, indirektno je reducirana biosinteza međuprodukata lignina, a potaknuta aktivnost fenilpropanoidnog biosintetskog puta i fenilalaninske amonijačne liaze (PAL) (González-Fontes, 2020). Nedostatak B reducira stvaranje kompleksa *cis*-dihidroksil-borata čime se u biljci povećava koncentracija molekula s *cis*-diolnom strukturom (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005).

Bor može značajno povećati koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i pojedinačnih fenolnih spojeva poput oleuropeina u listu masline (Pasković i sur., 2019). Naime, pri višim koncentracijama u vegetativnim organima B ima negativan utjecaj, a taj negativan utjecaj B biljka smanjuje povećanom biosintezom fenolnih spojeva (Wimmer i sur., 2019). Viša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (5,15 – 5,33 µg/g svježe tvari) u listu duhana utvrđena je kod nedostatka i suviška B, dok je pri optimalnoj koncentraciji biljci dostupnog B koncentracija fenolnih spojeva niža (3,11 – 3,30 µg/g svježe tvari) (Ruiz i sur., 1998). Kako bi se utvrdila uloga B u biosintezi fenolnih spojeva masline, potrebna su dodatna istraživanja kojima će se pojasniti utjecaj nedostatka i suviška B u vegetativnim organima masline na koncentraciju pojedinačnih fenolnih spojeva.

Fitopatogena gljiva *Verticillium dahliae* Kleb. uzročnik je bolesti verticilijsko venuće masline koju primarno inficira putem korijena, a potom se širi u njezine nadzemne dijelove. Sadnice masline, kod intenzivnog porasta korijena, podložnije su infekciji *V. dahliae* (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). Intenzitet porasta i koncentracija pojedinih makro- i mikroelemenata u korijenu masline značajno se razlikuje ovisno o koncentraciji primijenjenog N ili B (Chatzissavvidis i Therios, 2010; Othman i Leskovar, 2019). Stoga, može se pretpostaviti da bi primjena viših koncentracija N ili B mogla doprinijeti većem razvoju *V. dahliae* u proizvodnim uvjetima masline.

Fenolni spojevi biljaka su sekundarni metaboliti s izraženim protugljivičnim djelovanjem (Talhaoui i sur., 2015). U biljnoj stanici zastupljeni su kao slobodne topljive i vezane netopljive (stanična stijenka i različiti kompleksi) molekule (Cheynier i sur., 2013). Biosinteza fenolnih spojeva razlikuje se ovisno o tipu (korijen, izbojak, list) i starosti vegetativnih organa (Talhaoui i sur., 2015). Mogu biti konstitutivni produkti biosinteze koja je neovisna o infekciji patogenim mikroorganizmima, ali imaju i ulogu u obrani od istih (fitoanticipini), ili se biosinteza odvija *de novo* u okviru obrambenih reakcija biljke na infekciju patogenim mikroorganizmima (fitoaleksini) (Cheynier i sur., 2013). Koncentracija fenolnih spojeva u vegetativnim organima značajno utječe na obrambeni odgovor masline protiv *V. dahliae* (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). Primjerice, kod sorata masline osjetljivih na *V. dahliae* utvrđena je smanjena biosinteza oleuropeina (Picual, Hojiblanca, Leccino), dok su više koncentracije verbaskozida uočene kod tolerantnih (Koroneiki) i osjetljivih (Empeltre, Frantoio, Changlot) sorata masline (Markakis i sur., 2010; Cardoni i sur., 2023). Podaci o mehanizmu djelovanja i protugljivičnom učinku fenolnih spojeva na vijabilnost i virulentnost *V. dahliae* u dostupnoj literaturi su vrlo ograničeni (Báidez i sur., 2007; Markakis i sur., 2010; López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Cardoni i sur., 2023).



## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

### HIPOTEZE:

1. Primjena najniže i najviše molarne koncentracije B, u odnosu na ostale tretmane, povećat će koncentraciju oleuropeina i protugljivični učinak ekstrakata te smanjiti rast i razvoj korijena i izbojka, dok će koncentracija B u vegetativnim organima masline pratiti porast koncentracije B u hranivoj otopini.
2. Primjena viših molarnih koncentracija N smanjit će koncentraciju oleuropeina i protugljivični učinak ekstrakata masline, a povećat će koncentraciju N u različitim vegetativnim organima masline kao i rast izbojka i razvoj korijena.

### CILJEVI:

1. Utvrditi utjecaj gnojidbenih tretmana na:
  - vegetativna svojstva masline te koncentraciju minerala i fenola u korijenu, izbojku i listu;
  - protugljivični učinak fenolnih ekstrakata različitih vegetativnih organa masline na *Verticillium dahliae* Kleb. u uvjetima *in vitro*.
2. Utvrditi povezanost koncentracije N, B i fenolnih spojeva u vegetativnim organima masline za svaki gnojidbeni tretman, te udio N, B i fenolnih spojeva u ukupnoj varijabilnosti.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Istarska bjelica – opis i značaj

Maslina (*O. europaea*) je voćna vrsta prirodno zastupljena i raširena na području Mediterana te manjim dijelom na području tropskih i sub-tropskih regija. Maslina kao vrsta dijeli se u nekoliko podvrsta koje su podijeljene u dvije primarne skupine. Prvoj skupini pripadaju mediteranske (*O. europaea* subsp. *europaea*, *O. europaea* subsp. *marocanna*, *O. europaea* subsp. *cerasiformis*, *O. europaea* subsp. *guanchica*), a drugoj ne-Mediteranske podvrste masline (*O. europaea* subsp. *laperrinei*, *O. europaea* subsp. *cuspidata*; Besnard i sur., 2018). Na uzgojnom području Mediterana podvrsta *O. europaea* subsp. *europaea* je raširena u najvećoj mjeri i ima veliki gospodarski značaj (Diez i sur., 2015; Besnard i sur., 2018). Poveznica između kultivirane vrste i divlje masline (*O. europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) nije u potpunosti jasna, a obje su raširene i značajan su dio mediteranske vegetacije i kulture (Besnard i sur., 2018).

Literaturno je opisano više od 1200 različitih sorata masline koje se u svijetu uzgaja za proizvodnju plodova za konzumaciju i visoko kvalitetnih maslinovih ulja (Bartolini i sur., 1998). Na području priobalne Hrvatske zastupljena je i opisana 61 autohtona sorta masline (Strikić i sur., 2010; Strikić i sur., 2012). Ipak, na sortnoj listi Republike Hrvatske navedeno je 28 sorata masline od čega 16 čine upravo autohtone sorte (HAPIH, 2023). Na području Republike Hrvatske opisan je značajan broj sorata masline, ali potrebno je uzeti u obzir i mnogobrojne fenotipove koje se međusobno ne razlikuje. Istarska bjelica predstavlja značajan udio ukupnog fonda stabala na području Republike Hrvatske (Strikić i sur., 2012), a porijeklo ove sorte i povezanost korištenog nazivlja tek je relativno nedavno istraženo (Bandelj i sur., 2004; Poljuha i sur., 2008 a,b; Benčić i sur., 2009).

Istarska bjelica ima visok vigor i bujan rast. Primarna morfološka svojstva Istarske bjelice su eliptično-izduženi te srednje dugačak i širok list, cvat srednje dužine sa srednjim brojem cvjetova, okruglast plod koji je srednje veličine. Ova je sorta djelomično samooplodna, a urod je visok i redovan (Barranco i Rallo, 2000). Plod Istarske bjelice dozrijeva kasno, a berba se provodi najčešće u periodu dok je plod još zelen (Brkić Bubola i sur., 2017). Značajne agronomске odlike Istarske bjelice su tolerantnost na niske temperature, sušu (Barranco i Rallo, 2000), salinitet (Perica i sur., 2008) i određene gljivične bolesti (Godena i sur., 2022). Ipak, mehanizmi tolerantnosti ove sorte na navedene abiotičke i biotičke čimbenike još su uvijek slabo poznati. Visoka koncentracija fenolnih spojeva kao i specifična koncentracija pojedinih elemenata, u odnosu na najzastupljenije sorte hrvatskog uzgojnog područja, upućuju na specifičan fiziološki i metabolički odgovor Istarske bjelice na određene uzročnike stresa (Pasković i sur., 2020). Proizvedena ekstra djevičanska maslinova ulja imaju izražena senzorna svojstva te specifičan sastav fenolnih spojeva, sterola i triterpena.

Nadalje, visoka koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (173 – 432 mg/kg ST) doprinosi gorčini i pikantnosti maslinovih ulja sorte Istarske bjelice (Brkić Bubola i sur., 2017).

## **2.2. Ishrana masline**

Ishrana je neophodna za pravilan rast i razvoj stabla masline. Optimalna ishrana masline vrlo je varijabilan čimbenik na kojeg mogu utjecati, između ostalog, sorta i starost stabla masline (Fernández-Escobar, 2019). U ishrani masline se kao najviše istraženi makroelementi navode N, kalij i fosfor, dok je od mikroelemenata najviše istražen B (Fernández-Escobar, 2019; Zipori i sur., 2020). Promatra li se različite sorte pri jednakim okolišnim i proizvodnim uvjetima može se uočiti da se međusobno razlikuju u koncentraciji pojedinih makro- i mikroelemenata u listu (Pasković i sur., 2020). Na koncentraciju pojedinih makro- i mikroelemenata može utjecati kako njihova dostupnost i način usvajanja (Grozić i sur., 2020; Vidović i sur., 2021), tako i fiziološke potrebe masline uvjetovane specifičnim okolišnim čimbenicima (Fernández-Escobar, 2019).

Tolerantnost ili osjetljivost na abiotičke i biotičke čimbenike može biti podređena ishranjenosti biljke. Odgovarajuća gnojidba masline može doprinijeti optimalnom porastu i pri nepovoljnim vanjskim čimbenicima. S druge strane, prekomjerna ili nedostatna primjena pojedinih elemenata može utjecati na veću osjetljivost masline prema istima (Fernández-Escobar, 2019).

### **2.2.1. Dušik**

Dušik je u biljci, nakon ugljika, po udjelu u masi suhe tvari, najzastupljeniji esencijalni makroelement (Hawkesford i sur., 2012), a koji je neophodan za rast, razvoj i prirod masline (Erel i sur., 2013). Primjena visokih koncentracija N može negativno utjecati na kvalitetu ploda masline i maslinovog ulja (Fernández-Escobar i sur., 2006). S druge pak strane nedostatak N negativno utječe na porast, ukupnu biomasu, sadržaj klorofila, fotosintetsku aktivnost lista, intenzitet cvatnje, formiranje ploda i prirod masline (Erel i sur., 2008; Ferreira i sur., 2020). Jedan od prvih simptoma nedostatka N je pojava kloroze na starijim listovima smještenima na nižim dijelovima biljke (Souza i sur., 2019).

Pri niskim koncentracijama biljci dostupnog N dolazi do nakupljanja ugljikohidrata, biljka zaostaje u porastu, a izbojci su drvenasti i krhki (Pevalek-Kozlina, 2003). Nakupljanje ugljikohidrata posljedica je smanjene biosinteze aminokiselina i drugih spojeva koji sadrže N. Optimalna primjena N pospješuje fotosintetske procese, ukupnu površinu i funkcionalnost lista te stvaranje asimilata (Omondi i sur., 2019). Smatra se da je 70% N lista prisutno u kloroplastima (Pevalek-Kozlina, 2003). Unos visokih i potencijalno toksičnih koncentracija N reguliran je njegovim intenzivnim prijenosom iz lista u druge vegetativne

organe masline. Taj intenzivan prijenos i distribucija N održavaju primarne funkcije biljke pa jasno vidljivi simptomi toksičnosti izostaju. U maslini nisu utvrđene granice toksičnosti za N, no primjena visokih koncentracija ovog elementa negativno utječe na okoliš i svojstva priroda, kako masline tako i drugih kultura (Molina-Soria i Fernández-Escobar, 2008).

Usporedi li se koncentracija N u vegetativnim organima masline, ovaj se makroelement najvećim dijelom nakuplja u listu (51%), nakon kojeg slijede korijen (31%) i izbojak (18%) masline (Fernández-Escobar i sur., 2016; Fernández-Escobar, 2018). Maslini je N neophodan gotovo cijele godine za razvoj izbojka, lista, cvata i ploda. Visoki prirod i intenzivna rezidba doprinose značajnim gubitcima N u masliniku, stoga je primjenu N potrebno prilagoditi zahtjevima masline tijekom vegetacije (Fernández-Escobar, 2018). Iz navedenih razloga, dugoročna primjena N u višegodišnjim nasadima može imati različit utjecaj na svojstva masline (Fernández-Escobar i sur., 2009 a,b; Erel i sur., 2008; Ferreira i sur., 2020). Nadalje, kako bi se osigurao optimalan razvoj biljaka, osim unosa potrebnih koncentracija N, potrebna je i uravnotežena primjena N u obliku amonijevog i nitratnog iona (Muratore i sur., 2021).

U biljci N ima različite uloge, a sastavni je dio adenzin-trifosfata, nukleinskih kiselina, proteina, enzima, klorofila, fitohormona (auksina i citokinina) i sekundarnih metabolita (Hawkesford i sur., 2012; Andrews i sur., 2013). Kao sastavni dio proteina indirektno sudjeluje u izgradnji primarnih strukturalnih komponenti kao što su stanice i biljna tkiva. Enzimi su također povezani s metabolizmom N pa na taj način ovaj element doprinosi i pravilnom odvijanju biokemijskih reakcija unutar biljke. Dušik je jedan od primarnih komponenti klorofila, ključnih pigmenata za odvijanje fotosintetskih procesa, gdje sudjeluje u regulaciji ugljičnog dioksida (Nunes-Nesi i sur., 2010).

Ovisno o primijenjenom obliku N, on može različito utjecati na osjetljivost/tolerantnost biljaka na pojedine patogene (Tavernier i sur., 2007; Sun i sur., 2020; López-Moral i sur., 2022 b). U pojedinim slučajevima gnojdba N može povećati obrambene odgovore biljke, a može povećati i dostupnost N spojeva koje patogeni mogu koristiti kao izvor hrane (Tavernier i sur., 2007). Primjena ovog makroelementa osigurava intenzivniji porast biljke čime tkivo postaje podložnije razvoju patogena (Sun i sur., 2020). Prekomjerna primjena N izaziva niz promjena u biljkama, a povećana biosinteza aminokiselina u biljnom tkivu odvija se nauštrb biosinteze fenolnih spojeva. Veća dostupnost izvora hrane u obliku aminokiselina i smanjena koncentracija fenolnih spojeva potiču razvoj patogena u biljnom tkivu (Solomon i sur., 2003; Sun i sur., 2020).

Nastupanjem infekcije biljka domaćin nastoji usmjeriti hraniva u biosintezu fitoaleksina ili premjestiti ih u organe koji su udaljeni od mjesta infekcije (Mur i sur., 2017). Virulentnost patogena očituje se i u njegovom potencijalu da iskoristi u biljci dostupan N kako bi osigurao vlastiti razvoj (Robert i sur., 2002). Primjena N može u biljci promijeniti ravnotežu

translokacije pojedinih hraniva ili smanjiti biosintezu fitoaleksina i fitoanticipina u korist patogena (Ward i sur., 2010; Maupetit i sur., 2018). Osim ukupne koncentracije primijenjenog N, na tolerantnost biljke prema određenim patogenima utječe i oblik primijenjenog N. U tom kontekstu, primjena viših koncentracija N može smanjiti ili povećati tolerantnost biljke prema određenim patogenima (Maupetit i sur., 2018). Koncentracija N u biljnom tkivu utječe na biosintezu konstitutivnih fenolnih spojeva koji čine sastavni dio primarnih obrambenih odgovora biljke na novonastalu infekciju (Mur i sur., 2017; Maupetit i sur., 2018).

Utjecaj primjene N na razvoj *V. dahliae* istražen je u nekoliko različitih kultura (Tenuta i Lazarovits, 2002; Romanyà i sur., 2019), a u posljednjih je godina provedeno i nekoliko istraživanja na maslini (López-Moral i sur., 2022 b; Pérez-Rodríguez i sur., 2022). Brojne nepoznanice o interakciji između N i metaboličkih promjena u maslini te njihovom zajedničkom utjecaju na *V. dahliae* još su uvijek prisutne.

### 2.2.2. Bor

Bor je esencijalni mikroelement neophodan za normalan rast i razvoj stabla te prirod i kvalitetu ploda masline (Fernández-Escobar, 2018; Fernández-Escobar, 2019). Ranije se smatralo da je usvajanje B isključivo pasivno, a novijim se istraživanjima utvrdilo da je usvajanje B regulirano nizom koordiniranih mehanizama (Pereira i sur., 2021). Zahtjevi za B su različiti za svaku biljnu vrstu, a potrebe za ovim mikroelementom razlikuju se i na razini genotipa iste vrste (Takano i sur., 2008; Yoshinari i Takano, 2017). Biljke usvajaju B u obliku borne kiseline i u pojedinim slučajevima boratnog aniona. Pasivna difuzija borne kiseline korijenom uglavnom zadovoljava potrebe biljke za B, kada je biljci dostupna potrebna koncentracija B (Yoshinari i Takano, 2017). Biljka usvaja B u navedena dva oblika, a B je u biljci primarno zastupljen kao borna kiselina. Niska koncentracija boratnog aniona u staničnom citosolu posljedica je formiranja kompleksnijih spojeva između B i drugih metabolita (Broadley i sur., 2012).

Nedostatak B učestala je pojava u maslinarskoj proizvodnji (Tsadilas, 2004), dok je suvišak B ograničen na manji dio proizvodnih područja (Chatzissavvidis i Therios, 2010). Nedostatak B uzrokuje sušenje vršnog izbojka, rast izbojka u obliku rozete, rubnu klorozu lista, nepravilno odvijanje oplodnje i deformaciju ploda (Martelli, 1999). Uzgoj masline moguć je i pri višim koncentracijama B, dostupnima u tlu ili vodi za navodnjavanje. Dugotrajniji utjecaj primjene viših koncentracija B u ishrani masline nije dovoljno istražen i simptomi toksičnosti B tek su manjim dijelom poznati (Chatzissavvidis i sur., 2004). Tome doprinosi tolerantnost masline i drugih voćnih vrsta, primjerice jabuke i vinove loze, na više koncentracije B koja je osigurana visokom mobilnošću B unutar jednog i između različitih vegetativnih organa (Lewis, 1980 a,b; Chatzissavvidis i sur., 2004; Pereira i sur., 2021).

Primjena viših koncentracija B negativno utječe na porast masline, razvoj lista i postranih izbojaka (Chatzissavvidis i Therios, 2010). Iako se simptomi toksičnosti rijetko javljaju u proizvodnim uvjetima, moguć je razvoj rubne kloroze lista, opadanja listova te smanjenog zametanja ploda masline (Benlloch i sur., 1991; Failla i sur., 2008). Istraživanja provedena na drugim kulturama ukazuju da je granica koja odjeljuje nedostatak od toksičnosti B u biljkama vrlo uska (Landi i sur., 2019).

Pretpostavlja se da je smanjeno usvajanje i prijenos B iz korijena u nadzemne dijelove jedan od mehanizama tolerantnosti kojim biljka nastoji spriječiti toksičan učinak ovog mikroelementa (Landi i sur., 2019). Nakon usvajanja B korijenom, transpiracija potpomaže prijenos B ksilemom do lista. Dinamika B razlikuje se između biljnih vrsta, koje dijelimo na one gdje je B slabo (primjerice orah) odnosno visoko (primjerice maslina) mobilan (Lewis, 1980 a,b; Brown i Hu, 1998; Brown i sur., 2002). Poznato je nekoliko mehanizama tolerantnosti kojima biljke reguliraju više koncentracije B, među kojima Landi i sur. (2019) ističu sljedeće: reducirano usvajanje i prijenos B iz korijena u ostale dijelove biljke, povećana biosinteza organskih spojeva koji stvaraju komplekse s B (polioli, fenolni spojevi, poliamini), biosinteza antioksidansa koji reguliraju B izazvan oksidativni stres te pohrana B u stanične organele, poput vakuole, ili druge dijelove stanice, poput stanične stijenke. Razumijevanje mehanizama koji reguliraju ravnotežu B u biljci značajno je kako bi se pojasnile nastale fiziološke promjene u biljkama (Takano i sur., 2008), ali i odgovorilo na potrebe maslinarske proizvodnje za ovim mikroelementom.

Funkcija B kao esencijalnog biogenog elementa do danas nije u potpunosti razjašnjena zbog nedostatka metoda kojima bi se odredila niska koncentracija B u stanici, tendencije B da formira reverzibilne komplekse s drugim spojevima (polioli, fenolne kiseline, amini) te nedostatka radioaktivnih izotopa B koji bi omogućili praćenje kretanja B u različitim biljnim vrstama (Broadley i sur., 2012). Nedostatak B uzrokuje cijeli niz biokemijskih, fizioloških i strukturnih promjena i kaskadnih reakcija koje dodatno otežavaju definiciju njegove primarne uloge u biljkama (Bolaños i sur., 2004; Broadley i sur., 2012). Bor sudjeluje u vegetativnom razvoju biljke, odrvenjavanju, strukturi i funkciji stanične membrane, organizaciji i biosintezi stanične stijenke, metabolizmu i prijenosu ugljikohidrata, metabolizmu N i fenolnih spojeva, metabolizmu indol-3-octene kiseline, metabolizmu RNA i staničnom disanju (Bolaños i sur., 2004; Broadley i sur., 2012; Pereira i sur., 2021).

Uravnotežena gnojidba B može povećati ili smanjiti tolerantnost biljke na razvoj i progresiju biljnih bolesti. Istraživanja provedena na drugim višegodišnjim vrstama ukazuju da B ima značajnu ulogu u sprječavanju širenja i smanjenju intenziteta infekcije različitih patogena vaskularnog tkiva (Rolshausen i Gubler, 2005; Dong i sur., 2016). Čimbenici koji utječu na interakciju između pojedinog elementa, biljke domaćina i patogena još su uvijek uglavnom nepoznati (Tripathi i sur., 2022). Modifikacijom koncentracije pojedinačnog elementa

moguće je izmijeniti tolerantnost biljke na patogena aktivacijom enzima uključenih u biosintezu konstitutivnih fenolnih spojeva, odnosno indirektnim utjecajem na aktivnost patogena, modifikacijom eksudata korijena te rizosfernog pH (Datnoff i sur., 2007). Uloga B u tolerantnosti masline na uzročnike gljivičnih bolesti ostaje tek djelomično razjašnjena. Primjena B ima prethodno utvrđen učinak na koncentraciju fenolnih spojeva masline, a isto vrijedi i za protugljivični učinak fenolnih spojeva na *V. dahliae* (Markakis i sur., 2010; Gharbi i sur., 2017; Drais i sur., 2021). Može se pretpostaviti da bi promjene u metabolizmu fenolnih spojeva nastale kao posljedica primjene B (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005; Pasković i sur., 2019), mogle doprinijeti većoj tolerantnosti masline na *V. dahliae* (Báidez i sur., 2007). Navedena pretpostavka do danas nije u potpunosti istražena.

### 2.3. Fenolni spojevi

Biljke sintetiziraju mnoštvo različitih spojeva male molekulske mase koji nastaju metaboličkim putevima primarnog i sekundarnog metabolizma. Sekundarni metabolizam je termin koji je u prošlosti korišten da bi se opisala neesencijalnost takvih spojeva u biljkama, a istraživanja koja su uslijedila dokazala su njihovu neophodnost u odvijanju životnog ciklusa biljaka (Pichersky i Gang, 2000; Vogt, 2010). Navedena se podjela održala, ali esencijalnost fenolnih spojeva je danas neupitna. Fenolni spojevi su vrlo raznolika skupina aromatskih organskih spojeva, a prepoznatljivi su po hidroksilnoj skupini vezanoj na benzenski prsten. Fenolni spojevi mogu se podijeliti u dvije veće skupine koje obuhvaćaju fenolne spojeve jednostavnije strukture te polifenole čija je struktura složenija i sastoji se od najmanje dvije fenolne grupe. Postojanje dviju ili više fenolnih grupa, koje se sastoje iz hidroksilne skupine i fenolnog prstena, nije dovoljno kako bi se odredila pripadnost određenog spoja skupini polifenola. Naime, termin (poli)fenol se primjenjuje u definiciji spojeva koji su nastali putem šikiminske kiseline, a koji se zatim nastavlja na fenilpropanoidni put, odnosno spojeva nastalih poliketidnim putevima kojima pripadaju putevi jabučne i mevalonske kiseline (Quideau i sur., 2011).

Aminokiselina fenilalanin je u višim biljkama primarni supstrat u fenilpropanoidnom putu, dok je tirozin manje značajan i zastupljen je tek u pojedinim vrstama (De La Rosa i sur., 2009; Vogt, 2010). Zajednički naziv fenilpropanoidi koristi se za fenolne spojeve nastale katalizom jednog od opisanih međuprodukata (De La Rosa i sur., 2009). Flavonoidni put se nastavlja na fenilpropanoidni, dok sekoiridoidni konjugati nastaju iz međuprodukata metabolizma fenolnih spojeva i terpena (Volk i sur., 2019).

Fenolni spojevi su neophodni u morfološkoj i biokemijskoj prilagodbi biljke na okolišne čimbenike. Sastav i koncentracija fenolnih spojeva u viših biljaka rezultat je dugotrajnih i kompleksnih procesa evolucije i koevolucije (Boudet, 2007). Koordinacija biosinteze

fenolnih spojeva odvija se mehanizmima kojima biljke precizno kontroliraju nastanak specifičnih metabolita u točno određenom trenutku i na točno određenom mjestu (Pichersky i Gang, 2000). Uloga fenolnih spojeva u fiziologiji biljaka nije u potpunosti jasna, a postoji pretpostavka da navedena skupina spojeva sudjeluje u rastu i metaboličkim putevima biljke. Različitostrukturalna ova skupina spojeva daje naslutiti da njihova uloga u regulaciji rasta i razvoja biljaka nije univerzalna. Postoji mogućnost da su mnogobrojne fiziološke interakcije između fenolnih spojeva i biljaka slučajne i posljedica su svestrane uloge ovih spojeva u obrambenim mehanizmima biljke (Ruiz i Romero, 2001).

Fenilpropanoidi su uključeni u različite aspekte rasta biljke, strukturne su komponente staničnih stijenki i dio su obrambenog odgovora biljke na vanjske podražaje (Buchanan i sur., 2015). Fenilpropanoidi imaju značajnu ulogu u obrambenom odgovoru na promjene u intenzitetu svjetlosti i nedostatku hraniva (Clemens i Weber, 2016; Yang i sur., 2018). Interakcija između biljke i okoline, uključujući druge biljke ili ostale organizme, pod utjecajem je fenolnih spojeva (Biała i Jasiński, 2018). Fenolni spojevi iz skupine flavonoida štite biljke od štetnog UV zračenja (Buchanan i sur., 2015).

Istraživanja o biosintetskim putevima fenolnih spojeva u maslini vrlo su ograničena zbog smanjenog transporta vode koji otežava njihovo istraživanje. Veliki dio istraživanja provodi se na srodnim vrstama rodova *Fraxinus* i *Syringa* te se putevi biosinteze, otkriveni u vrstama navedenih rodova, često poistovjećuju s maslinom (Damtoft i sur., 1995 a,b; Obied i sur., 2008). Upravo to navodi na oprez jer su putevi biosinteze ili katabolizma fenolnih spojeva masline tek djelomično poznati. Osim što je mjesto biosinteze fenolnih spojeva specifično, mjesta skladištenja također mogu biti specifična za pojedine fenolne spojeve pa koncentracija fenolnih spojeva može biti vrlo slična ili različita između pojedinih sorata i različitih vegetativnih organa masline (Ryan i sur., 2002; Alagna i sur., 2012; Guodong i sur., 2019). U korijenu, izbojku i listu masline u različitoj su mjeri zastupljeni različiti (poli)fenoli iz skupina jednostavnih fenola (tirozol, hidroksitirozol), fenolnih kiselina (hidroksicimetna kiselina, kavena kiselina, verbaskozid), flavonoida (apigenin, apigenin-7-O-glukozid, rutin, katehin, luteolin, luteolin-7-O-glukozid) i sekoiridoida (oleuropein, aglikoni oleuropeina) (Ortega-García i Peragón, 2010; Talhaoui i sur., 2015; Mechri i sur., 2019; Vidović i sur., 2021). Novija istraživanja navode da fenolni sastav izbojka i lista masline čini više od 50 različitih spojeva i njihova se koncentracija značajno razlikuje između navedenih vegetativnih organa masline (Ammar i sur., 2017). U odnosu na korijen i izbojak, koncentracija fenolnih spojeva lista je bolje istražena, a oleuropein se često navodi kao najzastupljeniji fenolni spoj u listu masline (Ryan i sur., 2002; Talhaoui i sur., 2015).



### 2.3.1. Utjecaj dušika na koncentraciju fenolnih spojeva

Dušik nema direktnu ulogu u metabolizmu fenolnih spojeva, ipak različit utjecaj N na koncentraciju fenolnih spojeva zabilježen je u mnogim kulturama (Fernández-Escobar i sur., 2006; Giorgi i sur., 2009; Verardo i sur., 2013). Nedostatak N ne utječe negativno samo na rast i razvoj, već utječe i na promjene u primarnom i sekundarnom metabolizmu biljke (Scheible i sur., 2004). U N-izgladnjelim biljkama, koncentracija aminokiselina i ukupnih proteina se znatno smanjuje, dok koncentracija fenolnih spojeva raste. Različiti okolišni stresovi, u koje se ubraja i nedostatak N, mogu utjecati na povećanu biosintezu reaktivnih kisikovih vrsta. Biljke su razvile kompleksne enzimske i ne-enzimske mehanizme detoksikacije kako bi se zaštitile od oksidacijskog stresa (Giorgi i sur., 2009). U tom kontekstu, fenolni spojevi vežu slobodne radikale i ostale kisikove vrste kako bi spriječili njihov negativan učinak na razvoj biljaka (Grace i Logan, 2000). Rast ukupne koncentracije fenolnih spojeva osiguran je povećanom aktivnošću enzima PAL, koja zauzvrat osigurava ravnotežu biljne stanice (Giorgi i sur., 2009).

Primjena viših koncentracija N značajno utječe na vegetativni porast i premještanje ugljika u primarne strukture biljke, a odvija se nauštrb biosinteze fenolnih spojeva (Heimler i sur., 2017). Biosinteza fenolnih spojeva i aminokiselina odvija se putem šikiminske kiseline, pri čemu nastaje kompeticija između biosinteze proteina i fenolnih spojeva zbog veće dostupnosti N (Tekaya i sur., 2016). Iz navedenih razloga postoji negativna korelacija između koncentracije N i fenola u biljnim vegetativnim organima (Haukioja i sur., 1998; Erel i sur., 2013).

Glavnina istraživanja posvećena je učinku N na fenolne spojeve ploda masline i maslinovih ulja (Erel i sur., 2013), a istraživanja na drugim biljnim vrstama ukazuju na negativan utjecaj prekomjerne gnojidbe N na sastav i koncentraciju fenola korijena, izbojka i lista (Keski-Saari i Julkunen-Tiitto, 2003; Kováčik i sur., 2007; Larbat i sur., 2014).

### 2.3.2. Utjecaj bora na koncentraciju fenolnih spojeva

Biljke nizom biokemijskih mehanizama mogu osigurati homeostatsku reakciju, odnosno uravnotežen kemijski odgovor, između koncentracije usvojenog B i biosinteze metabolita kojim ga neutraliziraju (Landi i sur., 2019). Bor indirektno sudjeluje u metabolizmu fenola, a odnos između koncentracije B i fenolnih spojeva u biljkama nije linearan. Biljci optimalna koncentracija B može smanjiti aktivnost enzima PAL i time koncentraciju fenolnih spojeva, a potaknuti aktivnost enzima polifenol oksidaze i peroksidaze (Ruiz i sur., 1998). Nedostatak i suvišak B dovode do neuravnoteženog homeostatskog odgovora (Landi i sur., 2019), stoga se u oba slučaja koncentracija fenolnih spojeva povećava (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005).

Nedostatak B može povećati koncentraciju fenolnih spojeva, što je posljedica izraženijeg nakupljanja fenola u postojećim staničnim strukturama ili direktnog utjecaja na metaboličke procese koji dovode do biosinteze fenolnih spojeva *de novo* (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005). Lignin je složeni polimer i sastavni je dio staničnih stijenki kojima daje čvrstoću (Whetten i Sederoff, 1995). Ograničenim porastom biljke, uslijed nedostatka B, indirektno je reducirana biosinteza prekursora lignina, a potaknuta aktivnost enzima PAL. Samim time koncentracija fenolnih spojeva u biljnom tkivu raste (González-Fontes, 2020). Druga pretpostavka je da metabolički put pentoza-fosfata postaje aktivniji nedostatkom B čime je biosinteza fenolnih spojeva stimulirana (Shkolnik, 1984).

### **2.3.3. Utjecaj fenolnih spojeva na tolerantnost biljaka na patogene**

Brojna istraživanja potvrđuju da fenolni spojevi značajno doprinose tolerantnosti biljaka na infekcije različitim patogenim organizmima (Talhaoui i sur., 2015; Mauch-Mani i sur., 2017; Kumar i sur., 2020). Zbog konstitutivne prirode fenolnih spojeva njihov utjecaj na tolerantnost biljke može biti indirektan. Biosinteza *de novo* ili translokacija fenolnih spojeva na mjesto infekcije, u trenutku njezina nastanka, svakako potvrđuje njihovo aktivno sudjelovanje u obrambenom odgovoru biljke. Podjela fenolnih spojeva na fitoaleksine i fitoanticipine je složena (Kuč, 1995). Metaboličke promjene, koje se odvijaju u interakciji biljke i patogena, kompleksne su i zahtijevaju primjenu složenijih analitičkih metoda koje su često nedovoljno osjetljive. Istraživanja specifične uloge pojedinačnih fenolnih spojeva u obrambenim mehanizmima biljke i njenoj tolerantnosti na određene patogene vrste zahtijevaju detekciju fenolnih spojeva u niskim koncentracijama na mjestu infekcije, a važna su i za razlučivanje stupnja specifičnosti njihove uloge u biljci (Nicholson i Hammerschmidt, 1992).

Fenolni spojevi posjeduju mnogobrojne konstitutivne funkcije i njihova se koncentracija mijenja uslijed fizioloških promjena u biljci. Jednostavniji fenolni spojevi tvore komplekse sa šećernim komponentama i organskim kiselinama, a značajne su tvorbene jedinice složenih polimera kao što su hidrolizabilni lignini (Toledano i sur., 2013; Acosta-Estrada i sur., 2014). Biosinteza lignina doprinosi većoj tolerantnosti sorata masline, kao što su Leccino ili Frantoio, prema gospodarski značajnim patogenima kao što je *V. dahliae* (Cardoni i sur., 2021; Ramírez-Tejero i sur., 2021). Stoga se koncentracija jednostavnih fenolnih spojeva može mijenjati kao posljedica porasta masline uslijed fizioloških promjena ili potrebe da navedene spojeve ugradi u svoje membrane i tako spriječi daljnji prodor patogena. Fenolni spojevi koji pripadaju skupini flavonoida mogu stimulirati ili inhibirati klijavost spora i rast hifa različitih patogenih vrsta (Agosteo i sur., 2015; Tian i sur., 2015).

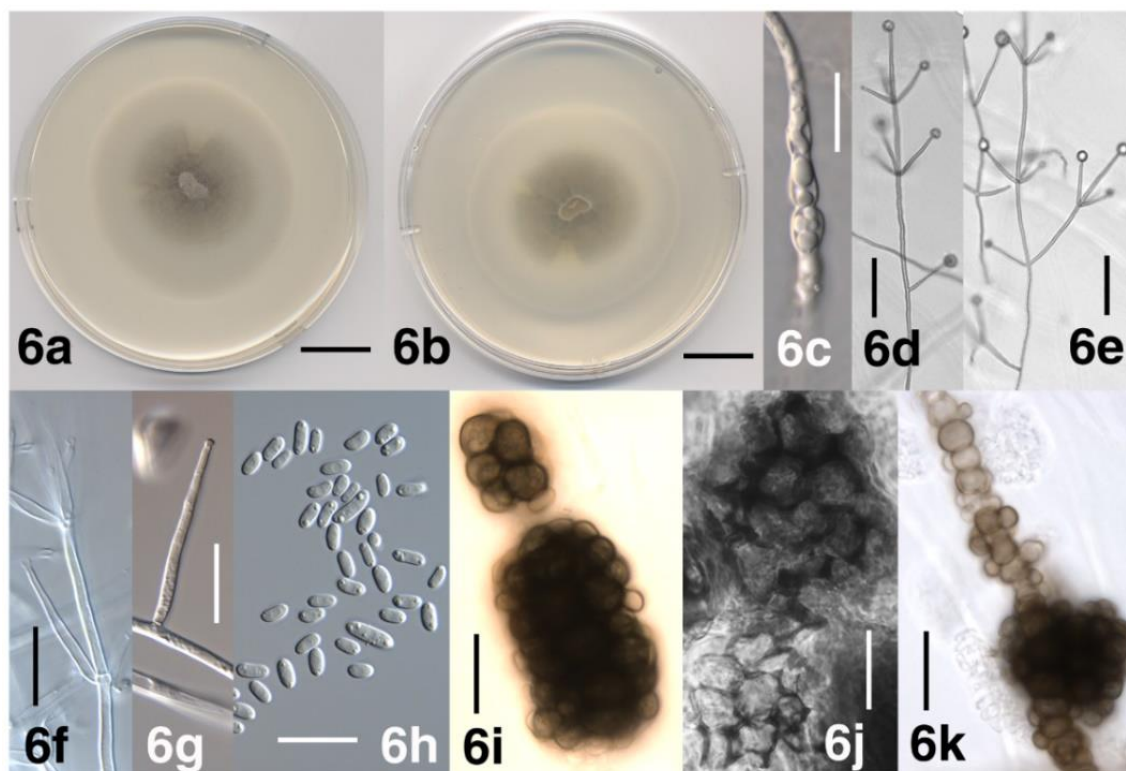
## 2.4. *Verticillium dahliae*

### 2.4.1. Taksonomska pripadnost i morfološke karakteristike

Rodu *Verticillium* Nees (*Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellales; Plectosphaerellaceae*) pripada nekoliko kozmopolitskih vrsta askomicetnih gljiva. Pojedine vrste su značajni biljni patogeni koji uzrokuju djelomično ili potpuno sušenje biljaka (Barbara i Clewes, 2003; Klosterman i sur., 2009). U navedenom se rodu, zbog šteta koje pričinjava različitim kulturama, ističe vrsta *V. dahliae* (Pegg i Brady, 2002; Cvjetković, 2010; Ivić i Ivanović, 2012). Navedena vrsta obitava u tlu gdje može dulji niz godina preživjeti u obliku trajnih struktura, mikrosklerocija (Klosterman i sur., 2009). Biljke domaćini vrste *V. dahliae* su taksonomski vrlo raznolike i ne obuhvaćaju samo ekonomski značajne poljoprivredne kulture (Klosterman i sur., 2009; Ivić i Ivanović, 2012).

Rod *Verticillium* je utemeljio Nees von Essenbeck nakon što je uočio novu vrstu koja ima konidiofore s verticilatno raspoređenim fialidama na konidioforu – Slika 1, 6 f i 6 g (Pegg i Brady, 2002; Klosterman i sur., 2009). Fialide vrste *V. dahliae* mogu biti različitih dimenzija. Fialide su ponekad sekundarno razgranate, a na njihovim se vrhovima pojedinačno formiraju elipsoidni do cilindrični konidiji (Slika 1, 6 h). Konidiji ove vrste su bezbojni i jednostanični (Cvjetković, 2010). Kolonija *V. dahliae* je bijele boje na hranjivoj podlozi PDA i modificiranoj hranjivoj podlozi MSEA (eng. Modified soil extract agar), na kojima može biti radijalnog, raspršenog i intermedijalnog oblika (Termorshuizen i sur., 2003; Inderbitzin i sur., 2011). Na naličju je kolonija svijetlo ili tamno obojena, prisutne su ili odsutne pigmentacije žute-narančaste boje. Micelij *V. dahliae* može biti obilan, pahuljast, prorijeđen i pruinozan, kompaktno-prilijepljen za agar ili naizgled natopljen vodom na hranjivoj podlozi PDA (Inderbitzin i sur., 2011; Yu i sur., 2016). Brzina porasta micelija na hranjivoj podlozi PDA razlikuje se između izolata *V. dahliae*, pa primjerice pri uvjetima temperature 23 – 25 °C i 24 h tame dnevni porast micelija prosječno iznosi 1,9 – 3,66 mm/dan (Kaliterna i sur., 2016; Varo i sur., 2016). Formiranjem brojnih mikrosklerocija, kolonija postupno poprima tamnu boju – Slika 1, 6 a i 6 b (Cvjetković, 2010; Chen i sur., 2021). Mikrosklerociji nisu uvijek prisutni, a mogu biti uronjeni u agar te pravilno ili nepravilno raspoređeni po koloniji (Inderbitzin i sur., 2011; Yu i sur., 2016). Mikrosklerociji se razvijaju prosječno nakon 10 – 12 dana inkubacije na različitim hranjivim podlogama, a utjecaj temperature na njihov razvoj literaturno nije opisan (Varo i sur., 2016). Mikrosklerociji su trajne strukture, a svaki se mikrosklerocij razvija na jednoj hifi učestalim pupanjem – Slika 1, 6 i – 6 k (Cvjetković, 2010; Inderbitzin i sur., 2011). Mikrosklerociji mogu biti različitog oblika i veličine, pigmentirani su – Slika 1, 6 i – 6 k (Klosterman i sur., 2009; Chen i sur., 2021). Mikrosklerociji se sastoje od okruglih, smeđe pigmentiranih stanica promjera do 13 µm. Mikrosklerociji mogu biti

okruglasto do izduženog odnosno nepravilnog oblika s prosječnim promjerom u rasponu od 25 do 100  $\mu\text{m}$  (Inderbitzin i sur., 2011). Do sada nije potvrđen teleomorfni (spolni) stadij vrste *V. dahliae* (Klosterman i sur., 2009).



Slika 1. Micelij, mikrosklerociji, konidiofori i konidiji vrste *Verticillium dahliae*

Pojašnjenje oznaka: Zračni micelij kolonije (6 a, b); pupanje stanica micelija (6 c); konidiofori (6 d, e); filialida (6 f, g); konidiji (6 h); mikrosklerociji (6 i – k). Razvoj na hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar: 6 h – nakon 9 dana; 6 a, b, g – nakon 14 dana; 6 c – nakon 28 dana; 6 k – nakon 49 dana. Razvoj na prilagođenoj hranjivoj podlozi vodeni agar: 6 i – nakon 12 dana; 6 d – nakon 15 dana. Razvoj mikrosklerocija na biljnom materijalu – 6j. Skala: 6a, 6b = 2 cm; 6c, 6f – 6k = 20  $\mu\text{m}$ ; 6d, 6e = 50  $\mu\text{m}$ . Izvor: Inderbitzin i sur., 2011.

Prijašnja je taksonomska podjela poistovjećivala vrste *V. dahliae* i *Verticillium longisporum* (C. Stark) Karapapa, Bainbr. & Heale. Vrsta *V. longisporum* je naknadno izdvojena kao zasebna zbog različitih morfoloških i bioloških karakteristika u odnosu na *V. dahliae* (Barbara i Clewes, 2003; Inderbitzin i sur., 2013). U bazi NCBI trenutno je dostupno 118 projekata i 867 bioloških uzoraka kojima se istraživao *V. dahliae*, a količina informacija neprekidno raste što govori u prilog sve većem interesu za istraživanjem ovog organizma.

#### 2.4.2. Populacijska struktura

Populacijskom strukturom obuhvaćene su vegetativne kompatibilne grupe, podjela vrste *V. dahliae* na defolijacijske i nedefolijacijske izolate, rase i klonske linije (Jiménez-Díaz i sur., 2012; Chen i sur., 2021).

Simptomi koje pričinjava *V. dahliae* mogu se značajno razlikovati između različitih biljnih vrsta, a uključuju sušenje lista, klorozu lista, otpadanje lista, zaostatak u porastu biljke, vaskularna obojenja i nekrozu (Fradin i Thomma, 2006). Pojavnost simptoma otpadanja

lista (defolijacije) omogućila je podjelu izolata iz populacije *V. dahliae* na defolijacijske i nedefolijacijske (Jiménez-Díaz i sur., 2012, Ivić i Ivanović, 2012; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Vrsta *V. dahliae* izrazito je polifagna, ali simptome defolijacije pričinjava tek na nekoliko biljnih vrsta u koje se ubraja i maslina (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Simptomi defolijacije razvijaju se na drvenastim biljnim vrstama s visokom lignifikacijom izbojka, a dosadašnja istraživanja ukazuju da defolijacijski fenotipovi izostaju na zeljastim vrstama (Chen i sur., 2021). Mnogo je nepoznanica koje se nadovezuju na pojavnost navedenih simptoma, a dosadašnja istraživanja nisu u potpunosti odgovorila na moguće čimbenike koji utječu na razvoj istih.

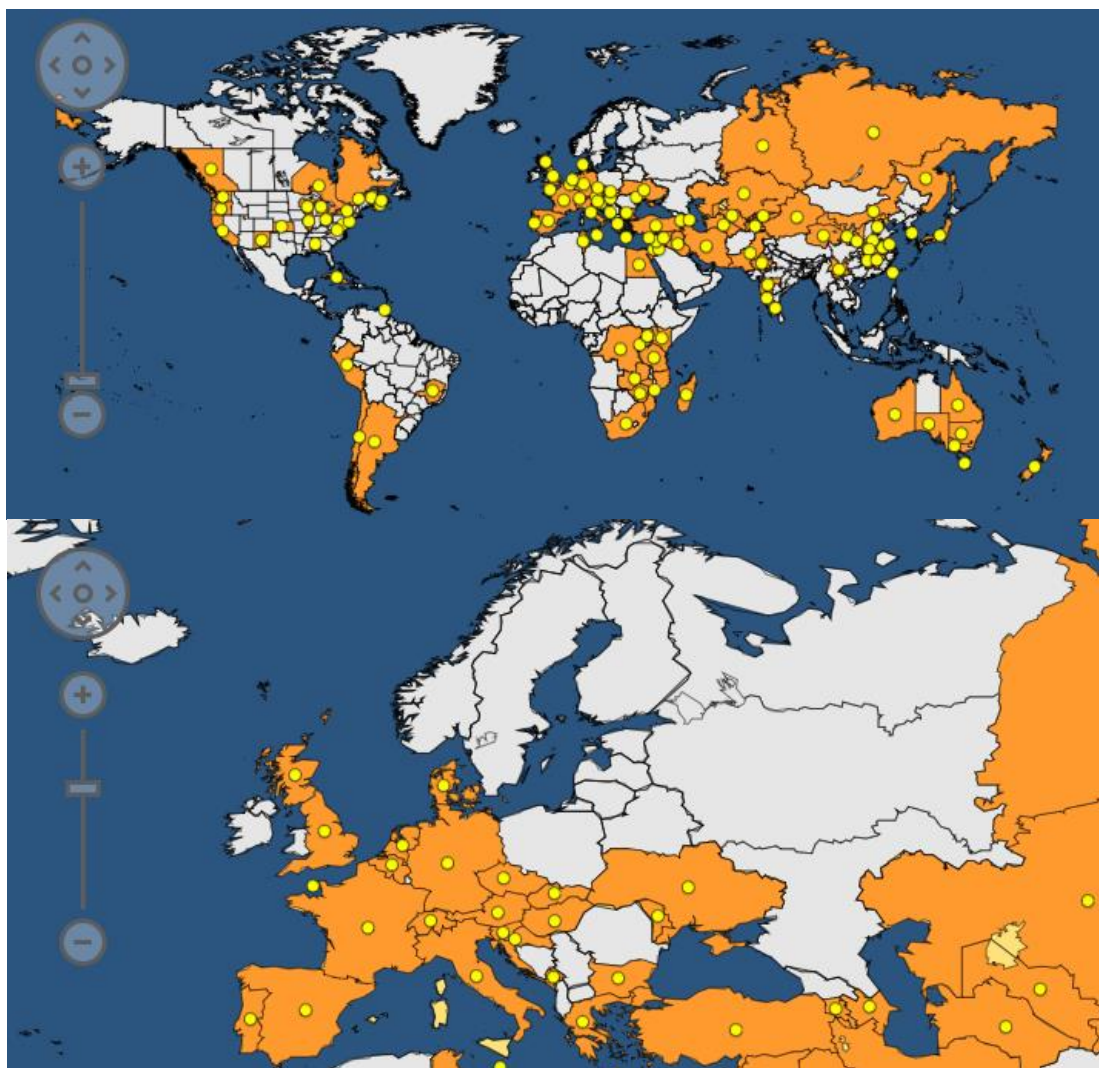
Trenutno je poznato šest vegetativnih kompatibilnih grupa (VCG), od kojih su neke dodatno podijeljene u manje podgrupe, kojima pripadaju različiti izolati ove vrste (Klosterman i sur., 2009; Chen i sur., 2021). Na maslini je opisan veći broj izolata vrste *V. dahliae*, za koje je utvrđena pripadnost grupama VCG1 (VCG1A), VCG2 (VCG2A, VCG2B) i VCG4 (VCG4B) (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Izolati koji uzrokuju defolijaciju pripadaju podgrupi VCG1A, dok izolati koji ne uzrokuju defolijaciju pripadaju ostalim vegetativnim grupama (Chen i sur., 2021). Kada su u pitanju izolati determinirani na maslinama s područja Mediterana, populacijska struktura ima malu raznolikost (Jiménez-Díaz i sur., 2012). Primjena VCG je korisna pri opisivanju populacijske strukture *V. dahliae*, ali njihova korelacija s virulentnošću ili ostalim biološkim karakteristikama vrste *V. dahliae* je niska (Chen i sur., 2021), stoga je s agronomskog aspekta njihov značaj manji.

Klonske linije mogu imati visoku ili nisku povezanost sa specifičnim VCG (Chen i sur., 2021). Klonskoj liniji I pripada vegetativna grupa VCG1, dok u klonsku liniju II, III i VIII pripada VCG2B, a u klonsku liniju V pripadaju VCG2A i VCG4B (Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020; Chen i sur., 2021). Iako su poznate i druge klonske linije, navedene su one u koje pripadaju izolati determinirani na maslini. Vrijedno je istaknuti da su istraživanja ovog oblika još uvijek u začetima i da vrlo često pružaju tek djelomične informacije koje nije moguće jasno povezati s biologijom ili patogenošću vrste.

Genetska otpornost prema verticilijskom venuću opisana je na nekoliko biljnih vrsta, ali nije podjednako istražena za svaku biljnu vrstu (Klosterman i sur., 2009). Genetskom analizom otpornosti rajčice na *V. dahliae* opisan je jedan dominantni alel koji je nositelj otpornosti (Zhang i sur., 2015). Navedeno je istraživanje omogućilo podjelu sojeva *V. dahliae* na rasu 1 i rasu 2 (Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Kasnije je utvrđena i rasa 3, dok ostale rase nisu dovoljno istražene i nisu u potpunosti prihvaćene. Izolati *V. dahliae* koji pripadaju VCG1A i defolijacijskim fenotipovima nemaju dodijeljenu rasu. Izolati vegetativnih grupa VCG2B, VCG2A i VCG2B pripadaju rasi 1 i rasi 2, dok ostalima nije dodijeljena pripadnost određenoj rasi (Chen i sur., 2021).

### 2.4.3. Rasprostranjenost vrste

Smatra se da je *V. dahliae* glavni predstavnik roda *Verticillium* i primarni uzročnik verticilijskog venuća, bolesti koja se razvija u području umjerene i suptropske klime (Pegg i Brady, 2002). Vrsta je široko rasprostranjena u svijetu, a potvrđena je i u većini zemalja na području Europske unije (Slika 2). Na mediteranskom uzgojnom području masline, ova je vrsta utvrđena u Hrvatskoj, Italiji, Španjolskoj, Francuskoj, Grčkoj, Turskoj, Maroku, Izraelu, Alžiru, Jordanu, Malti i Siriji (Jiménez-Díaz i sur., 2012; Kaliterna i sur., 2016).



Slika 2. Rasprostranjenost vrste *Verticillium dahliae*

Područja u kojima je potvrđena vrsta *V. dahliae* označena su narančastom bojom i žutim krugom, dok su područja u kojima *V. dahliae* nije utvrđen označena sivom bojom. Izvor: EPPO – EPPO Global Database, (preuzeto s: <https://gd.eppo.int/taxon/VERTDA/distribution>)

Učestalost i intenzitet razvoja verticilijskog venuća u navedenim su uzgojnim područjima vrlo raznoliki, a dostupni su podaci vrlo često nepotpuni zbog nekontinuiranog i neujednačenog praćenja verticilijskog venuća na razini većeg broja maslinarskih regija. Na području Grčke zahvaćeno je 10 – 50% maslina uzgajanih na područjima gdje je prethodno prevladavao pamuk, dok se za područje Španjolske navodi učestalost zaraze od 39 – 71%.

Znatno manja zastupljenost ove bolesti utvrđena je na području Turske (3,1%), Sirije (do 4,5%), Alžira (12%), Maroka (10 – 30%) te Italije (18,3%) (Jiménez-Díaz i sur., 2012). Iako je u navedenim područjima sveukupna učestalost verticilijskog venuća masline manja, ipak u prethodno navedenim istraživanjima uočeno je da patogen nakon unosa zahvaća gotovo cijeli nasad i vrlo često dovodi do njegovog propadanja.

#### 2.4.4. Simptomi i štetnost verticilijskog venuća

Simptome verticilijskog venuća su po prvi puta opisali Reinke i Berthold na krumpiru (*Solanum tuberosum* L., *Solanaceae*) još 1879. godine, kada su izolirali i determinirali vrstu *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold (Pegg i Brady, 2002; Klosterman i sur., 2009). Tek je 1913. godine, na venućem zahvaćenim biljnim vrstama roda *Dahlia* Cav. (*Asteraceae*, *Asteroidae*), Klebahn izolirao i opisao vrstu *V. dahliae* (Barbara i Clewes, 2003; Klosterman i sur., 2009). Simptomi venuća su literaturno opisani terminima *zeleno venuće*, *verticiliozno venuće* ili *začepljenje provodnih snopova* na mnogobrojnim kulturama (Cvjetković, 2010; Ivić i Ivanović, 2012). Verticilijsko venuće je na maslini prvi puta zabilježeno u Italiji (Ruggieri, 1946), a kasnije su uslijedili opisi ove bolesti i u ostalim maslinarskim regijama na području Mediterana (Jiménez-Díaz i sur., 2012). Iako je ranije iznesena sumnja da je *V. dahliae* prisutan na maslini i na području Republike Hrvatske (Ivić i Ivanović, 2012), vrsta je tek nekoliko godina kasnije po prvi puta izolirana i molekularno determinirana (Kaliterna i sur., 2016). Navedene su pretpostavke u skladu s ostalim grupama autora (Jiménez-Díaz i sur., 2012), koji navode da je *V. dahliae* pričinjavao štete i u ostalim maslinarskim regijama na području Mediterana mnogo ranije u odnosu na prve izolacije i determinacije ove vrste.

Fenotipska plastičnost vrste *V. dahliae* dodatno doprinosi njezinoj virulentnosti (Klosterman i sur., 2009). Značajne štete zabilježene su na više od 200 biljaka domaćina, kojima pripadaju različite jednogodišnje i višegodišnje kulture, ali i krajobrazno značajne vrste (Pegg i Brady, 2002). U literaturi je dostupno nekoliko preglednih radova kojima su opisani mnogobrojni aspekti verticilijskog venuća masline (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Mercado-Blanco i López-Escudero, 2012; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020; Kowalska, 2021).

Kompleksna i evolucijski dugotrajna interakcija između masline i *V. dahliae* doprinijela je velikom broju nepoznanica koje su, kod navedene biljne vrste, tek dijelom istražene na metaboličkoj razini i na razini genoma (Leyva-Pérez i sur., 2018; Jiménez-Ruiz i sur., 2019; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Pretpostavlja se da je na interakciju između masline i *V. dahliae* dodatno utjecala pojavnost visoko virulentnih defolijacijskih izolata te primjena različitih uzgojnih praksa koje su doprinijele širenju patogena i propadanju stabala masline (Rodríguez i sur., 2011; Pérez-Rodríguez i sur., 2015).



Razvoj verticilijuskog venuća na maslini može izazvati različite simptome, koji dalje ovise o osjetljivosti sorte, starosti masline, uzgojnim uvjetima i virulentnosti izolata *V. dahliae* – Slika 3 (Yadeta i Thomma, 2013; Keykhasaber i sur., 2018; Trapero i sur., 2018). Razvoj simptoma može biti akutan ili kroničan; dok u prvom slučaju simptomi nastupaju u vrlo kratkom roku, kod drugog se intenzitet simptoma razvija postupno i raste tijekom nekoliko godina (Cvjetković, 2010). Mlada stabla masline su podložnija propadanju i potpunom sušenju, a simptomi se na području Mediterana razvijaju krajem zime ili početkom proljeća. Na starijim stablima masline razvoj simptoma verticilijuskog venuća je uglavnom postepen; simptomi prvo zahvaćaju manji dio krošnje i postepeno se šire na druge dijelove (Ivić i Ivanović, 2012). Osim izravnom progresijom u biljnom tkivu, *V. dahliae* dovodi do razvoja navedenih simptoma zbog oslobađanja toksičnih metabolita u biljno staničje. Navedeni toksini mogu inducirati niz fizioloških promjena i utjecati na transpiraciju, integritet stanične stijenke i puteve biosinteze sekundarnih metabolita ključnih za pravilno djelovanje obrambenih mehanizama biljke (Bruno i sur., 2020). Izlučeni toksini imaju dvojnu funkciju, a to su uklanjanje mehaničke barijere biljke domaćina putem enzimskih aktivnosti i manipuliranje modifikacija obrambenih mehanizama biljke korištenjem efektora (Chen i sur., 2021). Efektori su specifični proteini koje patogen oslobađa, a koji utječu na, te većim ili manjim dijelom sprječavaju, razvoj obrambenog odgovora biljke domaćina (de Jonge i sur., 2011). Toksini i efektori doprinose virulentnosti izolata *V. dahliae* (Chen i sur., 2021). Najzamjetniji simptom verticilijuskog venuća je sušenje lišća masline. Ovisno o izolatu koji zahvaća određeno uzgojno područje masline, simptomi lista razlikuju se kod defolijacijskih i nedefolijacijskih izolata *V. dahliae*. Listovi se prvo uvijaju prema naličju, postaju klorotični te postepeno i nekrotični (Ivić i Ivanović, 2012). Osušeni listovi masline ne otpadaju sa stabla masline. Navedeni je simptom tipičan za izolate koji ne uzrokuju defolijaciju masline (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). Kod izolata koji uzrokuju defolijaciju, zeleni list otpada ili razvija klorozu pri bazi izbojka (Ivić i Ivanović, 2012). Pored sušenja listova, moguća je nekroza cvata i ploda masline (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Trapero i sur., 2011). Osim ekonomskih šteta koje se odnose na sušenje ili otpadanje plodova i direktan gubitak uroda, nedavna su istraživanja potvrdila i negativan učinak *V. dahliae* na organoleptička svojstva maslinovih ulja (Landa i sur., 2019).

Simptomi se razvijaju i u drvenastom tkivu, a ponekad se mogu uočiti na presjeku grane ili debla zaraženih stabala masline (Slika 3). Na zaraženim stablima vidljivo je tamnjenje ksilemskog staničja u obliku isprekidanog ili kontinuiranog kruga (Cvjetković, 2010). U provodnim se snopovima ponekad razvijaju tiloze i nakupljaju gumozne tvari (Yadeta i Thomma, 2013; Trapero i sur., 2018). Posljedica navedenih simptoma je i smanjen prijenos vode i hraniva iz korijena putem ksilema u ostale nadzemne dijelove masline (Pouzoulet i sur., 2014).



Razvoj simptoma može imati različitu dinamiku, a moguć je i oporavak stabala masline nekoliko godina nakon pojave prvih simptoma. Obrambeni mehanizmi odgovorni za potpuni oporavak nisu poznati, kako na maslini tako ni na ostalim kulturama (Jiménez-Díaz i sur., 2012). Oporavak stabala masline zabilježen je i u nasadima gdje su provedene mjere zaštite i u onima gdje su iste u potpunosti izostale (Blanco-López i sur., 1990; Levin i sur., 2003).



Slika 3. Simptomi verticilijskog venuća na maslini

Na fotografijama su prikazani simptomi verticilijskog venuća: a) sušenje izbojaka na kojima su razvijeni plodovi masline; b) tamnjenje ksilemskog staničja vidljivo na poprečnom prerezu višegodišnjeg drva masline; c) sušenje dijela krošnje masline. Izvor: Dario Ivić.

### 2.4.5. Životni ciklus i epidemiologija

Ostatci različitih biljaka domaćina mogu sadržavati mikrosklerocije u obliku kojih *V. dahliae* može prezimiti (Berlanger i Powelson, 2005; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). U nepovoljnim uvjetima ili u izostanku pogodne biljke domaćina, mikrosklerociji vrste *V. dahliae* u tlu mogu ostati vijabilni do 14 godina (Wilhelm, 1955). Za razliku od mikrosklerocija, u odsutnosti biljke domaćina, konidiji mogu preživjeti u tlu svega nekoliko mjeseci (Wilhelm, 1955; Vallad i Subbarao, 2008). Mikrosklerociji i konidiji dopijevaju u tlo zajedno s ostatcima rezidbe ili razvojem patogena na ostalim biljkama domaćinima, kao što su jednogodišnji korovi koji su vrlo često prisutni unutar nasada. Mikrosklerociji mogu dospjeti u druge dijelove nasada ili se proširiti u obližnje maslinike putem kišnice, vode za navodnjavanje ili ostalih ljudskih djelatnosti (Baroudy i sur., 2018; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020).

Primarne propagule koje dovode do infekcije masline su mikrosklerociji, a infekcija je moguća i razvojem konidija (Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Nakon klijanja, mikrosklerocij razvija jednu do nekoliko hifa koje rastu u smjeru korijena biljke domaćina (Bui i sur., 2019). Nije u potpunosti jasno postoje li specifični zahtjevi ovog patogena prema biljci domaćinu (Klosterman i sur., 2009). Prethodnim je istraživanjima utvrđeno da eksudati korijena određenog domaćina mogu prekinuti fazu dormantnosti i potaknuti klijanje mikrosklerocija u tlu (Zha i sur., 2022). Kretanje *V. dahliae* prema korijenu domaćina uvjetovano je kemijskim podražajima odnosno kemotaksijom (Keykhasaber i sur., 2018). Kako bi se prilagodio karakteristikama biljaka domaćina, *V. dahliae* je razvio različite infektivne strukture koje se mogu razlikovati i između pojedinih izolata ove vrste. Infekcija i zatim kolonizacija korijena biljaka domaćina može nastupiti direktnim prodorom hife, razvojem apresorija ili hifopodija (Keykhasaber i sur., 2018; Liu i sur., 2023). Formiranje apresorija ili hifopodija odvija se prije prodiranja u korijen biljke domaćina. Navedene infektivne strukture nisu literaturno opisane za interakciju *V. dahliae* – *O. europaea*, no poznate su za druge gospodarski značajne kulture. Hifa može direktno prodrijeti i zatim kolonizirati korijen domaćina, bez prethodnog formiranja specifičnih infektivnih struktura, na mjestima gdje su nastupile rane na korijenu ili gdje se formira primordij korijena (Liu i sur., 2023). Direktni prodor hife u staničje korteksa korijena najčešće se odvija u neposrednoj blizini korijenova vrha (Zhou i sur., 2006; Vallad i Subbarao, 2008). Opisano je formiranje apresorija koji se može razviti na proširenom vrhu hife ili klične cijevi (Cvjetković, 2010; Liu i sur., 2023). Konidiji kliju u kličnu cijev, a zatim se razvija apresorij i prodirajući jastučić. Klična cijev se razvija paralelno uzduž korijena, a nakon što se apresorijem pričvrsti za stanice korijena i razvije se prodirajući jastučić iz kojeg se formira infektivna hifa koja raste između epidermalnih stanica te dalje u staničje korteksa, čime nastupa kolonizacija tkiva korijena masline. Osim navedenih struktura, *V. dahliae* može razviti i hifopodij na vrhu hife

kojim se pričvrsti za korijen biljke domaćina. Hifopodij zatim na korijenu razvija prodirajući jastučić koji je neophodan za prodiranje u stanice korijena i nastupanje infekcije. Opisane infektivne strukture neophodne su za kolonizaciju korijena biljke domaćina i utječu na patogenost izolata *V. dahliae* (Liu i sur., 2023).

Ipak, kolonizacija korijena, a zatim i vaskularnog staničja ostatka biljke, nije uvijek uspješna (Klosterman i sur., 2009; Prieto i sur., 2009). Postrani rast korijena ili oštećenje korijena, djelovanjem određenog abiotičkog ili biotičkog čimbenika, ne garantira *V. dahliae* uvijek uspješnu kolonizaciju vaskularnog staničja (Bowers i sur., 1996; Liu i sur., 2023). Dovoljan je vrlo malen broj mikrosklerocija da bi nastupila uspješna infekcija korijena, ali pretpostavlja se da svega 0,02% infekcija korijena završava sistemičnom kolonizacijom biljke (Klosterman i sur., 2009). Korijen sadrži značajnu koncentraciju lignina, jedne od primarnih komponenti stanične stijenke, ali i drugih sekundarnih spojeva koji imaju antimikrobni učinak i koje biljka domaćin koristi u obrani od *V. dahliae* (Keykhasaber i sur., 2018; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020).

Nakon uspješnog prodora u staničje korijena, kolonizacija se dalje odvija tako da se hifa razvija inter- i intracelularno u korteksu korijena, putem kojeg *V. dahliae* dospijeva u ksilemsko staničje biljke (Keykhasaber i sur., 2018). Razvija se micelij i formiraju se konidiofori s konidijima (Vallad i Subbarao, 2008). Strujanjem vode u ksilemu konidiji mogu dospjeti i u udaljene dijelove biljke, a ovaj je proces ključan za uspješnu kolonizaciju biljaka domaćina (Klosterman i sur., 2009). Nadalje, konidiji mogu biti zarobljeni u dijelovima provodnog staničja, a na tim mjestima kliju i razvijaju se nove hife koje prodiru u obližnje elemente provodnog staničja (Perry i Evert, 1983). U tom se procesu kolonizacije *V. dahliae* širi akropetalno transpiracijskim putem (Berlanger i Powelson, 2005). Prodorom *V. dahliae*, biljka se nastoji obraniti formiranjem tiloza ili biosintezom sekundarnih metabolita (Perry i Evert, 1983; Klosterman i sur., 2009; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Rezultat toga je smanjeno usvajanje vode koje dovodi do pojave prvih simptoma i postupnog sušenja biljke. Biljno tkivo postupno odumire, a u njemu se razvijaju konidiofori s konidijima i mikrosklerociji (Keykhasaber i sur., 2018). U tim oblicima *V. dahliae* dospijeva ponovno u tlo gdje može mirovati tijekom nepovoljnih uvjeta u okolišu ili dovesti do novih infekcija (Berlanger i Powelson, 2005; Cvjetković, 2010).

#### **2.4.6. Utjecaj ishrane masline na razvoj vrste *Verticillium dahliae***

Vrsta *V. dahliae* može dovesti do značajnih gubitaka u maslinarskoj proizvodnji, a mjere njegova suzbijanja su uglavnom preventivne (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020). Dostupne mjere zaštite ne osiguravaju eradikaciju

*V. dahliae*, a često su ekonomski neprihvatljive ili proizvođačima nedostupne (Pullman i sur., 1981; Anguita-Maeso i sur., 2021). Primjena preventivnih mjera može, iz navedenih razloga, imati znatno uspješniji i dugoročniji ishod u smanjenju šteta od *V. dahliae*. Sadnja tolerantnih sorata masline dijelom doprinosi smanjenoj zastupljenosti verticilijskog venuća (Ramírez-Tejero i sur., 2021; Valverde Caballero i sur., 2023), ali ne udovoljava potrebama tržišta i očuvanju autohtonih sorata masline.

Utjecaj ishrane na razvoj vrste *V. dahliae* istražen je u nekoliko gospodarski značajnih kultura (Pegg i Brady, 2002; López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Cocozza i sur., 2021). Navedena su istraživanja uglavnom provedena na jednogodišnjim biljnim vrstama, dok je utjecaj ishrane na osjetljivost/tolerantnost višegodišnjih drvenastih vrsta obuhvaćen tek manjim dijelom (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; López-Moral i sur., 2022 a-c; Pérez-Rodríguez i sur., 2022). Ishrana može utjecati na obrambene mehanizme masline, što je većim dijelom poznato kod primjene N (Fernández-Escobar, 2019). Primjenom manjih koncentracija N smanjuje se učestalost i intenzitet razvoja *V. dahliae* kako u maslini tako i u drugim kulturama (Pegg i Brady, 2002; López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Pérez-Rodríguez i sur., 2022). Rezultati istraživanja o utjecaju N na razvoj *V. dahliae* mogu biti kontradiktorni i pod utjecajem su primijenjene koncentracije ili oblika navedenog elementa (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). Nadalje, istraživanja koja su obuhvatila primjenu B ili N (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Romanyà i sur., 2019; Pérez-Rodríguez i sur., 2022), kao i njihov utjecaj na obrambene mehanizme značajne za razvoj vrste *V. dahliae* (Cocozza i sur., 2021), na maslini su uglavnom izostala odnosno ne prikazuju povezanost između gnojidbe i promjena u metabolizmu fenola s razvojem *V. dahliae* u vegetativnim organima masline.

#### **2.4.7. Utjecaj fenolnih spojeva na *Verticillium dahliae***

Sveprisutnost masline u raznolikim okolišnim uvjetima dovela je ovu kulturu u doticaj s različitim abiotičkim čimbenicima, uzgojnim praksama i populacijskim strukturama vrste *V. dahliae*. Višestruke interakcije između masline i pojedinih abiotičkih ili biotičkih čimbenika imale su snažan utjecaj ne samo na kultivirane, nego i na divlje masline. Istovremena prisutnost navedenih čimbenika dovela je do lokalno-specifičnih interakcija koje su vremenom rezultirale značajnim promjenama u metaboličkom profilu masline, ali i patogenom potencijalu *V. dahliae* (Besnard i sur., 2018; Gros-Balthazard i sur., 2019). Razlozi porasta virulentnosti *V. dahliae* nisu još razjašnjeni, ali pretpostavlja se da su uvriježeni selekcijski kriteriji doprinijeli razvoju sorata masline s boljim gospodarskim karakteristikama (Picual, Manzanillo, Leccino), nauštrb tolerantnosti prema pojedinim patogenima kao što je *V. dahliae* (Leyva-Pérez i sur., 2018). Veća pojavnost i širenje agresivnih izolata *V. dahliae*, poput onih koji uzrokuju defolijaciju masline, otežalo je njihovo

suzbijanje, ali i potaklo razvoj tolerantnih sorata masline (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020).

Dugotrajno kultiviranje i pripitomljavanje masline rezultiralo je promjenama u strukturi i ekspresiji gena, što je za posljedicu imalo i promjenu metaboličkog profila u vegetativnim organima i specifičnim tkivima masline (Guodong i sur., 2019; Ramírez-Tejero i sur., 2020). Mnogobrojna istraživanja podržavaju slične hipoteze te dalje potvrđuju da su, istovremenim djelovanjem većeg broja čimbenika, sastav i koncentracija fenola u maslini podvrgnuti višestrukim promjenama. Varijabilnost sastava i koncentracije fenolnih spojeva pod utjecajem je sorte (genetske) specifičnosti (Nicolì i sur., 2019), abiotičkih čimbenika (Mechri i sur., 2020), biotičkih čimbenika (Markakis i sur., 2010; Gharbi i sur., 2017; Landa i sur., 2019) i uzgojnih praksi (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005; Erel i sur., 2013). Dugoročno promatrajući, može se pretpostaviti da su te promjene utjecale na formiranje nasljednih obrambenih mehanizama nizom metaboličkih promjena ugrađenih u genetsko nasljeđe vrste. Maslina je vremenom stekla otpornost prema mnogobrojnim uzročnicima stresa, pojedini su mikroorganizmi vremenom prerasli u korisne, a drugi su se, poput vrste *V. dahliae*, razvili u značajne patogene koji danas dovode u pitanje održivost maslinarske proizvodnje (Schilirò i sur., 2012; Mechri i sur., 2015; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020).

Pravovremena biosinteza, kompartmentalizacija i translokacija fenolnih spojeva ključni su za ostvarenje višestrukih funkcija ove skupine spojeva. Fenolni spojevi su značajan dio obrambenog odgovora i signalizacije biljke, a biosinteza *de novo* i (re)translokacija fenolnih spojeva doprinose sprječavanju daljnjeg prodora patogena (Biała i Jasiński, 2018). Pretpostavlja se da je ravnoteža između fiziološkog i metaboličkog odgovora biljke od iznimnog značaja za sprječavanje daljnje uspješne kolonizacije biljnog tkiva od strane patogena. Takvom strategijom, patogen ostaje zarobljen u izdvojenom dijelu provodnog staničja ksilema jer nailazi na barijere koje velikim dijelom tvori lignin, a usmjeravanje ciljanih fenolnih spojeva na navedeno mjesto kolonizacije sprječava razvoj hifa ili ostalih propagula *V. dahliae* (Fradin i Thomma, 2006).

Usprkos visokoj raznolikosti i značaju fenolnih spojeva, interakcija između fenolnih spojeva masline i vrste *V. dahliae* većim dijelom ostaje nepoznata (Fradin i Thomma, 2006; Báidez i sur., 2007; Markakis i sur., 2010). Istraživanja fenolnih spojeva, provedena na drugim biljnim vrstama i u uvjetima *in vitro* (Báidez i sur., 2007; Markakis i sur., 2010; Gharbi i sur., 2017), otkrivaju njihov potencijal kojeg je potrebno istražiti i na modelu *O. europaea* – *V. dahliae*. Sorte masline koje su osjetljive na *V. dahliae* imaju značajno nižu koncentraciju konstitutivnih fenolnih spojeva u odnosu na one koje su tolerantne (Gharbi i sur., 2017). Koncentracija fenolnih spojeva, nakon nastupanja infekcije, u osjetljivih i tolerantnih sorata postepeno se ujednačava, a dugotrajnija izloženost ovom patogenu utječe na različit

intenzitet fenolnog odgovora biljke. Provedena istraživanja ukazuju na moguću vezu između tolerantnosti sorte i biosinteze fenolnih spojeva, ali potrebno je utvrditi ulogu fenolnih spojeva u interakciji masline s izolatima *V. dahliae* poznate virulentnosti. Iako provedeno u uvjetima *in vitro*, istraživanje utjecaja fenolnih spojeva doprinosi shvaćanju njihove uloge u tolerantnosti masline na *V. dahliae* (Báidez i sur., 2007; El Hadrami i sur., 2011; Novo i sur., 2017; Drais i sur., 2021).

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. Gnojidbeni pokusi s dušikom i borom

##### 3.1.1. Postavljanje pokusa

Rastom ujednačene jednogodišnje sadnice masline sorte Istarska bjelica, uzgojene na vlastitom korijenu i s jednim izbojkom, posađene su u inertni supstrat koji se sastojao od mješavine kvarcnog pijeska i perlita (Fuga sand 80; Murexin d.o.o., Puconci, Slovenija; Agroperl®; Europerl d.o.o., Samobor, Hrvatska) u omjeru 1:1 (v/v) prije sadnje maslina u lonce. Nakon sadnje tijekom studenog 2018. godine, sadnice su smještene u grijani plastenik Instituta za poljoprivredu i turizam (45°13'22"N, 13°36'12"E) na tromjesečni period prilagodbe. Lonci su prekriveni polietilenskom bijelom folijom da bi se spriječio porast algi te smanjili gubitak vlage i prekomjerno zagrijavanje supstrata. Način postavljanja folije osigurao je mogućnost gnojidbe zalijevanjem, a donji dio lonca nije zahvaćen folijom kako bi se suvišak primijenjenog hraniva ili vode mogao nesmetano ocijediti.

##### 3.1.2. Eksperimentalni dizajn

Istraživanja su provedena u obliku dva gnojidbena pokusa, jednim je gnojidbenim pokusom istražen utjecaj gnojidbe N (Pokus 1), a drugim utjecaj gnojidbe B (Pokus 2). Svakim je pokusom istražen utjecaj sedam gnojidbena tretmana. Osnovna parcela svakog pokusa sastojala se od pet biljaka, što je rezultiralo s ukupno 20 biljaka po istraženom tretmanu i 140 biljaka po svakom istraženom pokusu. Gnojidbeni pokusi trajali su 150 dana, a provedeni su u periodu od 20. veljače do 19. srpnja 2019.

U gnojidbenom pokusu s N (Pokus 1) masline primijenjena je prilagođena Hoaglandova otopina (Fernández-Escobar i sur., 2016) s modificiranim mM koncentracijama N kako slijedi:

- a) kontrola N0 (0 mM N)
- b) tretman N1 (5 mM N)
- c) tretman N2 (10 mM N)
- d) tretman N3 (15 mM N)
- e) tretman N4 (20 mM N)
- f) tretman N5 (25 mM N)
- g) tretman N6 (30 mM N)

U gnojidbenom pokusu s B (Pokus 2) primijenjena je prilagođena Hoaglandova otopina (Fernández-Escobar i sur., 2016) s modificiranim  $\mu$ M koncentracijama B kako slijedi:

- a) kontrola B0 (0  $\mu$ M B)
- b) tretman B1 (25  $\mu$ M B)
- c) tretman B2 (50  $\mu$ M B)



- d) tretman B3 (100  $\mu\text{M}$  B)
- e) tretman B4 (200  $\mu\text{M}$  B)
- f) tretman B5 (400  $\mu\text{M}$  B)
- g) tretman B6 (800  $\mu\text{M}$  B)

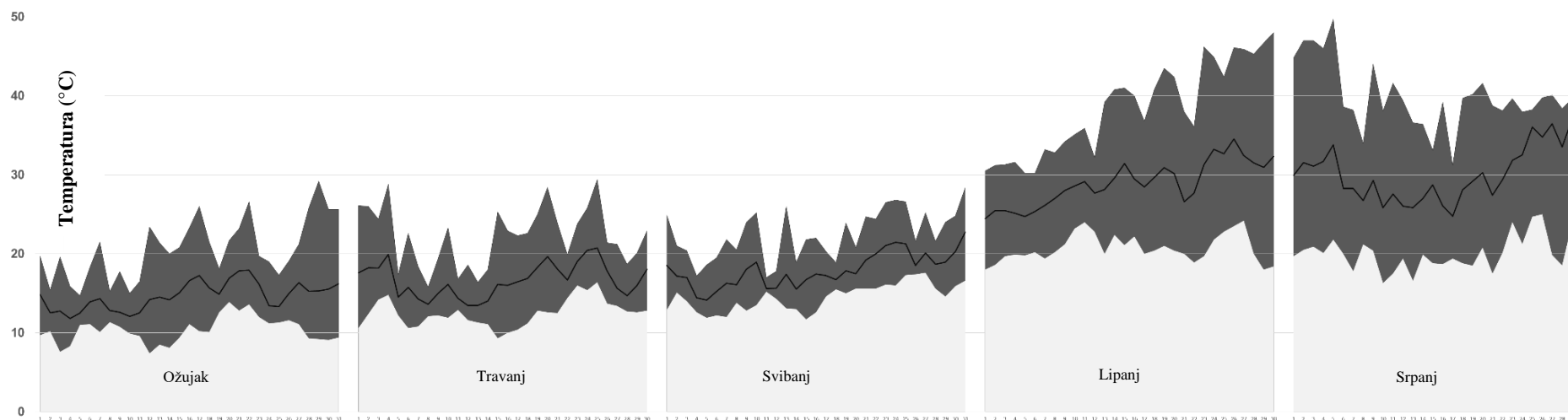
U gnojidbenom pokusu s N (Pokus 1) molarna koncentracija N (mM N) prilagođena je primjenom amonijevog heptamolibdata tetrahidrata i amonijevog nitrata (YaraTera™; Yara, Veszprem, Mađarska). U gnojidbenom pokusu s B (Pokus 2) različite molarne koncentracije B ( $\mu\text{M}$  B) postignute su primjenom di-natrijevog tetraborata 10-hidrata (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska).

U prvoj polovici pokusa (0 – 75 dana) tjedno je primijenjeno prosječno 600 mL hranive otopine/biljci, dok je u drugoj polovici pokusa (75 – 150 dana) tjedno primijenjeno prosječno 1000 mL hranive otopine/biljci. Primjenom koncentrirane sumporne kiseline (VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France) ujednačena je pH-vrijednost hranivih otopina u svim tretmanima. Hranive otopine podešene su na 5 – 5,30 pH-vrijednosti (Seven2Go pH meter; Mettler Toledo d.o.o., Zagreb, Hrvatska) neposredno prije svake primjene.

### 3.1.3. Uvjeti uzgoja

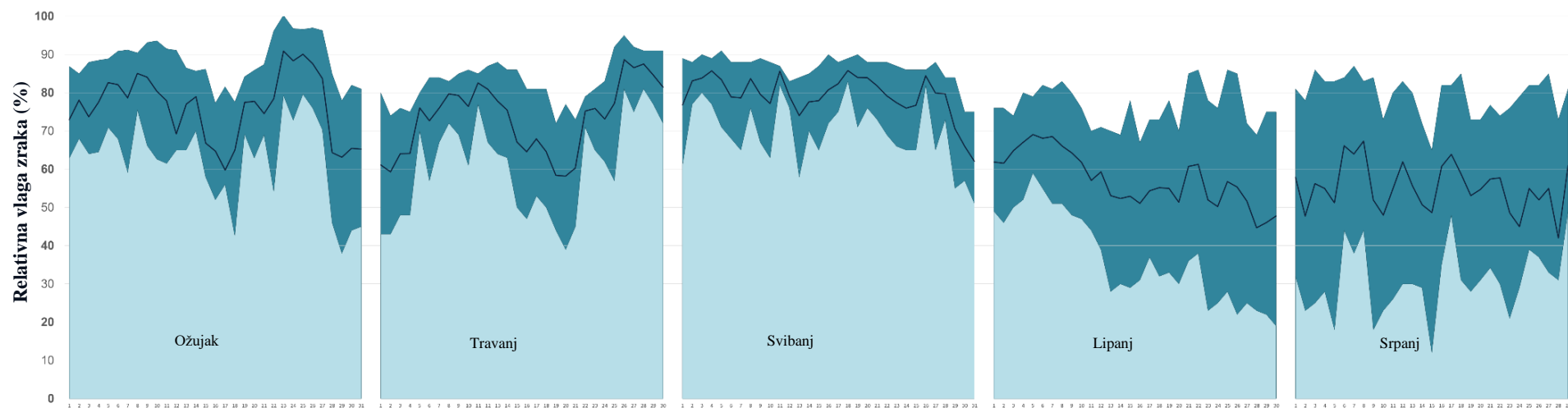
Praćenje uzgojnih uvjeta omogućeno je postavljanjem prijenosne meteorološke stanice (TFA 35.1075 Nexus Wireless Weather Station; TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim, Njemačka) i sustava HydraProbe (Stevens HydraProbe, Stevens Connect; Stevens Water Monitoring Systems Inc., Portland, SAD) unutar plastenika. Meteorološkom stanicom i sustavom HydraProbe prikupljeni su, a zatim i analizirani, podaci o temperaturi i vlazi zraka (minimalna, srednja i maksimalna; Grafikon 1, Grafikon 2) te vlažnosti supstrata (Grafikon 3). Prosječna pH-vrijednost supstrata iznosila je 7,0.





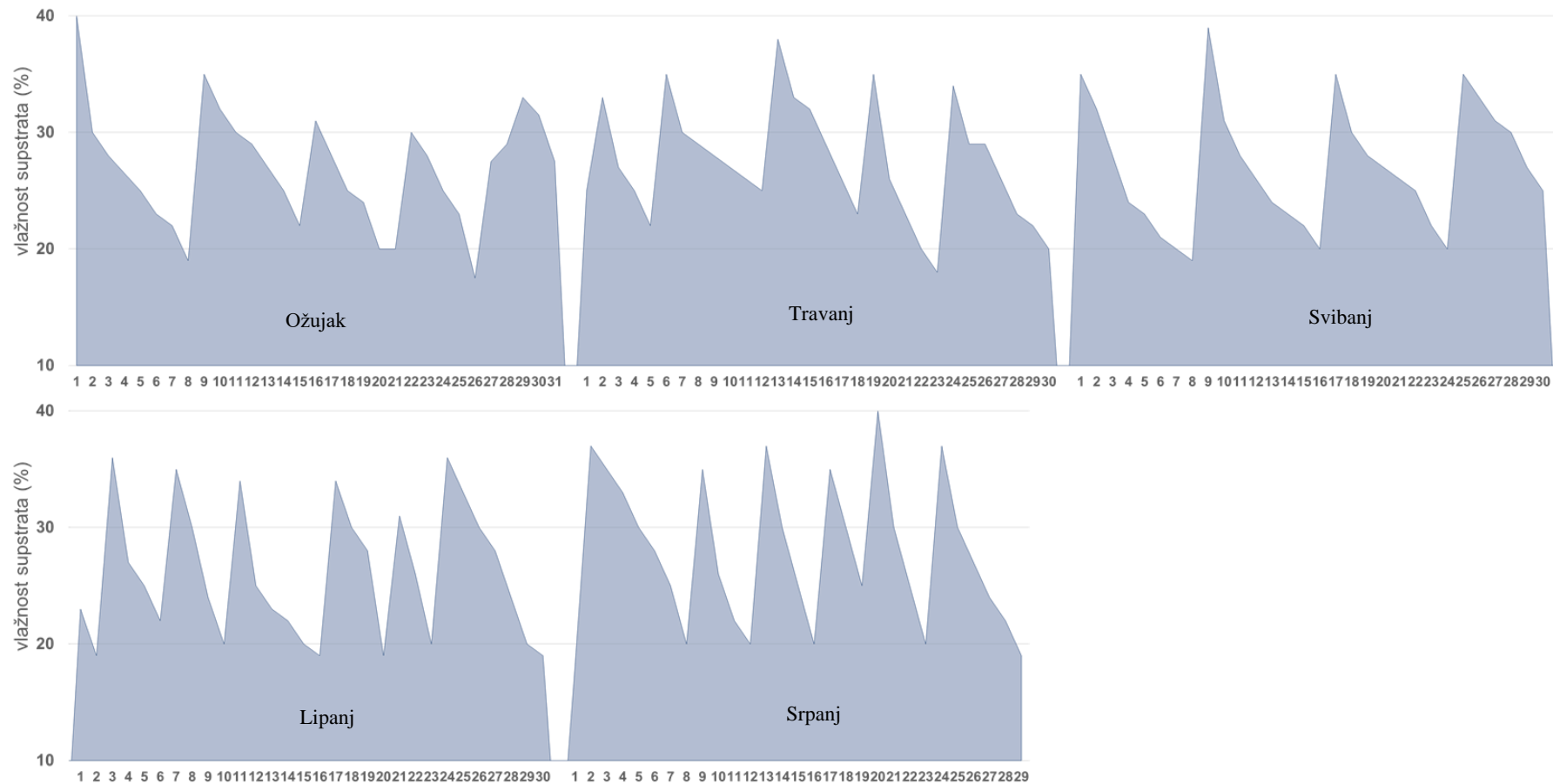
Grafikon 1. Minimalna, prosječna i apsolutna maksimalna temperatura zraka (°C) u razdoblju provođenja pokusa

Oznake: gradijentom boja prikazane su različite temperature, pri čemu najsvjetlija siva prikazuje minimalne temperature a tamno siva apsolutno maksimalne temperature; linijom crne boje označena je prosječna temperatura.



Grafikon 2. Minimalna, prosječna i maksimalna relativna vlaga zraka (%) u razdoblju provođenja pokusa

Oznake: gradijentom boja prikazane su različite relativne vlage, pri čemu najsvjetlija plava prikazuje minimalnu relativnu vlagu a tamno plava maksimalnu relativnu vlagu; linijom tamno plave boje označena je relativna vlaga zraka.



Grafikon 3. Prosječna vlažnost supstrata (%) u razdoblju provođenja pokusa  
 Brojevi na x-osi grafikona predstavljaju dane u mjesecu.

### **3.1.4. Određivanje vegetativnih svojstava masline**

Tijekom trajanja eksperimenata određena je duljina izbojka, broj internodija i broj potpuno razvijenih listova na izbojcima svih jednogodišnjih sadnica masline. Određivanje vegetativnih svojstava izbojka provedeno je u oba gnojdbena pokusa (Pokus 1, Pokus 2) nakon 70 (oznaka GPM-1), 110 (oznaka GPM-2) i 150 (oznaka GPM-3) dana od postavljanja pokusa. Navedena su mjerenja provedena na svih pet biljaka unutar osnovnih parcela. Mjerenja su provedena nedestruktivnim metodama, a kako bi se odredio prirast izbojka kao alat je korišten ručni metar. Duljina prirasta (cm) mjerena je od prvog nodija (mjesta račvanja prvotno razvijene reznice) do ovrška primarnog izbojka, izbrojani su svi internodiji i potpuno razvijeni listovi veći od 2 cm.

### **3.1.5. Uzorkovanje lista, izbojka i korijena**

Uzorci lista, izbojka i korijena zasebno su prikupljeni unutar svih osnovnih parcela oba gnojdbena pokusa (Pokus 1, Pokus 2). Uzorkovanje lista, izbojka i korijena provedeno je 150 dana nakon postavljanja gnojdbenih pokusa (Pokus 1, Pokus 2). Listovi i drvenasti dio izbojka prikupljeni su sa središnjeg dijela izbojka, između petog vršnog internodija i prirasta bazalnog dijela izbojka razvijenog nakon početka provođenja gnojdbenih pokusa. Nakon uzorkovanja listova i izbojka, korijen je odvojen od izbojka te temeljito očišćen od supstrata. Uzorci su zatim u laboratoriju isprani kako slijedi: dvostruko ispiranje u vodi iz slavine, 1% octena kiselina (ledena octena kiselina; VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, France) u demineraliziranoj vodi (voda tip 3; Hydrolab 10 SP purification system; Hydrolab, Straszyn, Poland), dvostruko pranje u demineraliziranoj vodi. Listovi i izbojci su prosušeni papirnatim ubrusima i odloženi u papirnate vrećice te ostavljeni na sušenje u kontroliranim uvjetima pri 35 °C do postizanja konstantne mase (Memmert Universal Oven UF160; Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach, Njemačka), dok je korijenje čuvano u hladnjaku pri temperaturi 5 °C (hladnjak R6191DW; Gorenje, Velenje, Slovenija) u hermetički zatvorenim PP vrećicama kako bi se odredila njegova vegetativna svojstva i kasnije koristio u provedbi kemijskih analiza.

### **3.1.6. Određivanje vegetativnih svojstava korijena**

Pri dovršetku gnojdbenih pokusa (Pokus 1, Pokus 2) određena su vegetativna svojstva korijena destruktivnim metodama. Sitno izrezano korijenje je odloženo u posudu od pleksiglasa (200 × 300 mm) i postavljeno na skener (Epson Perfection V700; Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan) kako bi se digitaliziralo za daljnju analizu. Posuda je ispunjena s 500 mL demineralizirane vode, a korijenje je pravilno raspoređeno čime je spriječeno njegovo preklapanje. Kako bi snimka bila odgovarajuća, korijenje je moralo biti u potpunosti

uronjeno u vodu. Zbog velikog volumena, svaki je korijen skeniran u dva do tri dijela a mjerenja su uprosječena. Pomoću sustava za analizu WinRHIZO™ Pro (Regent Instruments Inc., Ottawa, Kanada) određena je duljina (cm), površina (cm<sup>2</sup>), promjer (mm) i volumen (cm<sup>3</sup>) korijena. Kalibracija je provedena neposredno prije početka mjerenja s ugrađenim sustavom za kalibraciju (Regent Instruments Inc., 2022). Po svakoj osnovnoj parceli analizirana su po dva korijena masline. Nakon provedenih mjerenja korijen je po prije opisanoj metodi osušen za daljnje analize.

### 3.1.7. Kemijske analize vegetativnih organa masline

Prethodno uzorkovani i osušeni uzorci usitnjeni su mlinom (0,2 mm sita, Ultra centrifugalni mlin ZM 200; Retsch Maschinen GmbH, Setzingen, Njemačka). Uzorci su potom skladišteni pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu, u epruvetama do trenutka provođenja predviđenih kemijskih analiza. Pripravljene uzorci korišteni su za kvantitativnu analizu koncentracije N (g/kg ST) i B (mg/kg ST), koncentracije ukupnih fenola te pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) prema prethodno opisanim metodama (Vidović i sur., 2021; Marčelić i sur., 2022).

### 3.1.8. Kvantitativna analiza koncentracije dušika i bora

Koncentracija ukupnog N (g/kg ST) određena je metodom kemiluminiscencije primjenom jedinice za mjerenje koncentracije ukupnog N (TOC-L CPH/CPN; TNM-L jedinica; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Priprava i analiza uzoraka provedena je prema Marčelić i sur. (2022). Usitnjeni uzorci korijena, izbojka ili lista ( $50 \pm 0,01$  mg) odvagani su u staklene vijale. Uzorci su zakiseljeni dodatkom klorovodične kiseline (0,2 M, 30 mL), uzorak je potom homogeniziran 1 min pri 14.500 okr/min (Ultra Turrax, IKA® T10; IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Njemačka). Uzorci su postavljeni na analizator opremljen jedinicom za automatsko injektiranje uzoraka (ASI-L jedinica; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) s ugrađenom magnetskom miješalicom. Uzorci su zatim injektirani. Kao plin nosilac korišten je sintetski zrak (99% čistoća; UTP Plin d.o.o., Pula, Hrvatska) uz prosječnu potrošnju 330 mL/min. Kao slijepa proba korištena je ultračista voda (Hydrolab 10 SP purification system; Hydrolab, Straszyn, Poland). Korištene kemikalije bile *Pro Analysis* (p.a.) kvalitete, nabavljene su od VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, Francuska).

Koncentracija B (mg/kg ST) u vegetativnim organima masline određena je atomskim emisijskim spektrometrom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES) prema prethodno opisanoj metodi (Vidović i sur., 2021). Za elementnu analizu korišteni su uzorci korijena, izbojka i lista prethodno pripremljeni mikrovalno potpomognutim razaranjem.

Mikrovalno potpomognuto razaranje uzoraka provedeno je u jedinici za mikrovalnu digestiju prema prethodno opisanoj metodi (Vidović i sur., 2021). Provođenju analiza prethodila je, periodički provedena, dekontaminacija PTFE reakcijskih posuda. Ista je provedena ispiranjem PTFE reakcijskih posuda s koncentriranom dušičnom kiselinom prema zadanom programu Milestone ETHOS UP sustava za digestiju (SK-AG-004 Dried plant tissue; Milestone Srl, Sorisole, Italija).

Za potrebe provođenja mikrovalno potpomognutog razaranja, u svaku reakcijsku posudu, odvgan je prethodno usitnjen uzorak lista, izbojka ili korijena ( $200 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ ). Svakom je uzorku dodana koncentrirana dušična kiselina (6 mL) i vodikov peroksid (2 mL, 30%). Uzorci su postavljeni u jedinicu za mikrovalnu digestiju, a razaranje uzoraka provedeno je prema sljedećem digestijskom programu: 1.  $t = 25$  minuta,  $T_2 = 200 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $MW = 1800 \text{ W}$ , maksimalna ventilacija; 2.  $t = 15$  minuta,  $T_2 = 200 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $MW = 1800 \text{ W}$ , maksimalna ventilacija; 3.  $t = 0$ ,  $MW = 0 \text{ W}$ , maksimalna ventilacija. Dobiveni uzorci su, nakon dovršetka mikrovalno potpomognutog razaranja, postepeno ohlađeni na sobnu temperaturu i imali su oblik bistre otopine. Uzorci su kvantitativno prebačeni u epruvete trostrukim dodavanjem 8,33 mL demineralizirane vode. Pripravljene uzorci skladišteni su pri  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  (hladnjak R6191DW; Gorenje, Velenje, Slovenija) do trenutka provođenja analiza.

Identifikacija i kvantifikacija B provedena je pomoću ICPE-9820 (Shimadzu, Kyoto, Japan) koji je opremljen automatskim uzorkivačem (AS-10; Shimadzu, Kyoto, Japan), peristaltičkom pumpom, protočnom staklenom komorom i raspršivačem tipa 10 UES. Stabilna snaga generatora iznosila je 1,20 kW. Uzorak se uvodio protokom plina argona (99,9999%; UTP d.o.o., Pula Hrvatska), pri čemu je vanjski protok plina iznosio 10 L/min, pomoćni protok plina 0,6 L/min, a protok plina nosioca 0,7 L/min. Bakljom za plazmu tipa mini-torch i CCD detektorom provedeno je istovremeno mjerenje svih elemenata i njihovih pripadajućih valnih duljina.

Jednoelementne standardne otopine (Inorganic Ventures, Christiansburg, SAD) primijenjene su za pozicioniranje plazme i pripremu kalibracijskih otopina. Kalibracijski standardi pripremljeni su u odgovarajućim serijskim razrjeđenjima temeljne standardne otopine. Točnost analitičkog mjerenja provjerena je usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima analize certificiranog referentnog uzorka (WEPAL, Wageningen, Nizozemska). Jednoelementne standardne otopine bile su spektralne čistoće, a pripravljene su razrjeđenjem u dušičnoj kiselini. Za potrebe pripreme standardnih otopina korištena je ultračista demineralizirana voda (Tip 1, Hydrolab 10 SP purification system; Hydrolab, Straszyn, Poljska). Ostale korištene kemikalije bile su p.a. kvalitete i nabavljene su od VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, Francuska).

### 3.1.9. Kvantitativna analiza koncentracije fenolnih spojeva

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista, izbojka i korijena masline provedena je prema prilagođenoj metodi Vidović i sur. (2021). Za ekstrakciju su korišteni usitnjeni uzorci lista i izbojka masline (500 mg ± 0,1 mg) te korijena (750 mg ± 0,1 mg). Navedeni su uzorci homogenizirani s vodenom otopinom metanola (20 mL, 80% v/v) i ekstrahirani 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji pri 25 °C (MRC DC-250, 300/400 W i 40 kHz; MRC laboratory instruments, Holon, Izrael). Nakon dovršetka ekstrakcije uzorci su centrifugirani u trajanju 7 min pri 4000 okr/min (Domel Centric 350; Železniki, Slovenija). Dobiveni supernatant je odvojen od taloga dekantiranjem u epruvete te skladišten pri -20 °C (hladnjak model GSV36VWEV; Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Njemačka) do trenutka provođenja analiza. Neposredno prije početka provođenja analiza, metanolni su ekstrakti filtrirani kroz 0,45 µm celulozno acetatne membranske filtere prethodno kondicionirane ekstrakcijskim otapalom. Za pripremu ekstrakcijskog otapala korišten je metanol (99%), čistoće za HPLC (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka) i demineralizirana voda proizvedena sustavom Hydrolab 10 SP purification system (Hydrolab, Straszyn, Poljska).

Metoda određivanja koncentracije ukupnih fenola (mg/100 g ST) temelji se na kolorimetrijskoj reakciji reducensa, u pripremljenim metanolnim ekstraktima, s Folin-Ciocalteu reagensom (Vidović i sur., 2021). Reakcijska smjesa je pripravljena miješanjem ekstrakta (250 µL) s demineraliziranom vodom (15 mL) i Folin-Ciocalteu reagensom (1,25 mL) u odmjernu tikvicu volumena 25 mL. Reakcijskoj smjesi je nakon 3 min dodana otopina natrijeva karbonata (2,5 mL, 6%), nakon čega je tikvica dopunjena demineraliziranom vodom do oznake. Reakcijska smjesa je homogenizirana kratkim miješanjem, a inkubacija uzoraka je provedena u sveukupnom trajanju od 90 min pri sobnoj temperaturi u tami. Nakon dovršetka reakcije apsorbancija je određena pri valnoj duljini 725 nm (Perkin-Elmer UV/VIS Lambda Bio 40 spectrophotometer; Perkin Elmer Instruments, Waltham, SAD). Sva su mjerenja provedena u tri ponavljanja.

Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) određena je prema kalibracijskoj krivulji dobivenoj pomoću masenih koncentracija kavene kiseline u rasponu od 0,0256 – 1,0 mg/L ( $R^2 = 0,9998$ ). Rezultati provedenih analiza prikazani su kao ekvivalenti mg kavene kiseline po 100 g suhe tvari (mg/100 g ST). Kao slijepa proba korišteno je ekstrakcijsko otapalo. Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski koristeći sljedeće kemikalije: metanol (99%; Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka), Folin-Ciocalteu reagens (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka), natrijev karbonat (Kemika d.o.o., Zagreb, Hrvatska). Za pripremu radnog standarda korišteni su kavena kiselina (Extrasynthese, Genay, Francuska), metanol i demineralizirana voda (ultračista voda tip 1; Hydrolab 10 SP purification system; Hydrolab, Straszyn, Poland). Korištene kemikalije bile su p.a. ili HPLC čistoće.

Analiza pojedinačnih fenolnih spojeva provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) prema prethodno opisanoj metodi (Vidović i sur., 2021). Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija fenola provedena je uređajem Thermo Ultimate 3000 System (Dionex, Termo Fisher Scientific, Waltham, SAD) opremljenim otplinjačem, binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem, termostatom kolone i UV-VIS detektorom (HACH DR/400; HACH Company, Loveland, SAD).

Uzorak je injektiran u volumenu od 10 µL. Razdvajanje pojedinačnih spojeva provedeno pomoću C18 kolone obrnutih faza LiChrospher 100 Rp-18 (250 mm × 4 mm, 5 µm; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, SAD), s predkolonom LiChrospher 100 (4 mm × 4 mm, 5 µm; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, SAD), pri konstantnoj temperaturi 25 °C. Binarna pumpa pokretala je pokretnu fazu koja se sastojala od fosforne kiseline (0,2%; otapalo A) i smjese metanol:acetonitril (1:1, v/v, otapalo B). Oba su otapala degazirana prije početka provođenja analiza i bila su HPLC čistoće. Fosforna kiselina je nabavljena od Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD), a metanol i acetonitril od Merck KgaA (Darmstadt, Njemačka). Provedeno je gradijentno eluiranje: 0 – 0,5 min: 10% B; 0,5 – 25 min: 10 – 16,5% B; 25 – 80 min: 16,5 – 30% B; 80 – 95 min: 30 – 100% B; 95 – 100 min: 100% B; 100 – 102 min: 100 – 10% B; 102 – 105 min: 10% B. Brzina protoka mobilnih faza bila je 0,8 mL/min. Detekcija luteolin-7-O-glukozida i oleuropeina provedena je pri valnoj duljini od 250 nm, detekcija hidrositirozola i tirozola pri 280 nm, verbaskozida pri 305 nm. Svi su standardi bili čistoće za HPLC (Extrasynthesa, Genay, Francuska).

Determinacija je provedena usporedbom retencijskih vremena ciljanih komponenti određenih u analiziranim uzorcima s onima standarda (Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS) Software, v. 7.2; Termo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Kvantifikacija je provedena primjenom metode vanjskog standarda. Za izradu kalibracijske krivulje pojedinog standarda nabavljeno je po pet otopina svakog pojedinačnog standarda, u ekstrakcijskom otapalu, čiji je raspon masenih koncentracija iznosio 0,5 mg/L – 50 mg/L. Pomoću kalibracijske krivulje svake pojedinačne komponente izračunate su koncentracije definiranih spojeva i prikazane kao mg/100 g ST.

## **3.2. Istraživanje protugljivičnog učinka ekstrakata fenola na *Verticillium dahliae***

### **3.2.1. Eksperimentalni dizajn**

Istraživanje protugljivičnog učinka otopina ekstrakata fenolnih spojeva provedeno je na izolatu *V. dahliae* V-263. Izolat je srednje virulentnosti na maslini i primjenom molekularnih analiza definiran je kao nedefolijacijski patotip.

Istraživanju protugljivičnog učinka otopina ekstrakata fenola masline na *V. dahliae* V-263 prethodila su dva gnojdbena pokusa. Provedbom gnojdbenih pokusa, primjenom N (Pokus 1) ili B (Pokus 2), istražen je učinak gnojdbenosti na koncentraciju fenola vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list). Nakon provedbe navedenih gnojdbenih pokusa (Pokus 1, Pokus 2), uzorci vegetativnih organa masline korišteni su za pripravu otopina ekstrakata fenola i testiranje njihova protugljivičnog učinka (% inhibicije) na *V. dahliae* V-263.

Primjenom otopine ekstrakata fenola vegetativnih organa masline, prikupljenih u gnojdbenom pokusu s N (Pokus 1) ili gnojdbenom pokusu s B (Pokus 2), istražen je njihov protugljivični učinak (% inhibicije) na klijavost konidija *V. dahliae* V-263:

- a) 28 ekstrakata korijena, gnojdbeni tretmani s N u 4 repeticije (N0 – N6)
- b) 28 ekstrakata izbojka, gnojdbeni tretmani s N u 4 repeticije (N0 – N6)
- c) 28 ekstrakata lista, gnojdbeni tretmani s N u 4 repeticije (N0 – N6)
- d) 28 ekstrakata korijena, gnojdbeni tretmani s B u 4 repeticije (B0 – B6)
- e) 28 ekstrakata izbojka, gnojdbeni tretmani s B u 4 repeticije (B0 – B6)
- f) 28 ekstrakata lista, gnojdbeni tretmani s B u 4 repeticije (B0 – B6)

Tretman za negativnu kontrolu sastojao se samo od otapala dimetilsulfoksida (DMSO) bez otopine ekstrakata fenola masline.

Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz vegetativnih organa masline istoimenih gnojdbenih tretmana (Pokus 1, Pokus 2) te su sukladno navedenome i označene. Otopine ekstrakata fenola gnojdbenih tretmana s N prikazane su oznakama EF-N0 do EF-N6, dok su otopine ekstrakata fenola gnojdbenih tretmana s B prikazane su oznakama EF-B0 do EF-B6. Protugljivični učinak (% inhibicije) otopina ekstrakata fenola na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 (Pokus 3 a,b) ispitan je nakon jednog (oznaka FPM-1), dva (oznaka FPM-2) i tri (oznaka FPM-3) dana nakon što je pokus postavljen. Otopine ekstrakata fenola za koje je utvrđen inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 (Pokus 3 a, b) dodatno su ispitane u Pokusu 4. Inhibitorni učinak u vidu postotka (%) inhibicije klijanja konidija bio je zabilježen isključivo ukoliko je klijanje konidija primjenom otopina ekstrakata fenola bilo smanjeno u odnosu na negativnu kontrolu (DMSO). U slučaju neutralnog ili stimulativnog učinka otopina ekstrakata fenola na klijanje konidija, u odnosu na negativnu kontrolu (DMSO), inhibitorni učinak je izostao.

U Pokusu 4 protugljivični učinak (% inhibicije) otopina ekstrakata fenola na porast i razvoj micelija *V. dahliae* V-263 ispitan je nakon deset (oznaka FMP-4) dana od postavljanja pokusa. Po dovršetku navedenog pokusa (FMP-4) opisan je učinak otopina ekstrakata fenola na morfološka obilježja izolata *V. dahliae* V-263.



### 3.2.2. Dobivanje ekstrakata fenola masline i priprava matičnih otopina u DMSO

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je iz vegetativnih organa masline čiji su uzorci prikupljeni nakon dovršetka gnojidbenog pokusa s N (Pokus 1) i gnojidbenog pokusa s B (Pokus 2) (Vidović i sur., 2021). Pripravljene su ekstrakti lista i izbojka ( $1000 \pm 0,1$  mg) te korijena ( $3000 \pm 0,1$  mg) masline homogenizacijom u metanolnom otapalu (30 mL, 99%). Ekstrakcija je provedena dvaput. Uzorci su postavljeni tijekom 20 minuta u ultrazvučnu kupelj pri 25 °C (MRC DC-250, 300/400 W i 40 kHz; MRC laboratory instruments, Holon, Izrael). Nakon dovršetka ekstrakcije uzorci su filtrirani kroz lijevak sa sinteriranom pločicom poroznosti D4. Po dovršetku ekstrakcije supernatanti su odekantirani i odloženi na -20 °C (hladnjak model GSV36VWEV; Robert Bosch GmbH, Gerlingen, Njemačka) tijekom 24 sata.

Metanolno otapalo odgovara za pripravu i ekstrakciju fenolnih spojeva, ali isto nije odgovarajuće za ispitivanje protugljivičnog učinka u uvjetima *in vitro*. Iz navedenih je razloga metanolno otapalo uklonjeno na rotacijskom-vakuum uparivaču (R-300 rotavapor, V-300 vacuum pump; Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švicarska) pri temperaturi kupelji od 40 °C. Uparavanje je bilo trostruko: a) metanolno otapalo je uklonjeno uparavanjem (40°C), b) praškasti ekstrakt je sastrugan i otopljen u dietil-eteru, c) dietil-eter je uklonjen uparavanjem (40°C), d) praškasti ekstrakt je sastrugan i uparen do suhog (40°C), e) ekstrakt je prikupljen u praškastom obliku.

Otopine ekstrakata fenola pripravljene su otapanjem uzoraka u praškastom obliku, svih istraženih tretmana i vegetativnih organa masline, u DMSO-u. Navedeno otapalo osigurava topljivost fenolnih spojeva i prikladno je za ispitivanje protugljivičnog učinka na vrstu *V. dahliae* (Báidez i sur., 2007). Nakon što je praškastom uzorku dodano otapalo DMSO, otopina ekstrakata fenola homogenizirana je u trajanju od 20 minuta brzinom okretaja 100 okr/min (GFL Orbital Shaker 3005; DiethelmKellerSiberHegner (DKSH) Holding, Zürich, Švicarska) pri sobnoj temperaturi. Ekstrakti fenola masline otopljeni u DMSO skladišteni su u epruvetama pri -80 °C (Arctiko g214; Arctiko, Esbjerg, Danska) do dovršetka svih pokusa *in vitro*. Konačna masena koncentracija ispitanih otopina ekstrakata fenola masline, korištenima u Pokusima 3. i 4., prilagođena je prema prethodno provedenim istraživanjima na *V. dahliae* (Varo i sur., 2017), a iznosila je 50 mg/L.

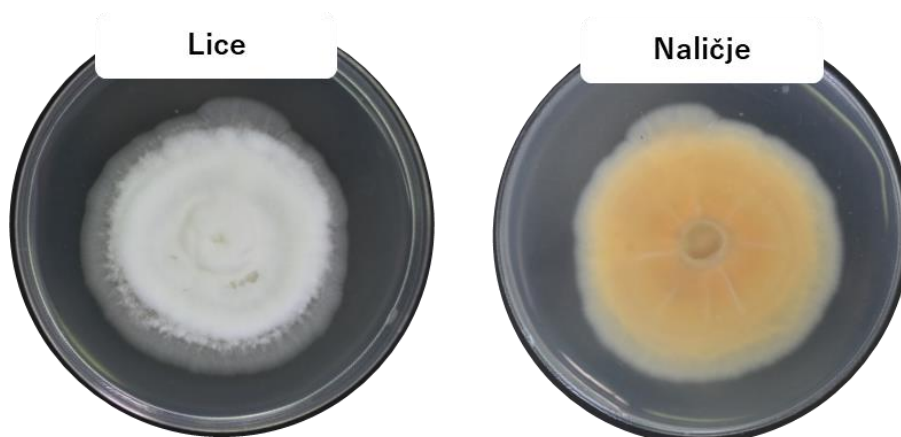
Ekstrakti fenola vegetativnih organa masline pripravljene su koristeći sljedeće kemikalije: metanol (99%; Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka), dietil-eter (Lach-ner d.o.o., Zagreb, Hrvatska), DMSO (99,7%; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MS, SAD). Korištene kemikalije bile su p.a. ili HPLC čistoće.

### 3.2.3. Priprava inokuluma *Verticillium dahliae*

Prije početka provođenja pokusa (Pokus 3 a,b; Pokus 4) pripremljen je potreban inokulum. Za uzgoj i pripravu inokuluma gljive *V. dahliae* V-263 korištena je hranjiva podloga PDA, pripravljena prema uputama proizvođača (Difco Laboratories, MD, SAD). Hranjiva podloga je ohlađena (50 °C) i zatim izlivena (15 mL) u Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm). Na središnji dio Petrijeve zdjelice postavljen je po jedan kružni isječak (Ø 5 mm) čiste kulture gljive *V. dahliae* V-263 (Slika 4). Izolat je inkubiran pri 27 °C i 24 h tame (FOC215I Cooled incubator, 230V/50-60HZ; Velp Scientifica Srl., Usmate Velate, Italija). Za potrebe pokusa korištena je sedam dana stara kultura.

Kruta (PDA; eng. Potato dextrose agar) hranjiva podloga pribavljena je od tvrtke Difco (Difco Laboratories, MD, SAD). Demineralizirana voda je proizvedena sustavom Hydrolab (Hydrolab 10 SP purification system; Hydrolab, Straszyn, Poland).

Korišten inventar, otopine i materijali su sterilizirani (kemijski ili termički), a postupci pripreme tretmana i inokulacije gljive su provedeni u aseptičnim uvjetima (LN 090; Nüve, Ankara, Turska). Za sterilizaciju površina primijenjeni su etanol (70%, v/v; KEFO d.o.o., Sisak, Hrvatska) i natrijev hipoklorit (5%, v/v; Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska).



Slika 4. Izolat *Verticillium dahliae* V-263 na hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar. Na fotografijama je prikazan izolat vrste *V. dahliae* V-263 (lice i naliče Petrijeve zdjelice) nakon 12 dana inkubacije pri 27°C i 24 sata tame.

### 3.2.4. Učinak ekstrakata fenola masline na klijanje konidija *Verticillium dahliae*

Učinak otopina ekstrakata fenola vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) ispitan je u uvjetima *in vitro* na izolat gljive *V. dahliae* V-263 (Pokus 3 a,b). Prethodno pripravljene otopine ekstrakata fenola u DMSO-u su filtrirane (0,22 µm ny filter). U jačice je nanosena inokulirana tekuća hranjiva podloga do ukupnog volumena (300 µL) konačne koncentracije ekstrakta fenola 50 mg/L. Detalji o pripremi inokulirane hranjive podloge krumpirov dekstrozni bujon (PDB) navedeni su u nastavku.

Pripravi hranjive podloge PDB prethodio je uzgoj *V. dahliae* V-263. Izolat gljive *V. dahliae* V-263 uzgojen je na hranjivoj podlozi PDA, pri čemu su u pokusu korištene kulture stare sedam dana. Kružni isječki micelija ( $\varnothing$  5 mm) prikupljeni su s rubnog dijela kolonije i iglom preneseni u epruvete s demineraliziranom vodom (8 isječaka/10 mL demineralizirane vode) i staklenim kuglicama. Snažno promiješana (vorteksirana) suspenzija konidija i fragmenata hifa (3000 okr/30 sek, Vortex V-1 plus; Biosan SIA, Riga, Latvija) filtrirana je kroz Miracloth filtracijski materijal (Miracloth; Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka) kako bi se uklonile staklene kuglice, ostatci hranjive podloge i fragmenata hifa. Brojnost konidija određena je mikroskopijski (B-290 opremljen kamerom B-CAM 10; Boeckel + Co (GmbH + Co), Hamburg, Njemačka) očitanjem četiri puta po 10 isječaka hemocitometra (Neubauer improved, dubina 0,100 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>; Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Njemačka) u programu B-View (Boeckel + Co (GmbH + Co), Hamburg, Njemačka). Konačna koncentracija konidija u inokuliranoj podlozi PDB u svakoj jažici iznosila je 10<sup>5</sup>. Navedena je koncentracija konidija utvrđena kao optimalna u preliminarnim istraživanjima (rezultati nisu prikazani).

Negativna kontrola se sastojala od inokulirane hranjive podloge i otapala DMSO, a imala je jednaku konačnu koncentraciju kao i otopine ekstrakata fenola masline. Mikrotitarske pločice zatvorene su sterilnim poklopcem i pričvršćene parafilmom. Inkubacija je provedena pri 27 °C i 24 h tame (FOC215I Cooled incubator, 230V/50-60HZ; Velp Scientifica Srl., Usmate Velate, Italija) do završetka pokusa. Rasporedom mikrotitarskih pločica u inkubatoru osiguran je eksperimentalni dizajn.

Klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263, u hranjivoj podlozi s otopinom ekstrakata fenola, mjerena je spektrofotometrijski (Infinite M Nano+; Tecan Group Ltd., Männedorf, Švicarska). Apsorbancija je mjerena svaka 24 h tijekom tri pravilno raspoređena mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM3). Klijanjem spora ukupno izmjerena apsorbancija raste, što omogućuje uspoređivanje učinka otopine ekstrakata fenola masline na *V. dahliae* V-263 u odnosu na negativnu kontrolu (DMSO). Očitavanja mikrotitarskih pločica provedena su bez uklanjanja poklopca pri tri valne duljine i jednostrukim očitanjem po jažici (405, 505 i 605 nm; program i-control™; Tecan Group Ltd., Männedorf, Švicarska). Po dovršetku odabrana je jedna valna duljina kojom je postignuta najpravilnija krivulja povećanja mjerene apsorbancije.

Protugljivični učinak (% inhibicije) otopina ekstrakata fenola vegetativnih organa masline, na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263, određen je nakon jednog (FPM-1), dva (FPM-2) i tri (FPM-3) dana nakon postavljanja pokusa.

Protugljivični učinak otopina ekstrakata fenola masline na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 izražen je kao postotak inhibicije, a izračunat je sljedećom formulom (Varo i sur., 2017):

$$\text{Postotak (\%) inhibicije} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

gdje je (r) apsorbancija izmjerena za klijavost konidija, a (R) je izmjerena apsorbancija utvrđena za klijavost konidija u negativnoj kontroli (DMSO).

Kruta (PDA; Potato dextrose agar) i tekuća (PDB; Potato dextrose broth) hranjiva podloga su pribavljene od tvrtke Difco (Difco Laboratories, MD, SAD). Demineralizirana voda je proizvedena sustavom Hydrolab (Hydrolab 10 SP purification system; Hydrolab, Straszyn, Poland). Eksperiment je proveden u sterilnim mikrotitarskim pločicama (96 jažica) s komplementarnim poklopcem.

### **3.2.5. Protugljivični učinak ekstrakata fenola masline na porast i morfološka obilježja micelija *Verticillium dahliae***

Učinak otopina ekstrakata fenola vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) na *V. dahliae* V-263 ispitan je u uvjetima *in vitro* (Pokus 4). Protugljivični učinak otopina ekstrakata fenola na porast micelija (% inhibicije) i morfološka obilježja izolata *V. dahliae* V-263 (Pokus 4), ispitan je za one otopine ekstrakata fenola za koje je utvrđeno postojanje njihova inhibitornog učinka na klijavost konidija (Pokus 3 a,b).

Prethodno pripravljene otopine ekstrakata fenola (korijen, izbojak, list) filtrirane su (0,22 µm ny filter), a neposredno prije primjene homogenizirane su 30" na tresilici. U Petrijeve zdjelice (Ø 9 cm) hranjiva podloga je razlivena do ukupnog volumena (15 mL) konačne koncentracije ekstrakta fenola 50 mg/L. Hranjiva podloga PDA je razlivena u Petrijeve zdjelice pri 40 °C (Testo 106; Testo SE & Co. KGaA, Alton Hampshire, UK). Temperatura hranjive podloge bila je ujednačena za sve ispitane tretmane (jačina zagrijavanja 2; Magnetic stirrer with hot plate, MSH-300; Biosan SIA, Riga, Latvija). Hranjiva podloga je homogenizirana s otopinama ekstrakata fenola tako što su Petrijeve zdjelice položene na horizontalni rotator. Negativna kontrola se sastojala od hranjive podloge i otapala DMSO, a imala je jednaku konačnu koncentraciju kao i otopine ekstrakata fenola masline.

Neposredno prije postavljanja pokusa pripremljen je potreban inokulum (Poglavlje *Priprava inokuluma Verticillium dahliae*). Kružni isječci micelija (Ø 6 mm) izdvojeni su s rubnog dijela kolonije i iglom su preneseni u Petrijeve zdjelice (Ø 9 cm). Inkubacija je provedena pri 27 °C i 24 h tame (FOC215I Cooled incubator, 230V/50-60HZ; Velp Scientifica Srl., Usmate Velate, Italija) do dovršetka pokusa.

Protugljivični učinak otopine ekstrakata fenola masline na porast micelija izolata *V. dahliae* V-263 određen je nakon 10 dana trajanja pokusa (FPM-4). Porast gljive zabilježen je primjenom digitalnog fotoaparata (Nikon D750; Nikon Europe B.V., Amsterdam, Nizozemska) opremljenog makroobjektivom. Fotografije su spremljene u NEF formatu (4016 × 6016, veličine 25 – 26 MB). Po dovršetku pokusa, fotografije porasta micelija

analizirane su programom ImageJ (inačica programa v.1.53K; Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018).

Protugljivični učinak otopina ekstrakata fenola masline na porast micelija *V. dahliae* V-263 izražen je kao postotak inhibicije, a izračunat je po završetku pokusa (FPM-4) sljedećom formulom (Varo i sur., 2017):

$$\text{Postotak (\%)} \text{ inhibicije} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

gdje je (r) radijus kolonije fitopatogene gljive u prisutnosti otopine ekstrakta fenola, a (R) je maksimalni radijus kolonije *V. dahliae* V-263 inokulirane na negativnoj kontroli (DMSO).

Nakon 10 dana inkubacije, opisana su osnovna morfološka obilježja izolata *V. dahliae* V-263 izloženog otopinama ekstrakata fenola različitih vegetativnih organa masline te su uspoređeni s kontrolnim tretmanom (EF-B0) i negativnom kontrolom koja je sadržala samo otapalo DMSO. U obzir su uzeti boja i oblik kolonije, izgled micelija te prisutnost/izostanak formiranja mikrosklerocija.

### 3.3. Statistička analiza podataka

Gnojdbeni pokusi s N (Pokus 1) i s B (Pokus 2) bili su postavljeni po shemi slučajnog blokno rasporeda s po sedam gnojdbenih tretmana (N0 – N6; B0 – B6), u četiri ponavljanja. U oba pokusa provedena su vegetativna mjerenja ponovljena u tri perioda mjerenja i to nakon 70 (GPM-1), 110 (GPM-2) i 150 (GPM-3) dana od postavljanja pokusa. Uzimanje uzoraka vegetativnih organa masline (korijen, izbojak i list) za određivanje kemijskih svojstava provedeno je 150 dana od postavljanja pokusa (GPM-3).

Fitopatološki pokusi (Pokus 3 a,b; Pokus 4) postavljeni su po shemi potpuno slučajnog rasporeda u kojima je određen protugljivični učinak (% inhibicije) ekstrakata fenola svih uzoraka vegetativnih organa masline prikupljenih u Pokusu 1 i 2, na izolat *V. dahliae* V-263. U Pokusima 3 a,b ispitan je protugljivični učinak (% inhibicije) ekstrakata fenola na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263 u tri perioda mjerenja i to nakon jednog (FPM-1), dva (FPM-2) i tri (FPM-3) dana od postavljanja pokusa. U Pokusu 4 ispitan je protugljivični učinak (% inhibicije) ekstrakata fenola na porast micelija izolata *V. dahliae* V-263 nakon deset (FPM-4) dana od postavljanja pokusa.

U Pokusima 1 i 2 prikupljeni su podaci o morfološkim i kemijskim svojstvima:

- a) duljina, opseg, volumen i promjer korijena (GPM-3)
- b) duljina izbojka, broj internodija i broj listova po biljci (GPM-1, GPM-2, GPM-3)
- c) koncentracija N (Pokus 1) ili B (Pokus 2) i fenola u suhoj tvari korijena (GPM-3)

- d) koncentracija N (Pokus 1) ili B (Pokus 2) i fenola u suhoj tvari izbojka (GPM-3)  
 e) koncentracija N (Pokus 1) ili B (Pokus 2) i fenola u suhoj tvari lista (GPM-3)

U Pokusima 3 i 4 prikupljani su podaci o biološkim svojstvima:

- f) inhibicija klijavosti (% inhibicije) konidija *V. dahliae* (FPM-1, FPM-2, FPM-3) (Pokus 3 a,b)  
 g) inhibicija porasta (% inhibicije) micelija *V. dahliae* (FPM-4) (Pokus 4)

## ANOVA

**Model 1 (Pokus 1, 2)** primijenjen je za varijable (a, c, d, e) koje su analizirane prema linearnom modelu za slučajni blokni raspored:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + \varepsilon_{ijk}$$

$i = 1, 2, \dots, 7$  (broj tretiranja);  $j = 1, 2, \dots, 4$  (broj repeticija);  $k = 1, 2, \dots, 28$  (broj biljaka);

gdje su:

$y_{ijk}$  = observacija ijk

$\mu$  = opći prosjek

$\tau_i$  = fiksni učinak tretiranja i

$\rho_j$  = učinak repeticija

$\varepsilon_{ijk}$  = slučajna pogreška (reziduali)

**Model 2 (Pokus 4)** primijenjen je za varijable (g) koje su analizirane prema linearnom modelu za potpuno slučajni raspored:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, \dots, 7$  (broj tretiranja);  $j = 1, 2, \dots, 28$  (broj biljaka);

gdje su:

$y_{ij}$  = observacija ij

$\mu$  = opći prosjek

$\tau_i$  = fiksni učinak tretiranja i

$\varepsilon_{ijk}$  = slučajna greška (reziduali), varijanca između izmjera unutar biljaka

**Model 3 (Pokus 1, 2, 3)** primijenjen je za varijable (b, f), mjerene u različitim periodima mjerenja, prema linearnom modelu za potpuno slučajni raspored s ponovljenim mjerenjima:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + t_k + (\tau * t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

$i = 1, 2, \dots, 7$  (broj tretiranja);  $j = 1, 2, \dots, 28$  (broj biljaka);  $k = 1, 2, 3$  (broj perioda mjerenja)

$y_{ijk}$  = observacija  $ijk$

$\mu$  = opći prosjek

$\tau_i$  = fiksni učinak tretiranja  $i$

$\delta_{ij}$  = slučajna greška, tj. varijanca između biljaka unutar tretiranja

$t_k$  = fiksni učinak vremena (perioda mjerenja)  $k$

$(\tau^*t)_{ik}$  = učinak interakcije između tretiranja  $i$  i perioda mjerenja  $k$

$\varepsilon_{ijk}$  = slučajna greška (reziduali)

Za sve varijable sa signifikantnim F-testom primijenjen je Tukeyev post hoc test usporedbe srednjih vrijednosti za pojedinačne faktore ili njihove zajedničke interakcije.

### Korelacije

Primjenom Pearsonove korelacijske analize procijenjen je smjer i razina povezanosti između koncentracije N (g/kg ST) ili B (mg/kg ST) te koncentracije pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) određenih u vegetativnim organima masline (korijen, izbojak, list) pojedinog gnojidbenog pokusa (Vidović i sur., 2021). Korelacijska analiza je provedena za svaki gnojidbeni pokus zasebno (Pokus 1, Pokus 2).

### Diskriminantna analiza – PLS-DA

Razdvajanje gnojidbenog tretmana s N (N0 – N6) i gnojidbenog tretmana s B (B0 – B6) temeljem koncentracije N (g/kg ST) ili B (mg/kg ST) te ukupnih i pojedinačnih (hidroksitirozol, tirozol, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein) fenolnih spojeva (mg/100 g ST), određenih u vegetativnim organima masline (korijen, izbojak, list), provedeno je diskriminantnom analizom parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS-DA). Ova metoda osim svojstava PLS regresije uključuje i diskriminacijsku (kategorijsku) varijablu. Stoga, primjena diskriminativne analize omogućila je pronalaženje onih varijabli koje najvećim dijelom doprinose klasifikaciji. Model je temeljen na opisanim varijablama za koje su prikazane vrijednosti projekcije varijable (Pasković i sur., 2020).

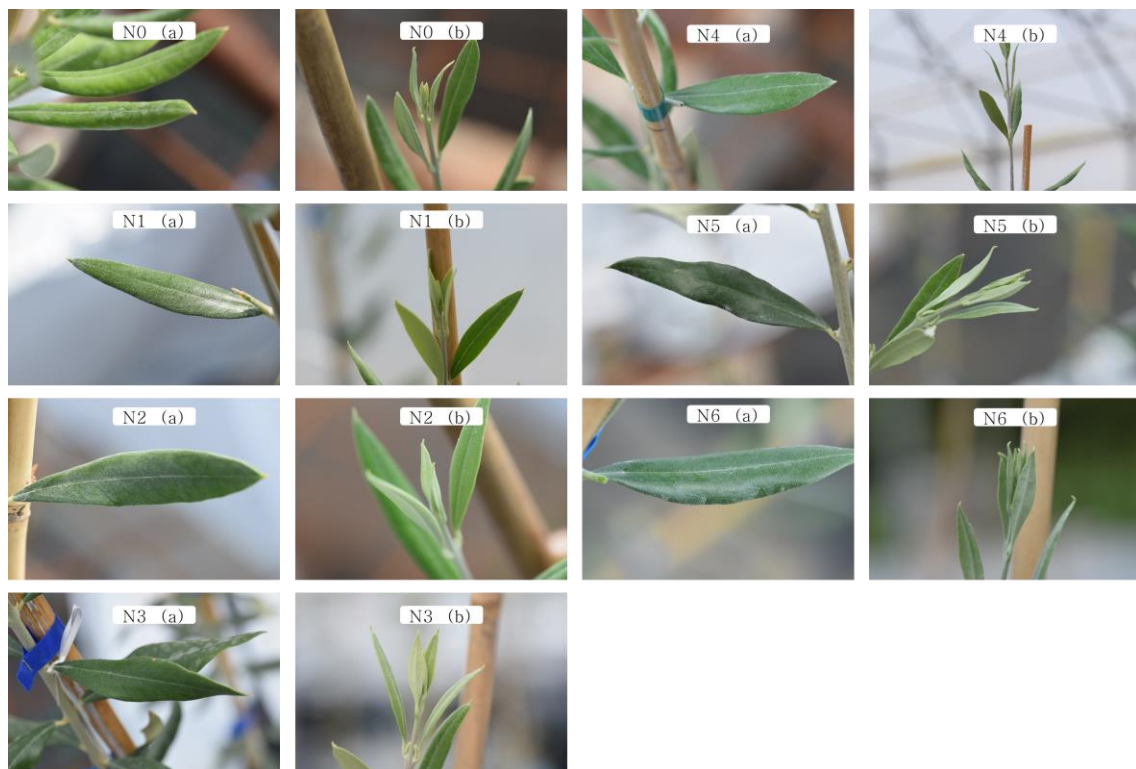
Statistička analiza podataka provedena je programom Statistica v.14.1.0. (<https://docs.tibco.com/products/tibco-statistica-14-1-0>).

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Gnojidbeni pokusi s dušikom i borom

#### 4.1.1. Vegetativna svojstva masline

Primjena gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6) i B (B0 – B6) utjecala je na vegetativna svojstva masline (Slika 5 – 6). Simptomi nedostatka N razvili su se na listovima gnojidbenog tretmana N0 (Slika 5) te na listovima maslina gnojidbenog tretmana B0 (Slika 6). U gnojidbenom tretmanu N0 simptomi nedostatka uočeni su na starijem lišću koje je bilo blijedo-zelene do žućkasto-zelene boje (Slika 5). U gnojidbenom tretmanu B0 mladice su na vršnom dijelu bile zakržljale, a vršno lišće bilo je blijedo-zelene boje dok je bazalno lišće zadržalo tamno zelenu boju (Slika 6). Lišće masline je u ostalim gnojidbenim tretmanima (N1 – N6, B1 – B6) bilo tamno zelene boje, a simptomi nedostatka ili suviška u navedenim su gnojidbenim tretmanima izostali.



Slika 5. Utjecaj gnojidbenih tretmana s dušikom (N0 – N6) na razvoj lista masline

Na fotografijama je prikazan list sa središnjeg (a) i vršnog dijela izbojka (b) masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman. Fotografije su snimljene nakon 150 dana trajanja pokusa.

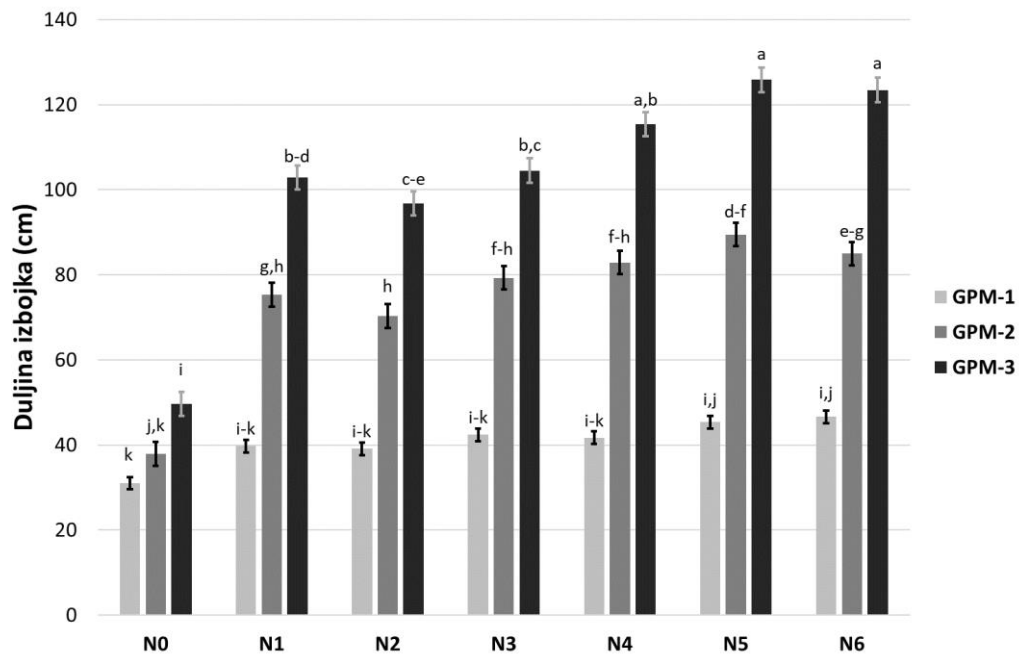




Slika 6. Utjecaj gnojidbenih tretmana s borom (B0 – B6) na razvoj lista masline

Na fotografijama je prikazan list sa središnjeg (a) i vršnog dijela izbojka (b) masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman. Fotografije su snimljene nakon 150 dana trajanja pokusa.

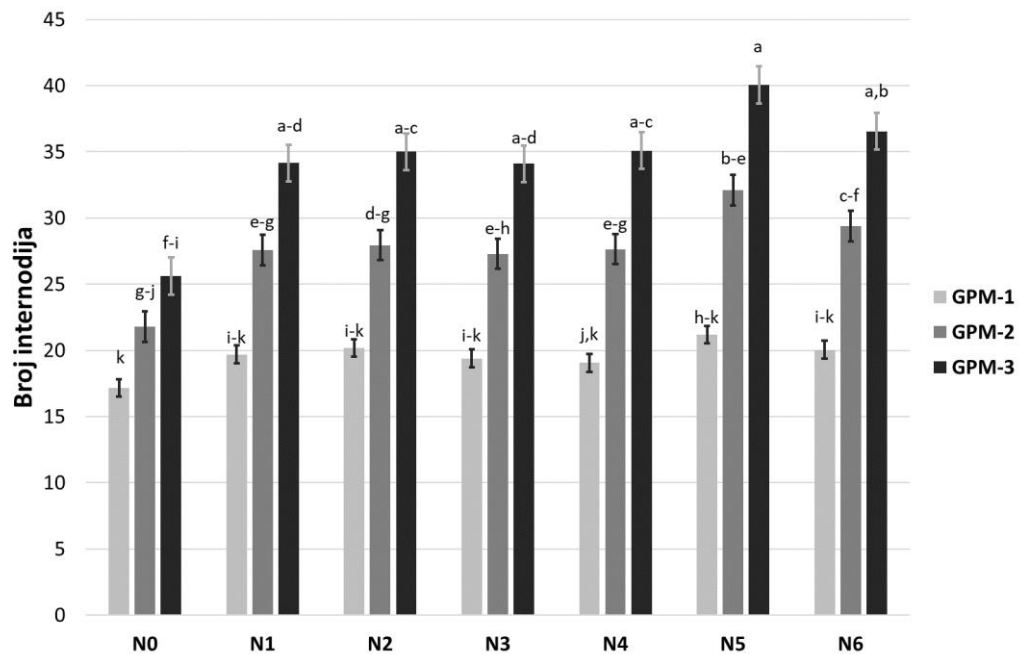
Značajna razine interakcije za period mjerenja i gnojidbeni tretman utvrđena je za sva istražena vegetativna svojstva u gnojidbenom pokusu s N (Grafikon 4 – 6). Duljina izbojka bila je značajno veća u gnojidbenim tretmanima N5 i N6 u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0, a nije se značajno razlikovala u odnosu na ostale gnojidbene tretmane s N (N1 – N4) pri prvom (GPM-1) periodu mjerenja (Grafikon 4). U periodima mjerenja koji su uslijedili (GPM-2, GPM-3) duljina izbojka bila je najmanja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0. Pri posljednjem periodu mjerenja (GPM-3) duljina izbojka bila je značajno veća u gnojidbenim tretmanima N5 i N6 u odnosu na gnojidbene tretmane N0 – N3, a nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbeni tretman N4.



Grafikon 4. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (N0 – N6) i period mjerjenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na duljinu izbojka (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

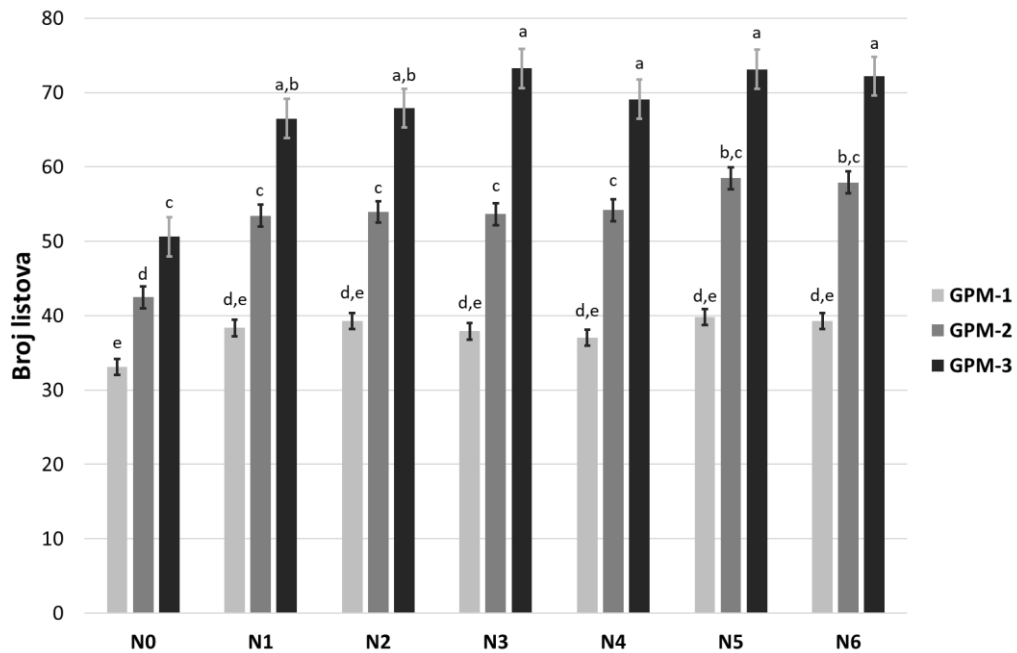
Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i gnojidbeni tretman), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama GPM-1 – GPM-3 (70, 110, 150 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja vegetativnih svojstava masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman.

Broj internodija nije se značajno razlikovao između promatranih gnojidbenih tretmana (N0 – N6) u prvom (GPM-1) periodu mjerjenja (Grafikon 5). U drugom (GPM-2) periodu mjerena broj internodija bio je značajno manji u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbene tretmane N5 i N6, a nije se značajno razlikovao u odnosu na ostale gnojidbene tretmane (N1 – N4). Broj internodija je u trećem (GPM-3) periodu mjerjenja bio najmanji u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0, a nije se značajno razlikovao između gnojidbenih tretmana N1 – N6.



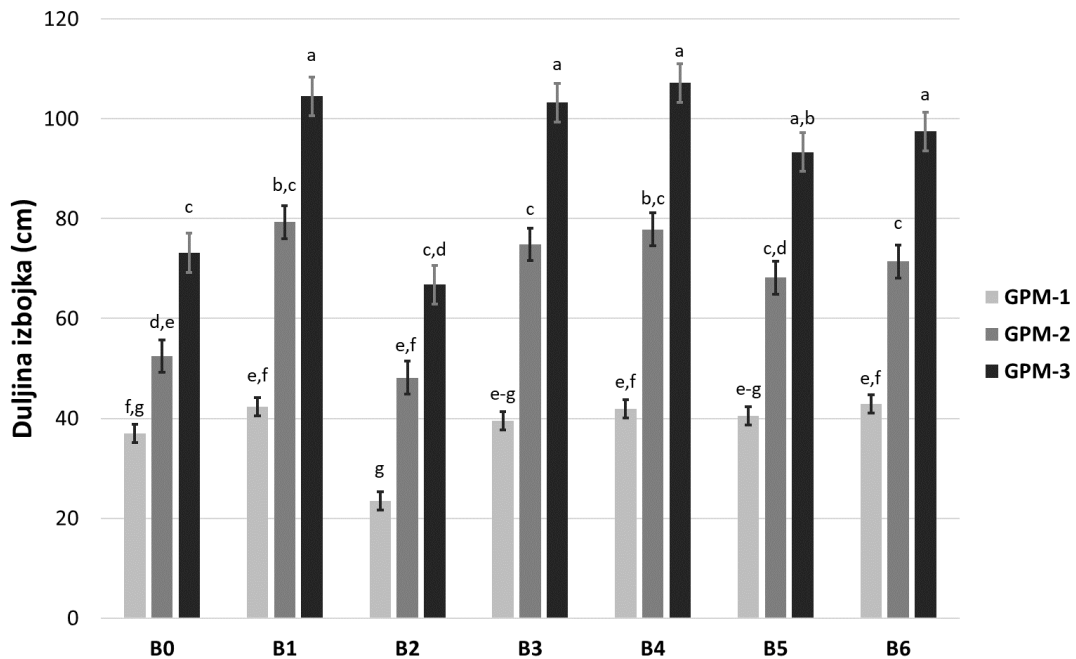
Grafikon 5. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (N0 – N6) i period mjerjenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj internodija masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ ) Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i gnojidbeni tretman), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama GPM-1 – GPM-3 (70, 110, 150 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja vegetativnih svojstava masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman.

Broj listova se u prvom (GPM-1) periodu mjerjenja nije značajno razlikovao između gnojidbenih tretmana N0 – N6 (Grafikon 6). U drugom (GPM-2) periodu mjerena broj listova je bio najmanji u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0, a nije se značajno razlikovao između gnojidbenih tretmana N1 – N6. Broj listova je u trećem (GPM-3) periodu mjerjenja bio najmanji u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0, a značajna razlika u broju listova nije utvrđena između gnojidbenih tretmana N1 – N6.



Grafikon 6. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (N0 – N6) i period mjerjenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj listova masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ ). Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i gnojidbeni tretman), a iznosila je  $p = 0,001$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama GPM-1 – GPM-3 (70, 110, 150 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja vegetativnih svojstava masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman.

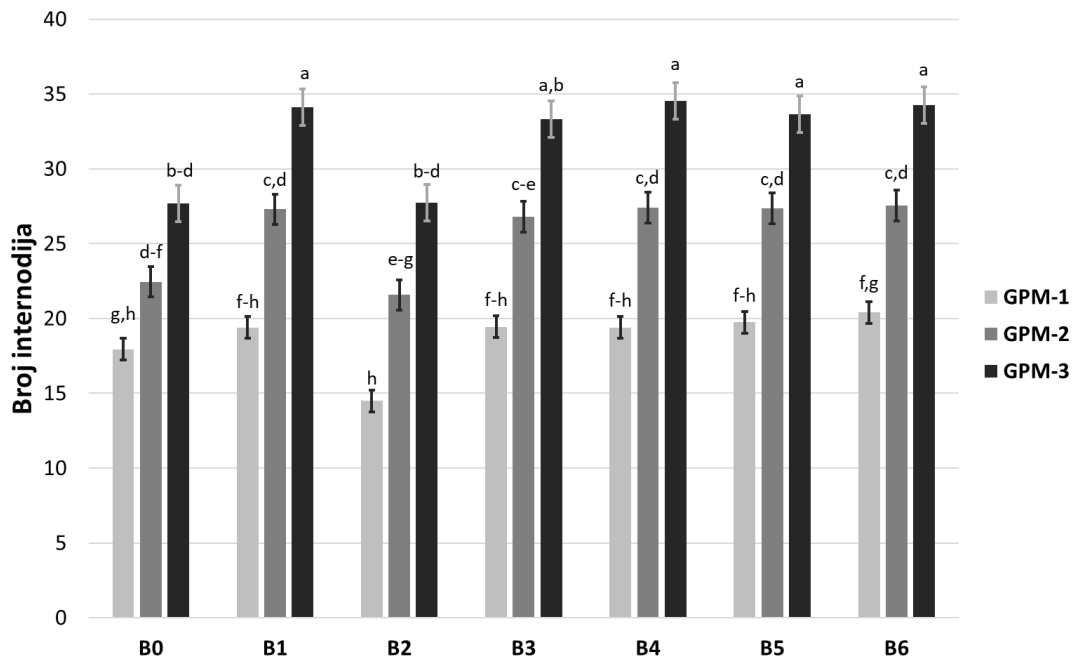
U gnojidbenom pokusu s B utvrđena je značajna razina interakcije za period mjerjenja i gnojidbeni tretman za duljinu izbojka, broj internodija i broj listova masline (Grafikon 7 – 9). Duljina izbojka nije se značajno razlikovala između kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 i ostalih gnojidbenih tretmana (B1 – B6) u prvom (GPM-1) periodu mjerjenja (Grafikon 7). U navedenom je periodu mjerjenja (GPM-1) duljina izbojka bila značajno veća u gnojidbenom tretmanu B1 u odnosu na gnojidbeni tretman B2. Duljina izbojka bila je značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na gnojidbene tretmane B1, B3, B4 i B6, a nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbene tretmane B2 i B5 u drugom periodu mjerjenja (GPM-2). Pri posljednjem (GPM-3) periodu mjerjenja duljina izbojka bila je značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na gnojidbene tretmane B1 te B3 – B6, a nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbeni tretman B2.



Grafikon 7. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (B0 – B6) i period mjerjenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na duljinu izbojka masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerjenja (interakcija period mjerjenja i gnojidbeni tretman), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama GPM-1 – GPM-3 (70, 110, 150 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja vegetativnih svojstava masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman.

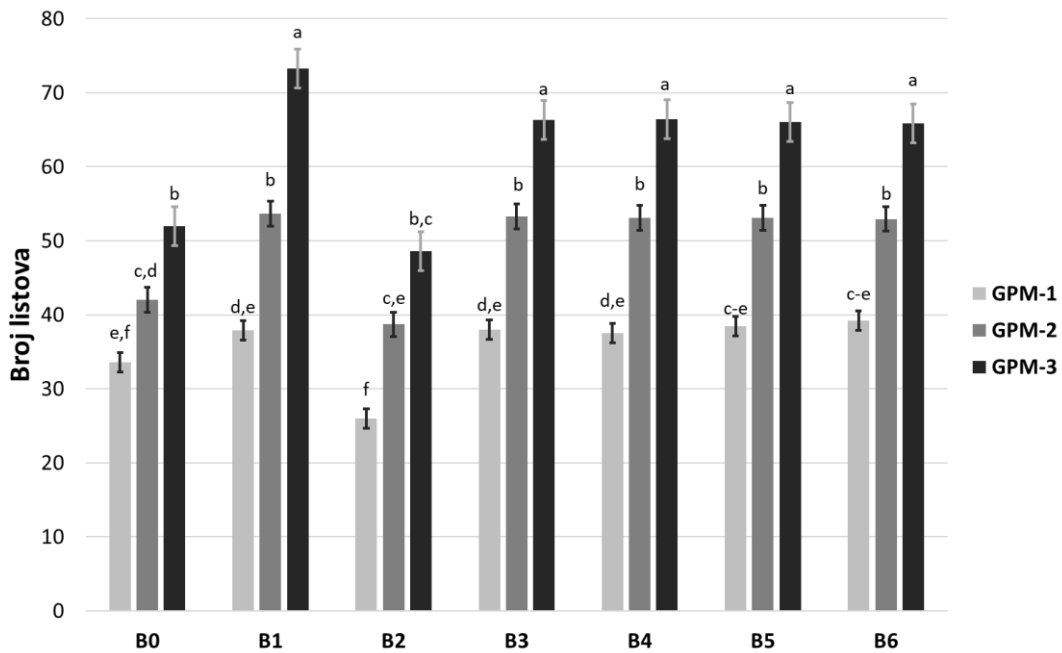
U prvom i drugom (GPM-1, GPM-2) periodu mjerjenja nije utvrđena značajna razlika između istraženih gnojidbenih tretmana (B0 – B6) za broj internodija (Grafikon 8). Broj internodija je u trećem (GPM-3) periodu mjerjenja bio značajno manji u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 i tretmanu B1 u odnosu na gnojidbene tretmane B1 te B4 – B6, a nije se značajno razlikovao u odnosu na gnojidbeni tretman B3.



Grafikon 8. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (B0 – B6) i period mjerjenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj internodija masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

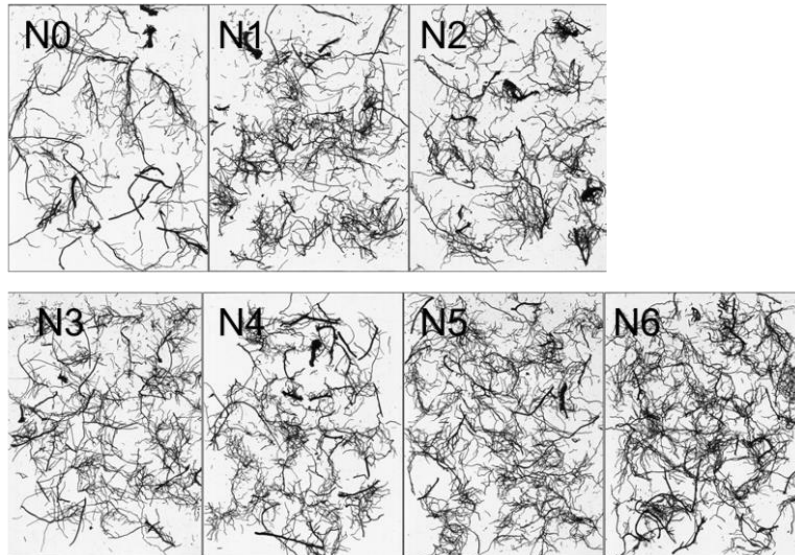
Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i gnojidbeni tretman), a iznosila je  $p = 0,007$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama GPM-1 – GPM-3 (70, 110, 150 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja vegetativnih svojstava masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman.

Broj listova se u prvom (GPM-1) periodu mjerjenja nije značajno razlikovao između kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 i ostalih gnojidbenih tretmana (B1 – B6), dok je gnojidbeni tretman B2 imao značajno manji broj listova u odnosu na gnojidbene tretmane B1 te B3 – B6 (Grafikon 9). U drugom (GPM-2) periodu mjerjenja broj listova bio značajno manji u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na gnojidbene tretmane B1 te B3 – B6, a nije se značajno razlikovao u odnosu na gnojidbeni tretman B2. U trećem (GPM-3) periodu mjerjenja gnojidbeni tretmani B0 i B2 imali su značajno manji broj listova u odnosu na sve ostale istražene gnojidbene tretmane (B1, B3 – B6).



Grafikon 9. Utjecaj interakcije gnojidbeni tretman (B0 – B6) i period mjerjenja (GPM-1, GPM-2, GPM-3) na broj listova masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )  
 Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i gnojidbeni tretman), a iznosila je  $p = 0,009$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama GPM-1 – GPM-3 (70, 110, 150 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja vegetativnih svojstava masline. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman.

Primjena gnojidbenih tretmana s N (N0 – N4) značajno je utjecala na duljinu, površinu i volumen korijena masline (Slika 7, Tablica 1). Primjenom gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6) nije utvrđena značajna razlika u promjeru korijena masline (Tablica 1). Duljina korijena je bila značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbene tretmane N5 i N6, a nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbene tretmane N1 – N4. Značajna razlika u površini korijena nije utvrđena između kontrolnog gnojidbenog tretmana N0 i gnojidbenih tretmana N2 – N4. Površina korijena bila je značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbene tretmane N1, N5 i N6. Volumen korijena bio je značajno veći u gnojidbenim tretmanima N5 i N6 u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0. Volumen korijena nije se značajno razlikovao između kontrolnog gnojidbenog tretmana te gnojidbenih tretmana N1 – N4.



Slika 7. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana s dušikom (N0 – N6) na razvoj korijena masline

Prikazani su primjeri skeniranih dijelova korijena u gnojidbenim pokusima s dušikom (N). Pojedini su tretmani zbog povećanog volumena korijena skenirani u dva dijela, a u navedenom je primjeru prikazan samo jedan. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman. Prikazane fotografije skeniranih korijena snimljene su po dovršetku pokusa.

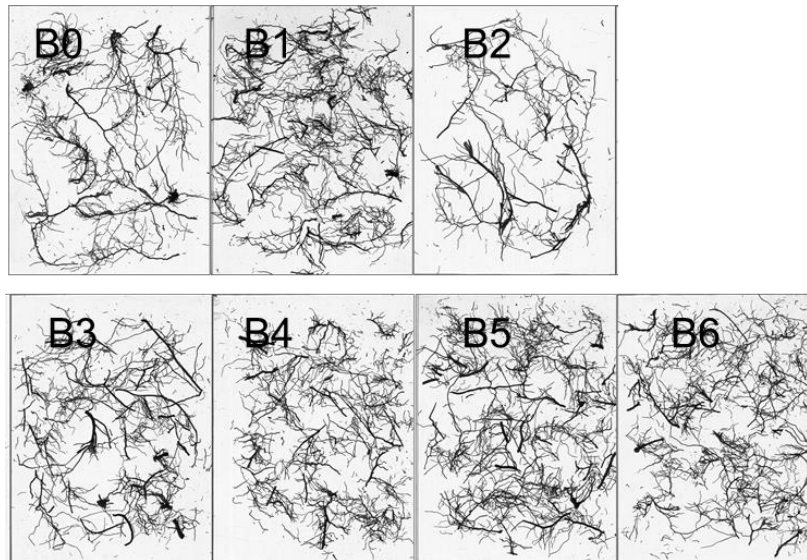
Tablica 1. Utjecaj gnojidbenih tretmana (N0 – N6) na duljinu, površinu, promjer i volumen korijena masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednjih vrijednosti,  $n = 4$ )

	Duljina (cm)	Površina (cm <sup>2</sup> )	Promjer (mm)	Volumen (cm <sup>3</sup> )
<b>Gnojidbeni tretman</b>				
N0	1716,19 $\pm$ 74,45 <sup>b</sup>	352,38 $\pm$ 19,01 <sup>c</sup>	0,65 $\pm$ 0,01	5,78 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>
N1	2353,93 $\pm$ 129,24 <sup>a,b</sup>	492,36 $\pm$ 24,63 <sup>a,b</sup>	0,66 $\pm$ 0,01	8,21 $\pm$ 0,39 <sup>a-c</sup>
N2	2072,46 $\pm$ 170,87 <sup>b</sup>	446,33 $\pm$ 33,66 <sup>b,c</sup>	0,69 $\pm$ 0,01	7,67 $\pm$ 0,52 <sup>a-c</sup>
N3	2226,73 $\pm$ 105,1 <sup>a,b</sup>	457,76 $\pm$ 23,28 <sup>a-c</sup>	0,65 $\pm$ 0,01	7,5 $\pm$ 0,44 <sup>b,c</sup>
N4	2219,91 $\pm$ 63,38 <sup>a,b</sup>	459,49 $\pm$ 17,45 <sup>a-c</sup>	0,66 $\pm$ 0,01	7,58 $\pm$ 0,37 <sup>b,c</sup>
N5	2758,59 $\pm$ 140,1 <sup>a</sup>	591,19 $\pm$ 38,39 <sup>a</sup>	0,68 $\pm$ 0,02	10,11 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>
N6	2851,81 $\pm$ 225,06 <sup>a</sup>	595,69 $\pm$ 43,8 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,01	9,92 $\pm$ 0,68 <sup>a,b</sup>
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	n.s.	< 0,001

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance, pri čemu oznaka n.s. ukazuje na vrijednost  $p > 0,05$ . Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman.

Gnojidbeni tretmani s B (B0 – B6) značajno su utjecali na duljinu, površinu i volumen korijena, a izostao je za promjer korijena (Slika 8, Tablica 2). Značajne razlike između kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 te gnojidbenih tretmana B1 – B6 nisu utvrđene za istražene varijable (Tablica 2). Duljina i površina korijena bile su značajno veće u gnojidbenim tretmanima B1, B3, B5 i B6 u odnosu na tretman B2, dok se nisu značajno razlikovale od tretmana B0 i B4. Volumen korijena bio je značajno veći u gnojidbenim tretmanima B3, B5 i B6 u odnosu na gnojidbeni tretman B2, a navedeni se tretmani nisu značajno razlikovali od gnojidbenih tretmana B0, B1 i B4.





Slika 8. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana s borom (B0 – B6) na razvoj korijena masline. Prikazani su primjeri skeniranih dijelova korijena u gnojidbenim pokusima s borom (B). Pojedini su tretmani zbog povećanog volumena korijena skenirani u dva dijela, a u navedenom je primjeru prikazan samo jedan. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman. Prikazane fotografije skeniranih korijena snimljene su po dovršetku pokusa.

Tablica 2. Utjecaj gnojidbenih tretmana (B0 – B6) na duljinu, površinu, promjer i volumen korijena masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednjih vrijednosti,  $n = 4$ )

	Duljina (cm)	Površina (cm <sup>2</sup> )	Promjer (mm)	Volumen (cm <sup>3</sup> )
<b>Gnojidbeni tretman</b>				
B0	1709,78 $\pm$ 62,58 <sup>a,b</sup>	367,39 $\pm$ 9,31 <sup>a,b</sup>	0,68 $\pm$ 0,01	6,3 $\pm$ 0,13 <sup>a,b</sup>
B1	2226,73 $\pm$ 105,1 <sup>a</sup>	457,76 $\pm$ 23,28 <sup>a</sup>	0,65 $\pm$ 0,01	7,5 $\pm$ 0,44 <sup>a,b</sup>
B2	1406,02 $\pm$ 194,57 <sup>b</sup>	307,07 $\pm$ 41,64 <sup>b</sup>	0,69 $\pm$ 0,02	5,36 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>
B3	2290,62 $\pm$ 169,97 <sup>a</sup>	479,62 $\pm$ 30,99 <sup>a</sup>	0,66 $\pm$ 0,01	8,02 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
B4	2058,64 $\pm$ 158,06 <sup>a,b</sup>	429,93 $\pm$ 33,42 <sup>a,b</sup>	0,67 $\pm$ 0,01	7,17 $\pm$ 0,61 <sup>a,b</sup>
B5	2291,61 $\pm$ 177,81 <sup>a</sup>	480,13 $\pm$ 40,63 <sup>a</sup>	0,67 $\pm$ 0,01	8,04 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
B6	2285,63 $\pm$ 111,53 <sup>a</sup>	474,8 $\pm$ 21,69 <sup>a</sup>	0,66 $\pm$ 0,01	7,87 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
<i>p</i>	0,001	0,003	n.s.	0,015

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance, pri čemu oznaka n.s. ukazuje na vrijednost  $p > 0,05$ . Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman.

#### 4.1.2. Koncentracija dušika i bora u maslini

Primjena gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6) značajno je utjecala na koncentraciju N (g/kg ST) u svim istraženim vegetativnim organima masline (Tablica 3). U korijenu je koncentracija N bila najveća u gnojidbenom tretmanu N6, dok je najmanja koncentracija N u korijenu zabilježena u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0. U izbojku je koncentracija N bila značajno veća u gnojidbenim tretmanima N5 i N6 u odnosu na sve ostale istražene gnojidbene tretmane (N0 – N4). Koncentracija N u izbojku nije se razlikovala između kontrolnog gnojidbenog tretmana N0 i gnojidbenih tretmana N1 – N3. Najviša koncentracija N u listu utvrđena je u gnojidbenom tretmanu N6, dok je najmanja koncentracija utvrđena u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0.

Tablica 3. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana (N0 – N6) na koncentraciju dušika (N g/kg ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4)

Gnojidbeni tretmani	Koncentracija N (g/kg ST)		
	Korijen	Izbojak	List
N0	7,3 $\pm$ 0,09 <sup>f</sup>	4,9 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	7,97 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>
N1	13,7 $\pm$ 0,13 <sup>e</sup>	5,95 $\pm$ 0,21 <sup>b,c</sup>	20,71 $\pm$ 1,17 <sup>c</sup>
N2	14,8 $\pm$ 0,29 <sup>d</sup>	6,5 $\pm$ 0,21 <sup>b,c</sup>	22,78 $\pm$ 0,68 <sup>b,c</sup>
N3	14,2 $\pm$ 0,09 <sup>d,e</sup>	5,98 $\pm$ 0,48 <sup>b,c</sup>	20,81 $\pm$ 0,92 <sup>c</sup>
N4	15,7 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	6,58 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	22,63 $\pm$ 1,14 <sup>b,c</sup>
N5	17,4 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	8,6 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	25,93 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
N6	20 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	10,13 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	30,25 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost (*p*) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman. Oznaka ST označava suhu masu.

Značajan utjecaj na koncentraciju B (mg/kg ST) u korijenu, izbojku i listu masline utvrđen je primjenom gnojidbenih tretmana s B (Tablica 4). U korijenu je najveća koncentracija B utvrđena u gnojidbenom tretmanu B6. Koncentracija B u korijenu kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbene tretmane B1 i B2, a bila je značajno manja u odnosu na gnojidbene tretmane B3 – B6.

U izbojku je koncentracija B bila najveća u gnojidbenom tretmanu B6, dok je kontrolni gnojidbeni tretman B0 imao značajno manju koncentraciju B u odnosu na gnojidbene tretmane B1 te B3 – B6. U listu je koncentracija B bila najveća u gnojidbenom tretmanu B6. Koncentracija B u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 bila je značajno manja u odnosu na gnojidbene tretmane B3 – B6, a nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbene tretmane B1 – B2.

Tablica 4. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana (B0 – B6) na koncentraciju bora (B mg/kg ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška srednjih vrijednosti,  $n = 4$ )

Gnojidbeni tretmani	Koncentracija B (mg/kg ST)		
	Korijen	Izbojak	List
B0	7 $\pm$ 0,07 <sup>e</sup>	5,88 $\pm$ 0,24 <sup>f</sup>	0,05 $\pm$ 0 <sup>e</sup>
B1	9,36 $\pm$ 0,15 <sup>d,e</sup>	11,86 $\pm$ 0,51 <sup>d</sup>	6,81 $\pm$ 0,12 <sup>d,e</sup>
B2	10,95 $\pm$ 0,38 <sup>d,e</sup>	7,43 $\pm$ 0,23 <sup>e,f</sup>	6,88 $\pm$ 0,26 <sup>d,e</sup>
B3	13,26 $\pm$ 0,4 <sup>c,d</sup>	9,22 $\pm$ 0,17 <sup>e</sup>	11,98 $\pm$ 0,36 <sup>c,d</sup>
B4	18,69 $\pm$ 1,92 <sup>b,c</sup>	16,71 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>	20,13 $\pm$ 2,79 <sup>c</sup>
B5	22,14 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>	25,82 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>	34,45 $\pm$ 1,49 <sup>b</sup>
B6	38,73 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>	42,62 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	95,87 $\pm$ 5,18 <sup>a</sup>
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance. Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman. Oznaka ST označava suhu masu.

#### 4.1.3. Koncentracija fenolnih spojeva u maslini

Gnojidbeni tretmani s N (N0 – N6) značajno su utjecali na koncentraciju većine istraženih pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u korijenu, izbojku i listu masline (Tablica 5). Izuzetak je bio fenolni spoj hidroksitirozol za čiju koncentraciju u korijenu nije utvrđena značajna razlika između istraženih gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6). Primjena gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6) značajno je utjecala na koncentraciju ukupnih fenola (mg/100 g ST) u svim istraženim vegetativnim organima masline (Tablica 5).

U izbojku i listu je kontrolni gnojidbeni tretman N0 imao značajno veću koncentraciju hidroksitirozola u odnosu na gnojidbeni tretman N3 (Tablica 5). U izbojku je koncentracija hidroksitirozola bila značajno veća u gnojidbenom tretmanu N5 u odnosu na gnojidbene tretmane N1 – N3. U listu je značajno veća koncentracija hidroksitirozola utvrđena u gnojidbenom tretmanu N3 u odnosu na gnojidbene tretmane N0, N5 i N6. Koncentracija tirozola u korijenu bila je značajno veća u gnojidbenom tretmanu N3 u odnosu na gnojidbene tretmane N1 – N6, dok je kontrolni gnojidbeni tretman N0 imao značajno veću koncentraciju tirozola u odnosu na gnojidbeni tretman N4. U izbojku je koncentracija tirozola bila značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbeni tretman N2, dok se u odnosu na ostale gnojidbene tretmane njegova koncentracija nije značajno razlikovala (gnojidbeni tretmani N1, N3 – N6). U listu je koncentracija tirozola bila značajno veća u gnojidbenim tretmanima N1 te N4 – N6 u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0. Koncentracija verbaskozida u korijenu bila je najveća u gnojidbenom tretmanu N3, dok se njegova koncentracija nije značajno razlikovala između kontrolnog i gnojidbenih tretmana N1 – N2 te N4 – N6. Koncentracija verbaskozida u izbojku nije se značajno

razlikovala između istraženih gnojidbenih tretmana (N0 – N6). U listu je koncentracija verbaskozida bila značajno veća u gnojidbenim tretmanima N0 – N4 u odnosu na gnojidbeni tretman N6, a koncentracija u gnojidbenom tretmanu N0 nije se značajno razlikovala u odnosu na gnojidbene tretmane N1 – N5. Koncentracija luteolina-7-O-glukozida u korijenu bila je značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbeni tretman N6. U izbojku je koncentracija luteolina-7-O-glukozida bila značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbene tretmane N3, N5 i N6, dok se u odnosu na ostale gnojidbene tretmane nije značajno razlikovala. Koncentracija luteolina-7-O-glukozida u listu bila je značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 u odnosu na gnojidbene tretmane N1 – N2 te N4 – N6. U korijenu je koncentracija oleuropeina bila značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu u odnosu na gnojidbene tretmane N4 – N6, dok je u izbojku njegova koncentracija bila najveća u gnojidbenom tretmanu N0. U listu je koncentracija oleuropeina bila značajno veća u gnojidbenim tretmanima N1 – N4 u odnosu na gnojidbeni tretman N6. Kontrolni gnojidbeni tretman N0 imao je značajno manju koncentraciju oleuropeina u odnosu na gnojidbeni tretman N4. Koncentracija ukupnih fenola u korijenu bila je značajno veća u gnojidbenim tretmanima N0 – N3 u odnosu na gnojidbeni tretman N6, dok je u izbojku njihova koncentracija bila najveća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0. U listu je koncentracija ukupnih fenola bila značajno veća u gnojidbenim tretmanima N2 – N4 u odnosu na gnojidbeni tretman N6, dok se kontrolni gnojidbeni tretman N0 nije značajno razlikovao u odnosu na ostale istražene gnojidbene tretmane (N1 – N6).

Tablica 5. Utjecaj primjene gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6) na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4)

Gnojidbeni tretmani	Hidroksitirozol	Tirozol	Verbaskozid	Luteolin-7-O-glukozid	Oleuropein	Ukupni fenoli
Korijen						
N0	6,26 ± 0,45	13,1 ± 0,44 <sup>a,b</sup>	164,61 ± 20,48 <sup>b</sup>	7,58 ± 0,43 <sup>a,b</sup>	2669,91 ± 133,28 <sup>a</sup>	1799,86 ± 37,21 <sup>a</sup>
N1	6,11 ± 1,08	9,2 ± 0,96 <sup>b,c</sup>	72,08 ± 17,59 <sup>b</sup>	6,05 ± 1,07 <sup>b,c</sup>	1982,89 ± 452,5 <sup>a</sup>	1467,09 ± 269 <sup>a</sup>
N2	6,64 ± 1,32	9,3 ± 1,47 <sup>b,c</sup>	52,27 ± 16,13 <sup>b</sup>	5,32 ± 0,56 <sup>b,c</sup>	1850,57 ± 496,97 <sup>a,b</sup>	1316,89 ± 287,95 <sup>a,b</sup>
N3	4,01 ± 0,33	16,82 ± 2,08 <sup>a</sup>	431,91 ± 124,29 <sup>a</sup>	9,59 ± 1,08 <sup>a</sup>	1847,32 ± 125,83 <sup>a,b</sup>	1691,4 ± 98,42 <sup>a</sup>
N4	4,69 ± 0,14	5,96 ± 0,26 <sup>c</sup>	16,08 ± 1,98 <sup>b</sup>	4,91 ± 0,78 <sup>b,c</sup>	575,52 ± 99,45 <sup>b,c</sup>	643,36 ± 41,39 <sup>b,c</sup>
N5	5,61 ± 1,07	7,34 ± 0,68 <sup>c</sup>	9,37 ± 0,77 <sup>b</sup>	4,64 ± 0,23 <sup>b,c</sup>	455,06 ± 141,45 <sup>c</sup>	622,74 ± 86,66 <sup>b,c</sup>
N6	3,34 ± 0,54	7,59 ± 0,62 <sup>c</sup>	9,39 ± 1,73 <sup>b</sup>	2,82 ± 0,39 <sup>c</sup>	282,38 ± 163,66 <sup>c</sup>	441,9 ± 79,63 <sup>c</sup>
<i>p</i>	n.s.	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Izbojak						
N0	26,85 ± 2,59 <sup>a-c</sup>	18,79 ± 2,12 <sup>a</sup>	150,32 ± 25,88	19,42 ± 1,55 <sup>a</sup>	1134,28 ± 82,96 <sup>a</sup>	2355,92 ± 79,85 <sup>a</sup>
N1	17,9 ± 1,37 <sup>b-c</sup>	11,49 ± 1,39 <sup>a,b</sup>	124,87 ± 24,83	15,51 ± 0,96 <sup>a,b</sup>	111,87 ± 12,06 <sup>b</sup>	1371,87 ± 85,61 <sup>c</sup>
N2	19,51 ± 0,86 <sup>c-d</sup>	10,69 ± 1,18 <sup>b</sup>	136,24 ± 9,3	16,44 ± 0,59 <sup>a,b</sup>	173,73 ± 34,57 <sup>b</sup>	1404,26 ± 59,3 <sup>c</sup>
N3	13,85 ± 0,32 <sup>d</sup>	12,52 ± 0,74 <sup>a,b</sup>	152,87 ± 4	8,61 ± 1,31 <sup>c</sup>	211,5 ± 14,72 <sup>b</sup>	1390,87 ± 48,68 <sup>c</sup>
N4	24,45 ± 2,29 <sup>a-c</sup>	12,74 ± 1,62 <sup>a,b</sup>	245,56 ± 25,25	16,49 ± 0,66 <sup>a,b</sup>	233,68 ± 34,6 <sup>b</sup>	1794,56 ± 103,57 <sup>b,c</sup>
N5	31,54 ± 1,26 <sup>a</sup>	16,24 ± 2,27 <sup>a,b</sup>	203,7 ± 48,3	12,27 ± 0,51 <sup>b,c</sup>	218,84 ± 32,47 <sup>b</sup>	1868,65 ± 124,89 <sup>b</sup>
N6	27,67 ± 3,73 <sup>a,b</sup>	18,44 ± 2,07 <sup>a,b</sup>	129,88 ± 23,43	10,52 ± 0,85 <sup>c</sup>	110,92 ± 26,9 <sup>b</sup>	1432,88 ± 144,43 <sup>b,c</sup>
<i>p</i>	< 0,001	0,009	0,034	< 0,001	< 0,001	< 0,001
List						
N0	28,43 ± 0,76 <sup>b,c</sup>	8,95 ± 0,39 <sup>d</sup>	312,48 ± 51,67 <sup>a,b</sup>	433,03 ± 13,96 <sup>a</sup>	7487,95 ± 697,82 <sup>b,c</sup>	5276,8 ± 290,49 <sup>a,b</sup>
N1	29,58 ± 1,93 <sup>a-c</sup>	17,4 ± 1,96 <sup>b,c</sup>	323,07 ± 33,7 <sup>a,b</sup>	324,81 ± 9,48 <sup>c,d</sup>	8647,41 ± 842,84 <sup>a,b</sup>	5406,95 ± 495,76 <sup>a,b</sup>
N2	34,34 ± 2,02 <sup>a,b</sup>	13,67 ± 1,37 <sup>c,d</sup>	444,5 ± 51,76 <sup>a</sup>	315,83 ± 12,65 <sup>c,d</sup>	10293,7 ± 474,03 <sup>a,b</sup>	6281,62 ± 374,13 <sup>a</sup>
N3	36,58 ± 0,65 <sup>a</sup>	13,28 ± 1,1 <sup>c,d</sup>	373,23 ± 12,93 <sup>a</sup>	385,06 ± 10,04 <sup>a,b</sup>	10182,19 ± 350,23 <sup>a,b</sup>	6284,41 ± 75,69 <sup>a</sup>
N4	30,56 ± 1,49 <sup>a,b</sup>	15,71 ± 0,58 <sup>b,c</sup>	381,62 ± 40,96 <sup>a</sup>	353,79 ± 7,32 <sup>b,c</sup>	11593,25 ± 1009,48 <sup>a</sup>	6704,48 ± 493,19 <sup>a</sup>
N5	23,23 ± 1,37 <sup>c</sup>	20,5 ± 1,89 <sup>a,b</sup>	164,2 ± 19,28 <sup>b,c</sup>	319,75 ± 13,76 <sup>c,d</sup>	7237,47 ± 971,77 <sup>b,c</sup>	5091,13 ± 381,24 <sup>a,b</sup>
N6	27,95 ± 2,13 <sup>b,c</sup>	24,68 ± 0,61 <sup>a</sup>	106,87 ± 20,23 <sup>c</sup>	290,86 ± 5,94 <sup>d</sup>	4210,53 ± 640,92 <sup>c</sup>	4167,18 ± 192,3 <sup>b</sup>
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance, pri čemu oznaka n.s. ukazuje na vrijednost  $p > 0,05$ . Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman. Oznaka ST označava suhu masu.

U gnojidbenim tretmanima s N (N0 – N6) utvrđena je jaka ili vrlo jaka povezanost između koncentracije N (g/kg ST) u korijenu te koncentracije (mg/100 g ST) luteolina-7-O-glukozida ( $r = -0,578$ ), oleuropeina ( $r = -0,78$ ) i ukupnih fenolnih spojeva ( $r = -0,74$ ) utvrđenih u korijenu masline (Tablica 6). U korijenu je utvrđena srednja ili slaba povezanost između koncentracije N te koncentracije hidroksitirozola ( $r = -0,382$ ) i tirozola ( $r = -0,484$ ), dok je povezanost između koncentracije N i verbaskozida u korijenu izostala. U izbojku je utvrđena jaka povezanost između koncentracije N te koncentracije luteolina-7-O-glukozida ( $r = -0,527$ ) i oleuropeina ( $r = -0,503$ ), dok je povezanost između koncentracije N i ostalih fenolnih spojeva u izbojku izostala. Vrlo jaka povezanost utvrđena je između koncentracije N u listu te koncentracije tirozola ( $r = 0,811$ ) i luteolina-7-O-glukozida ( $r = -0,826$ ). U navedenom je vegetativnom organu masline između koncentracije N i verbaskozida ( $r = -0,376$ ) utvrđena slaba povezanost, dok je povezanost između koncentracije N i ostalih istraženih fenolnih spojeva u listu izostala.

Tablica 6. Povezanost između koncentracije dušika (N g/kg ST) i koncentracije fenolnih spojeva (mg/100 g ST) utvrđenih u vegetativnim organima masline (korijen, izbojak, list) istraženih gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6)

Dušik	Hidroksitirozol	Tirozol	Verbaskozid	Luteolin-7-O-glukozid	Oleuropein	Ukupni fenoli
<b>Koncentracija u gnojidbenim tretmanima N0 – N6</b>						
Korijen						
Korijen	$r = -0,382$ $p = 0,045$	$r = -0,484$ $p = 0,009$	$r = -0,335$ n.s.	$r = -0,578$ $p = 0,001$	$r = -0,78$ $p < 0,001$	$r = -0,74$ $p < 0,001$
Izbojak						
Izbojak	$r = 0,357$ n.s.	$r = 0,192$ n.s.	$r = -0,025$ n.s.	$r = -0,527$ $p = 0,004$	$r = -0,503$ $p = 0,006$	$r = -0,315$ n.s.
List						
List	$r = -0,14$ n.s.	$r = 0,811$ $p < 0,001$	$r = -0,376$ $p = 0,048$	$r = -0,826$ $p < 0,001$	$r = -0,205$ n.s.	$r = -0,2$ n.s.

Prikazani su Pearsonovi korelacijski koeficijenti ( $n = 28$ ). Vrijednosti su prikazane kako slijedi: za svako je svojstvo u gornjem retku prikazan korelacijski koeficijent ( $r$ ), a u donjem je retku prikazana pripadajuća razina signifikantnosti ( $p$ ). Oznaka n.s. – nije značajno, ukazuje na vrijednost  $p > 0,05$ . Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama N0 – N6, gdje N0 označava tretman s najnižom a N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom dušika (N). Gnojidbeni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman. Oznaka ST označava suhu masu.

Gnojidbeni tretmani s B (B0 – B6) različito su utjecali na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima masline (Tablica 7). Primjenom navedenih gnojidbenih tretmana nije utvrđena značajna razlika između koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva u korijenu (hidroksitirozol, tirozol, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein), izbojku (tirozol, oleuropein, ukupni fenoli) i listu (hidroksitirozol).

Koncentracija hidroksitirozola u izbojku bila je značajno veća u gnojidbenim tretmanima B2 i B3 u odnosu na gnojidbeni tretman B4, a nije se značajno razlikovala u odnosu na ostale gnojidbene tretmane. Kontrolni gnojidbeni tretman B0 imao je značajno manju koncentraciju hidroksitirozola u izbojku u odnosu na gnojidbeni tretman B2, dok se u odnosu na druge gnojidbene tretmane nije značajno razlikovao. Koncentracija tirozola u listu bila je značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na sve ostale istražene gnojidbene tretmane (B1 – B6). Koncentracija verbaskozida u korijenu bila je značajno veća u gnojidbenim tretmanima B2, B3, B5 i B6 u odnosu na gnojidbeni tretman B1. Koncentracija navedenog fenolnog spoja nije se značajno razlikovala između kontrolnog (B0) i ostalih istraženih gnojidbenih tretmana (B1 – B6). U izbojku je koncentracija verbaskozida bila značajno veća u gnojidbenom tretmanu B2 u odnosu na gnojidbene tretmane B0 i B6, dok se kontrolni gnojidbeni tretman B0 nije značajno razlikovao u odnosu na ostale gnojidbene tretmane (B1, B3 – B6). U listu je koncentracija verbaskozida bila značajno veća u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na gnojidbene tretmane B2 – B5. Koncentracija luteolina-7-O-glukozida bila je značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na gnojidbene tretmane B2 i B3 u izbojku, dok je u listu bila značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na gnojidbene tretmane B1, B2 i B6. Koncentracija oleuropeina u listu bila je značajno veća u gnojidbenim tretmanima B1 i B2 u odnosu na gnojidbene tretmane B0 i B4. Koncentracija ukupnih fenola u korijenu bila je značajno veća u gnojidbenom tretmanu B6 u odnosu na gnojidbeni tretman B1, dok se njihova koncentracija nije značajno razlikovala između kontrolnog (B0) i ostalih gnojidbenih tretmana (B1 – B6). U listu nije značajno razlikovala između istraženih gnojidbenih tretmana s B (B0 – B6). U izbojku i listu nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji ukupnih fenolnih spojeva između istraženih gnojidbenih tretmana (B0 – B6).

Tablica 7. Utjecaj primjene gnojdbenih tretmana s B (B0 – B6) na koncentraciju pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima masline (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4)

Gnojdbeni tretmani	Hidroksitirozol	Tirozol	Verbaskozid	Luteolin-7-O-glukozid	Oleuropein	Ukupni fenoli
Korijen						
B0	3,94 ± 0,37	15,99 ± 0,69	780,48 ± 55,69 <sup>a,b</sup>	8,64 ± 1,47	1936,41 ± 174,16	1930,76 ± 48,37 <sup>a,b</sup>
B1	4,01 ± 0,33	16,82 ± 2,08	431,91 ± 124,29 <sup>b</sup>	9,59 ± 1,08	1847,32 ± 125,83	1691,4 ± 98,42 <sup>b</sup>
B2	4,31 ± 0,22	14,49 ± 0,32	1046,84 ± 75,85 <sup>a</sup>	9,45 ± 1,12	2033,33 ± 145,42	2138,52 ± 9,42 <sup>a,b</sup>
B3	3,32 ± 0,23	13,26 ± 0,97	932,17 ± 69,25 <sup>a</sup>	9,41 ± 1,65	1883,55 ± 112,66	1930,59 ± 99,72 <sup>a,b</sup>
B4	4,23 ± 0,44	14,72 ± 1,3	832,31 ± 79,33 <sup>a,b</sup>	9,42 ± 0,86	2058,45 ± 220,24	1992,2 ± 147,97 <sup>a,b</sup>
B5	4,31 ± 0,53	14,4 ± 1,17	898,29 ± 98,69 <sup>a</sup>	9,87 ± 1,48	2316,89 ± 226,69	2111,95 ± 180,31 <sup>a,b</sup>
B6	4,23 ± 0,44	15,59 ± 0,97	928,25 ± 90,05 <sup>a</sup>	11,19 ± 0,56	2536,94 ± 225,45	2257,6 ± 106,27 <sup>a</sup>
<i>p</i>	n.s.	n.s.	0,002	n.s.	n.s.	0,042
Izbojak						
B0	11,45 ± 1,21 <sup>b,c</sup>	10,04 ± 1,43	87,42 ± 26,36 <sup>b</sup>	6,37 ± 1,11 <sup>c</sup>	121,63 ± 31,06	1300,38 ± 122,05
B1	13,85 ± 0,32 <sup>a-c</sup>	12,52 ± 0,74	152,87 ± 4 <sup>a,b</sup>	8,61 ± 1,31 <sup>b,c</sup>	211,5 ± 14,72	1390,87 ± 48,68
B2	17,8 ± 0,95 <sup>a</sup>	10,51 ± 1,97	203,65 ± 25,75 <sup>a</sup>	16,87 ± 0,81 <sup>a</sup>	133,45 ± 15,03	1490,37 ± 87,78
B3	16,33 ± 1,33 <sup>a,b</sup>	11,4 ± 0,48	150,41 ± 22,41 <sup>a,b</sup>	13,71 ± 1,13 <sup>a,b</sup>	98,5 ± 21,42	1387,3 ± 115,3
B4	11,31 ± 1,19 <sup>c</sup>	11,84 ± 0,56	128,21 ± 20,23 <sup>a,b</sup>	7,5 ± 1,32 <sup>c</sup>	107,58 ± 18,13	1297,35 ± 121,86
B5	11,78 ± 1,06 <sup>b,c</sup>	12,56 ± 1,57	138,9 ± 17,03 <sup>a,b</sup>	9,54 ± 0,57 <sup>b,c</sup>	175,36 ± 48,28	1412,06 ± 118,19
B6	14,23 ± 1,23 <sup>a-c</sup>	13,17 ± 1,38	107,6 ± 9,25 <sup>b</sup>	6,53 ± 1,76 <sup>c</sup>	163,8 ± 26,29	1397,16 ± 158,42
<i>p</i>	0,002	n.s.	0,013	< 0,001	n.s.	n.s.
List						
B0	35,27 ± 2,84	22,81 ± 0,61 <sup>a</sup>	611,77 ± 122,5 <sup>a</sup>	282,29 ± 18,5 <sup>d</sup>	5514,53 ± 350,87 <sup>c</sup>	5133,28 ± 228,28
B1	36,58 ± 0,65	13,28 ± 1,1 <sup>b</sup>	373,23 ± 12,93 <sup>a,b</sup>	385,06 ± 10,04 <sup>a</sup>	10182,19 ± 350,23 <sup>a</sup>	6284,41 ± 75,69
B2	37 ± 0,99	14,62 ± 1,21 <sup>b</sup>	315,11 ± 20,74 <sup>b</sup>	359,85 ± 12,17 <sup>a-c</sup>	9845,83 ± 513,86 <sup>a</sup>	6358,55 ± 296,91
B3	34,35 ± 2,95	14,69 ± 1,12 <sup>b</sup>	325,84 ± 43,47 <sup>b</sup>	309,24 ± 9,49 <sup>c,d</sup>	8082,89 ± 873,19 <sup>a-c</sup>	5658,41 ± 349,29
B4	28,87 ± 3,73	15,41 ± 1,38 <sup>b</sup>	259,01 ± 50,52 <sup>b</sup>	307,83 ± 8,82 <sup>c,d</sup>	6353,16 ± 1348,84 <sup>b,c</sup>	5280,07 ± 454,57
B5	36,02 ± 0,86	16,64 ± 0,85 <sup>b</sup>	250,11 ± 25,96 <sup>b</sup>	321,91 ± 14,06 <sup>b-d</sup>	7566,09 ± 97,34 <sup>a-c</sup>	5464,84 ± 160,92
B6	36,18 ± 0,99	15,19 ± 0,83 <sup>b</sup>	370,8 ± 32,63 <sup>a,b</sup>	372,98 ± 17,39 <sup>a,b</sup>	8988,13 ± 448,78 <sup>a,b</sup>	5862,5 ± 75,93
<i>p</i>	n.s.	< 0,001	0,003	< 0,001	< 0,001	0,024

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance, pri čemu oznaka n.s. ukazuje na vrijednost  $p > 0,05$ . Gnojdbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojdbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman. Oznaka ST označava suhu masu.



U gnojidbenim tretmanima s B (B0 – B6) povezanost između koncentracije B (mg/kg ST) te koncentracije pojedinačnih i ukupnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST) u vegetativnim organima masline uglavnom je izostala (Tablica 8). U korijenu je utvrđena slaba ili srednja povezanost između koncentracije B te koncentracije oleuropeina ( $r = 0,543$ ) i ukupnih fenolnih spojeva ( $r = 0,491$ ). U izbojku je utvrđena slaba povezanost između koncentracije B i luteolina-7-O-glukozida ( $r = -0,429$ ). Povezanost između koncentracije B i fenolnih spojeva u listu je u potpunosti izostala.

Tablica 8. Povezanost između koncentracije bora (B mg/kg ST) i koncentracije fenolnih spojeva (mg/100 g ST) utvrđenih u vegetativnim organima masline (korijen, izbojak, list) istraženih gnojidbenih tretmana s B (B0 – B6)

Bor	Hidroksitirozol	Tirozol	Verbaskozid	Luteolin-7-O-glukozid	Oleuropein	Ukupni fenoli
<b>Koncentracija u gnojidbenim tretmanima B0 – B6</b>						
Korijen						
Korijen	$r = 0,176$ n.s.	$r = 0,024$ n.s.	$r = 0,288$ n.s.	$r = 0,355$ n.s.	$r = 0,543$ $p = 0,003$	$r = 0,491$ $p = 0,008$
Izbojak						
Izbojak	$r = -0,146$ n.s.	$r = 0,356$ n.s.	$r = -0,239$ n.s.	$r = -0,429$ $p = 0,023$	$r = 0,241$ n.s.	$r = 0,04$ n.s.
List						
List	$r = 0,073$ n.s.	$r = -0,185$ n.s.	$r = -0,173$ n.s.	$r = 0,326$ n.s.	$r = 0,131$ n.s.	$r = 0,025$ n.s.

Prikazani su Pearsonovi korelacijski koeficijenti ( $n = 28$ ). Vrijednosti su prikazane kako slijedi: za svako je svojstvo u gornjem retku prikazan korelacijski koeficijent ( $r$ ), a u donjem je retku prikazana pripadajuća razina signifikantnosti ( $p$ ). Oznaka n.s. – nije značajno, ukazuje na vrijednost  $p > 0,05$ . Gnojidbeni tretmani su prikazani oznakama B0 – B6, gdje B0 označava tretman s najnižom a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom bora (B). Gnojidbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman. Oznaka ST označava suhu masu.

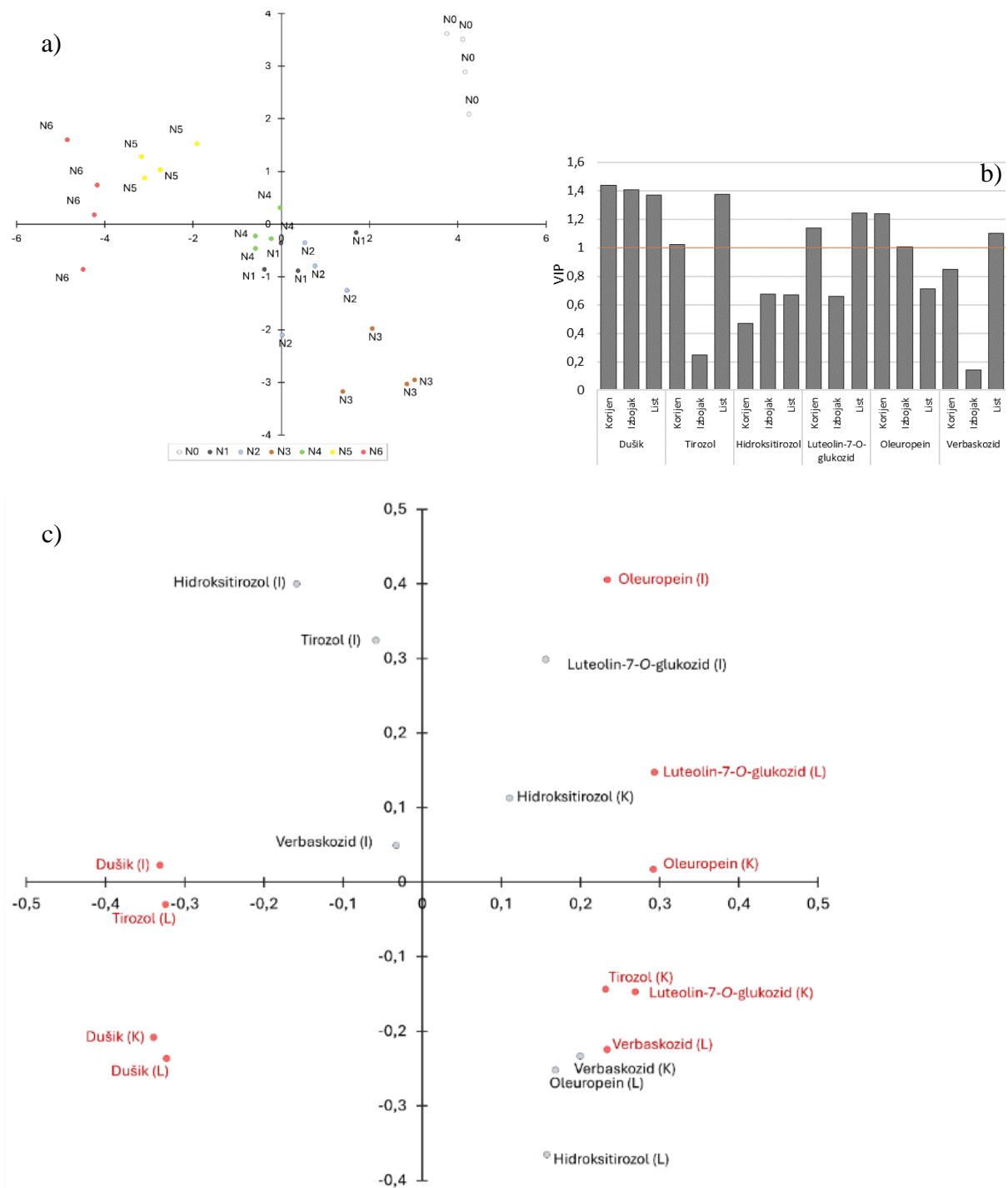
#### 4.1.4. Diskriminantna analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS-DA)

Diskriminantna analiza parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS-DA) primijenjena je kako bi se utvrdilo koje su od istraženih svojstava značajna za razdvajanje provedenih gnojidbenih tretmana u Pokusu 1 (Grafikon 10) i Pokusu 2 (Grafikon 11).

Primijenjeni model ukazuje na razlike između gnojidbenih tretmana s N (N0 – N6), a najznačajnija svojstva temeljem kojih je uočeno razdvajanje navedenih gnojidbenih tretmana (VIP vrijednost  $\geq 1$ ) jesu koncentracija N (korijen, izbojak, list) i koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva u korijenu (tirozol, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein), izbojku (oleuropein) te listu (tirozol, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid) masline (Grafikon 10). Kontrolni gnojidbeni tretman N0 izdvojio se u odnosu na gnojidbene tretmane N5 i N6 temeljem veće koncentracije oleuropeina i luteolina-7-O-glukozida u listu, oleuropeina u korijenu odnosno niže

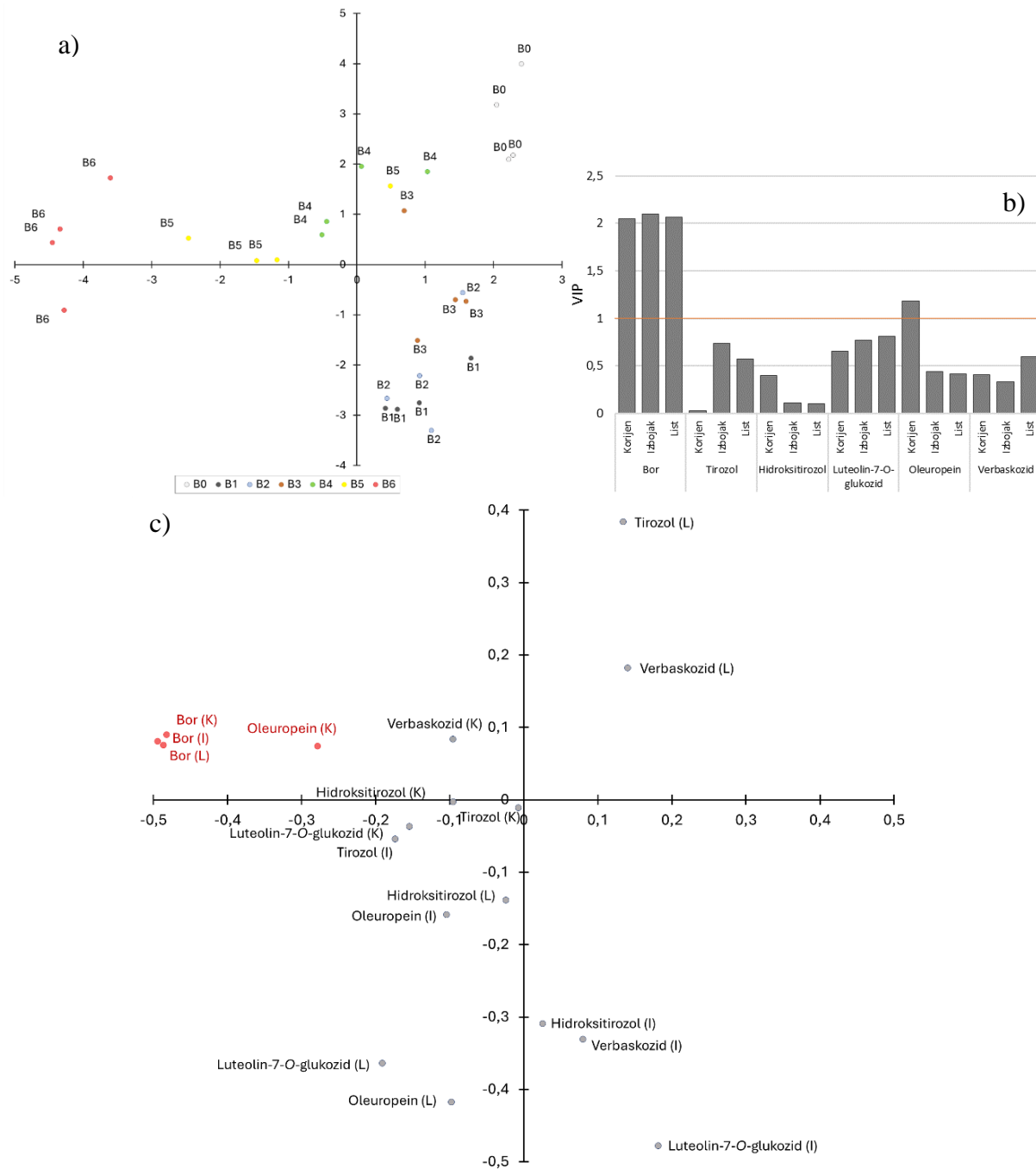
koncentracije N u korijenu, izbojku i listu. Kontrolni gnojdbeni tretman N0 izdvojio se u odnosu na gnojdbene tretmane N1, N2 te N4 – N6 temeljem koncentracije tirozola i luteolina-7-O-glukozida u korijenu te verbaskozida u listu. Gnojdbeni tretmani N5 i N6 izdvojili su se od ostalih gnojdbenih tretmana (N0 – N4) po većoj koncentraciji N u izbojku i tirozola u listu.

U gnojdbenom Pokusu 2 uočeno je razdvajanje gnojdbenih tretmana s B temeljem određenih svojstava, a najznačajnija uočena svojstva (VIP vrijednost  $\geq 1$ ) jesu koncentracija B g/kg ST (korijen, izbojak, list) te koncentracija oleuropeina (mg/100 g ST) u korijenu (Grafikon 11). Kontrolni gnojdbeni tretman B0 izdvojio se u odnosu na gnojdbene tretmane B4 – B6 temeljem niže koncentracije oleuropeina u korijenu te B u korijenu, izbojku i listu.



Grafikon 10. Razdvajanje gnojivnih tretmana s dušikom (N0 – N6) temeljem koncentracije N (g/kg ST) i koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (g/100 mg ST; hidroksitirozol, tirozol, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein) određenih u vegetativnim organima masline (korijen – K, izbojak – I, list – L)

Prikaz faktorskih bodova (a) te opterećenja (c) gdje su prikazane zavisne i eksplanatorne varijable. Važnost varijable u projekciji (VIP) gdje je  $VIP \geq 1$  označena je tako što je naziv pojedine varijable prikazan crvenom bojom (b, c). Gnojivni tretmani prikazani su oznakama N0 – N6, gdje tretman N0 predstavlja najnižu primijenjenu a N6 najvišu primijenjenu molarnu koncentraciju dušika (N). Gnojivni tretman N0 predstavlja kontrolni tretman.



Grafikon 11. Razdvajanje gnojdbenih tretmana s borom (B0 – B6) temeljem koncentracije B (g/kg ST) i pojedinačnih fenolnih spojeva (mg/100 g ST; hidroksitirozol, tirozol, verbaskozid, luteolin-7-O-glukozid, oleuropein) određenih u vegetativnim organima masline (korijen – K, izbojak – I, list – L)

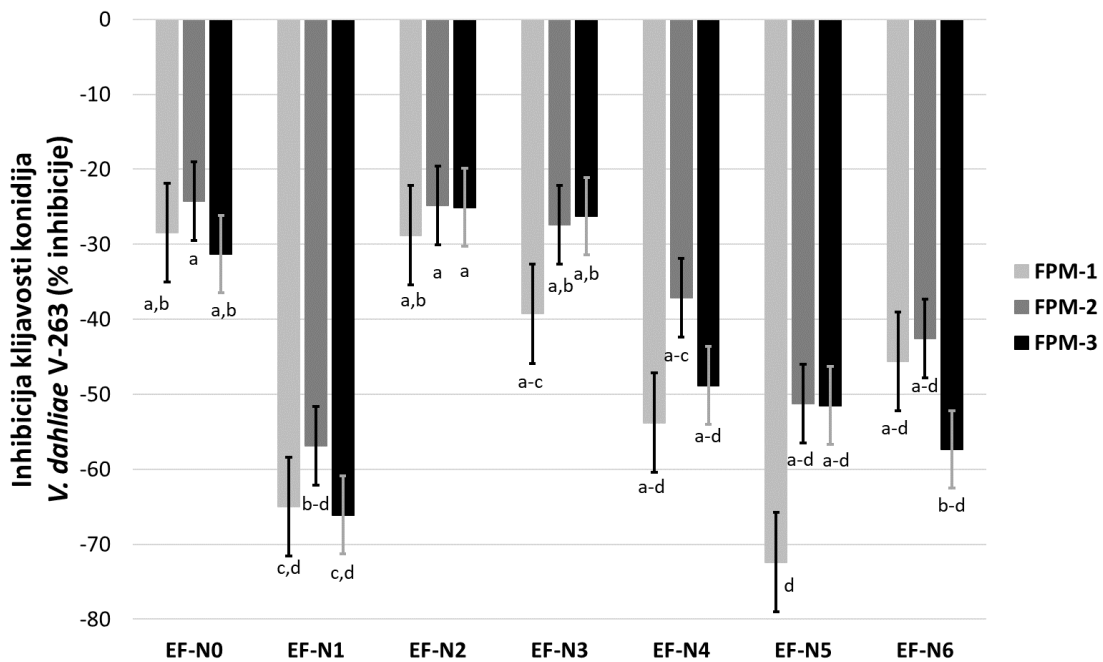
Prikaz faktorskih bodova (a) te opterećenja (c) gdje su prikazane zavisne i eksplanatorne varijable. Važnost varijable u projekciji (VIP) gdje je  $VIP \geq 1$  označena je tako što je naziv pojedine varijable prikazan crvenom bojom (b, c). Gnojdbeni tretmani prikazani su oznakama B0 – B6, gdje tretman B0 predstavlja najnižu primijenjenu a B6 najvišu primijenjenu molarnu koncentraciju bora (B). Gnojdbeni tretman B0 predstavlja kontrolni tretman.

## **4.2. Protugljivični učinak ekstrakata fenola na *Verticillium dahliae***

### **4.2.1. Protugljivični učinak ekstrakata fenola na klijavost konidija *Verticillium dahliae***

U Pokusu 3 (a) utvrđena je značajna razina interakcije za učinke ekstrakata fenola (EF-N0 – EF-N6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) i perioda mjerenja (FPM-1 – FPM-3) na postotak inhibicije klijavosti konidija *V. dahliae* V-263 (Grafikon 12 – 14). Primjenom ekstrakata fenola (EF-N0 – EF-N6) istraženih vegetativnih organa masline uočen je negativno inhibitoran učinak, odnosno drugim riječima stimulativan učinak, na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u svim ispitanim periodima (FPM-1 – FPM-3) mjerenja (Grafikon 12 – 14).

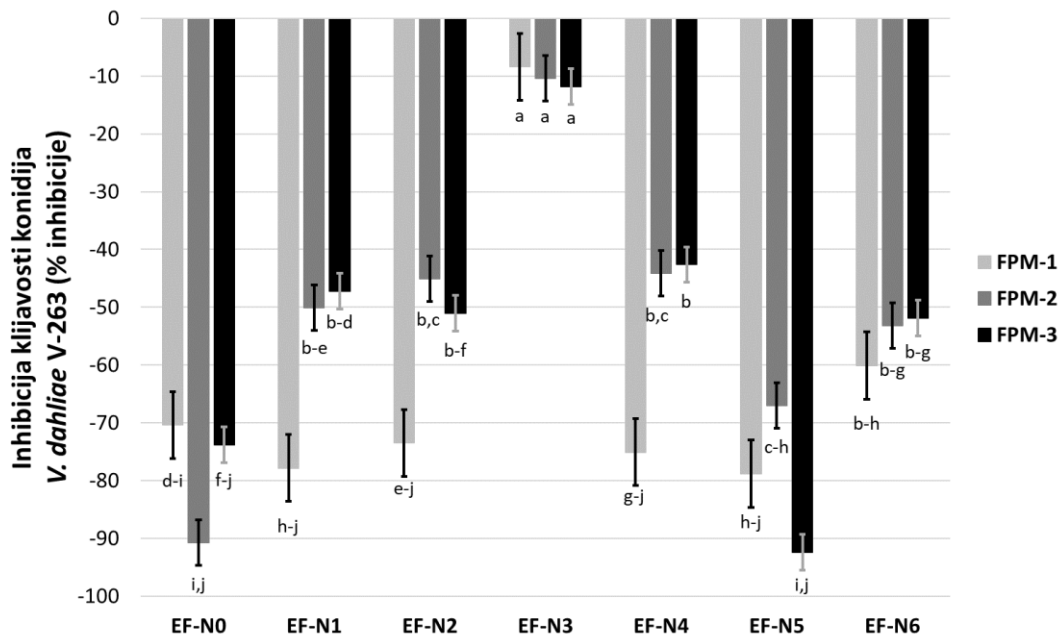
Ekstrakt fenola korijena kontrolnog tretmana EF-N0 imao je značajno manji stimulativni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte fenola korijena EF-N1 i EF-N5 pri prvom (FPM-1) periodu mjerenja (Grafikon 12), a nije se značajno razlikovao u odnosu na druge ekstrakte fenola korijena (EF-N2, EF-N3, EF-N4, EF-N6). U drugom (FPM-2) i trećem (FPM-3) periodu mjerenja ekstrakt fenola korijena kontrolnog tretmana EF-N0 imao je značajno manji stimulativni učinak na klijavost konidija u odnosu na ekstrakt fenola korijena EF-N1. Između različitih perioda mjerenja (FPM-1 – FPM-3) nije uočena značajna razlika u učinku pojedinačnih ekstrakata fenola korijena (EF-N0 – EF-N6).



Grafikon 12. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola korijena masline (ekstrakti fenola EF-N0 – EF-N6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) *Verticillium dahliae* V-263 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

Različita slova uz trake pogreška označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i učinak ekstrakata fenola korijena masline), a iznosila je  $p = 0,007$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama FPM-1 – FPM-3 (1, 2 i 3 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja učinka ekstrakata fenola korijena masline na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263. Inhibitoran učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsufoksid. Ekstrakti fenola korijena masline prikazani su oznakama EF-N0 – EF-N6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-N0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni bujon iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz korijena masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s dušikom (N). Oznaka EF-N0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz korijena masline gnojidbenog tretmana s najnižom (N0), a EF-N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom N (N6).

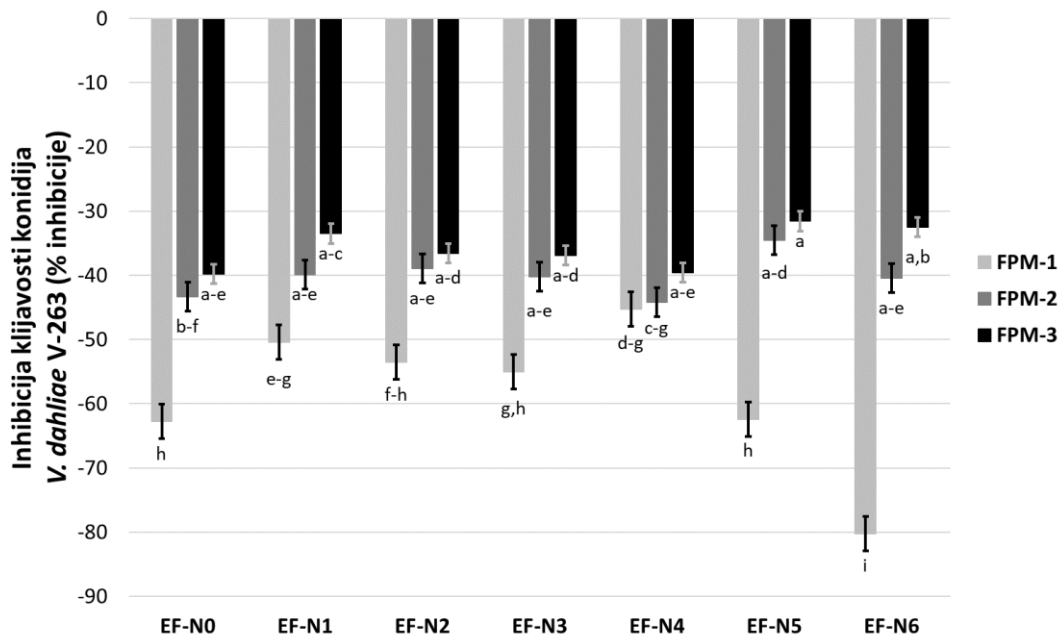
Primjena ekstrakta fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-N0 imala je značajno veći stimulatívni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakt fenola izbojka EF-N3 pri prvom (FPM-1) periodu mjerenja (Grafikon 13). U drugom (FPM-2) periodu mjerenja ekstrakt fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-N0 imao je značajno veći stimulatívni učinak na klijavost konidija u odnosu na sve ostale ispitane ekstrakte fenola izbojka (EF-N1 – EF-N6). U trećem (FPM-3) periodu mjerenja ekstrakt fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-N0 imao je značajno veći stimulatívni učinak na klijavost konidija u odnosu na ekstrakte fenola EF-N1, EF-N3, EF-N4 i EF-N6. U promatranim periodima mjerenja (FPM-1 – FPM-3) stimulatívni učinak ekstrakata fenola izbojka EF-N1 i EF-N4 na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 se postupno smanjio, ali njihov učinak i dalje nije bio inhibitoran.



Grafikon 13. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola izbojka masline (ekstrakti fenola EF-N0 – EF-N6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) *Verticillium dahliae* V-263 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

Različita slova uz trake pogreška označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i učinak ekstrakata fenola izbojka masline), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerjenja prikazani su oznakama FPM-1 – FPM-3 (1, 2 i 3 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja učinka ekstrakata fenola izbojka masline na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263. Inhibitoran učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsufoksid. Ekstrakti fenola izbojka masline prikazani su oznakama EF-N0 – EF-N6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-N0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni bujon iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz izbojka masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s dušikom (N). Oznaka EF-N0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz izbojka masline gnojidbenog tretmana s najnižom (N0), a EF-N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom N (N6).

Ekstrakt fenola lista kontrolnog tretmana EF-N0 imao je značajno veći stimulatívni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte fenola lista EF-N1 i EF-N4 te značajno manji u odnosu na ekstrakt fenola lista EF-N6 pri prvom (FPM-1) periodu mjerjenja (Grafikon 14). U ostalim (FPM-2 i FPM-3) periodima mjerjenja učinak ekstrakta fenola lista kontrolnog tretmana EF-N0 nije se značajno razlikovao u odnosu na ostale primijenjene ekstrakte fenola (EF-N1 – EF-N6).



Grafikon 14. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola lista masline (ekstrakti fenola EF-N0 – EF-N6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) *Verticillium dahliae* V-263 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

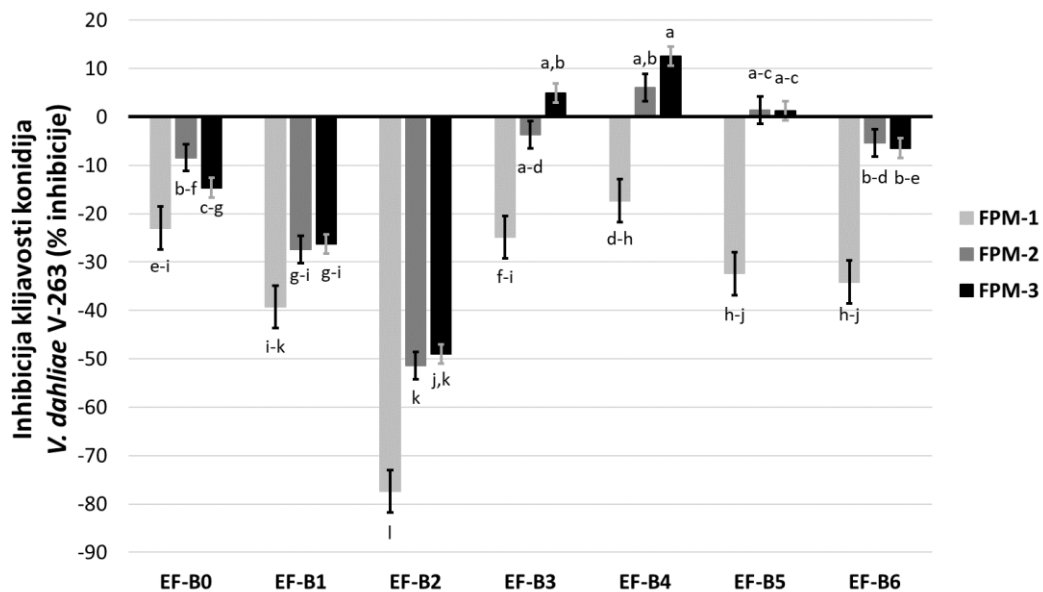
Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerjenja i učinak ekstrakata fenola lista masline), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerenja prikazani su oznakama FPM-1 – FPM-3 (1, 2 i 3 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja učinka ekstrakata fenola lista masline na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263. Inhibitoran učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola lista masline prikazani su oznakama EF-N0 – EF-N6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-N0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni bujon iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz lista masline dobivenih gnojdbenim tretmanima s dušikom (N). Oznaka EF-N0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz lista masline gnojdbenog tretmana s najnižom (N0), a EF-N6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom N (N6).

Provedbom Pokusa 3 (b) utvrđena je značajna razina interakcije za učinke ekstrakata fenola (EF-B0 – EF-B6) pojedinih vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) i provedenih perioda mjerenja (FPM-1 – FPM-3) na klijavosti konidija (% inhibicije) *V. dahliae* V-263 (Grafikon 15 – 17). U navedenom je Pokusu (3 b), primjenom pojedinih ekstrakata fenola korijena i izbojka, uočen inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u određenim periodima mjerenja njihova učinka, dok je u ostalim slučajevima uočeni učinak na klijavost konidija bio stimulativan (Grafikon 15 – 17).

Ekstrakt fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0 imao je značajno manji stimulativni učinak u odnosu na ekstrakt fenola korijena EF-B2 u prvom (FPM-1) periodu mjerenja (Grafikon 15). U drugom (FPM-2) periodu mjerenja ekstrakt fenola kontrolnog tretmana EF-B0 imao je značajno manji stimulativni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte fenola korijena EF-B1 i EF-B2. U navedenom (FPM-2) periodu mjerenja ekstrakti fenola korijena EF-B4 i EF-B5 imali su inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263. Ipak, statistički značajna razlika nije utvrđena između ekstrakata



fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0 i ekstrakata fenola EF-B4 i EF-B5 za ispitani period (FPM-2) mjerenja njihova učinka. U trećem (FPM-3) periodu mjerenja ekstrakt fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0 imao je značajno manji stimulativni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte fenola EF-B2 te značajno veći u odnosu na ekstrakte fenola EF-B3 i EF-B4. U navedenom je periodu mjerenja (FPM-3) uočen inhibitory učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 primjenom ekstrakata fenola korijena EF-B3, EF-B4 i EF-B5.

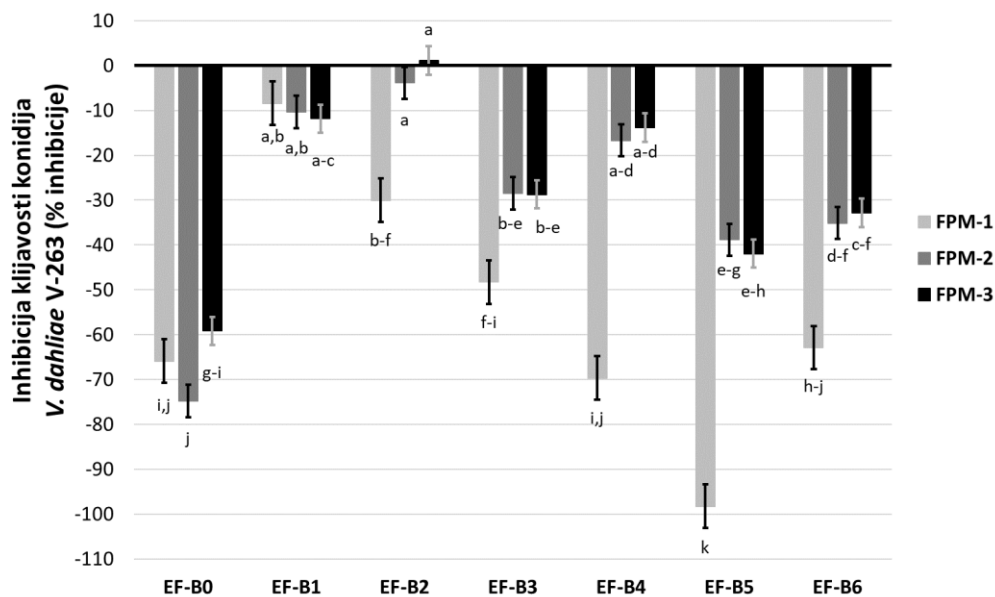


Grafikon 15. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola korijena masline (ekstrakti fenola EF-B0 – EF-B6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) *Verticillium dahliae* V-263 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerenja i učinak ekstrakata fenola korijena masline), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerenja prikazani su oznakama FPM-1 – FPM-3 (1, 2 i 3 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja učinka ekstrakata fenola korijena masline na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263. Inhibitory učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsufoksid. Ekstrakti fenola korijena masline prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni bujon iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz korijena masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka EF-B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz korijena masline gnojidbenog tretmana s najnižom (B0), a EF-B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B (B6).

U prvom (FPM-1) periodu mjerenja, ekstrakt fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-B0 imao je značajno veći stimulativni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte fenola EF-B1 i EF-B2 te značajno manji u odnosu na ekstrakt fenola EF-B5 (Grafikon 16). U drugom i trećem (FPM-2 – FPM-3) periodu mjerenja ekstrakt fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-B0 imao je značajno veći stimulativni učinak na klijavost konidija u odnosu na gotovo sve ostale ekstrakte fenola (EF-B1 – EF-B4, EF-B6). Pri posljednjem

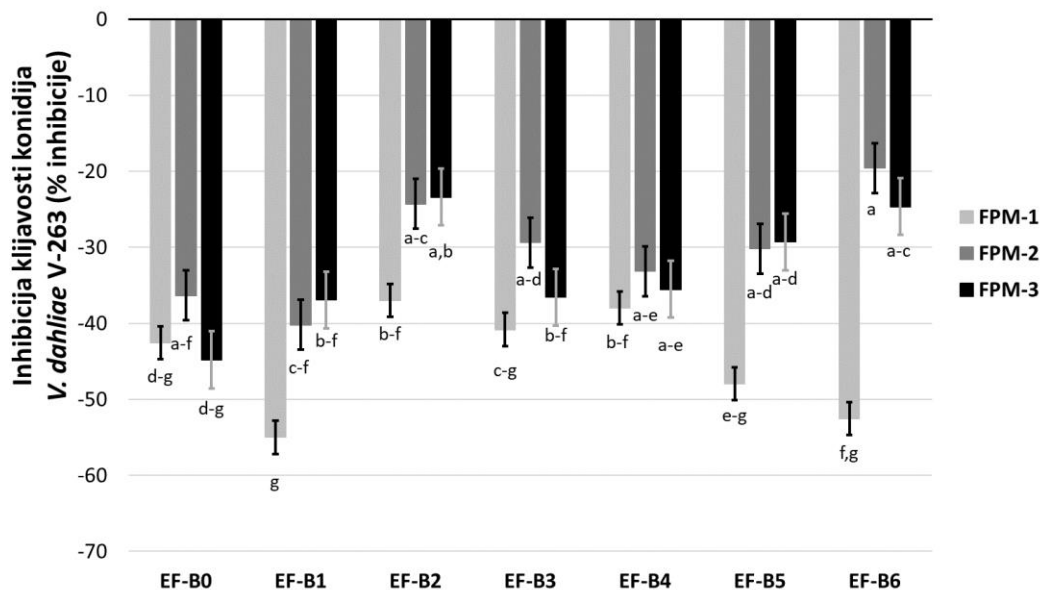
(FPM-3) periodu mjerenja ekstrakt fenola izbojka EF-B2 jedini je imao inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263.



Grafikon 16. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola izbojka masline (ekstrakti fenola EF-B0 – EF-B6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) *Verticillium dahliae* V-263 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška, n = 4)

Različita slova uz trake pogrešaka označavaju značajne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Značajnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerenja i učinak ekstrakata fenola izbojka masline), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerenja prikazani su oznakama FPM-1 – FPM-3 (1, 2 i 3 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja učinka ekstrakata fenola izbojka masline na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263. Inhibitoran učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola izbojka masline prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni bujon iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz izbojka masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka EF-B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz izbojka masline gnojidbenog tretmana s najnižom (B0), a EF-B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B (B6).

Primjenom ekstrakta fenola lista (EF-B0 – EF-B6) nije uočen inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u ispitanim periodima (FPM-1 – FPM-3) mjerenja (Grafikon 17). Ekstrakt fenola lista kontrolnog tretmana EF-B0 imao je stimulativan učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 i nije se značajno razlikovao u odnosu na ostale ekstrakte fenola lista (EF-B1 – EF-B6) pri prvom i drugom (FPM-1 – FPM-2) periodu mjerenja. Ekstrakt fenola lista kontrolnog gnojidbenog tretmana EF-B0 imao je značajno veći stimulatívni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte fenola EF-B2 i EF-B6.



Grafikon 17. Utjecaj interakcije učinka ekstrakata fenola lista masline (ekstrakti fenola EF-B0 – EF-B6) i perioda mjerenja (FPM-1, FPM-2, FPM-3) na inhibiciju (% inhibicije) klijavosti konidija (apsorbancija pri 505 nm) *Verticillium dahliae* V-263 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška,  $n = 4$ )

Različita slova uz trake pogrešaka označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost ( $p$ ) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance ponovljenih mjerenja (interakcija period mjerenja i učinak ekstrakata fenola lista masline), a iznosila je  $p < 0,001$ . Periodi mjerenja prikazani su oznakama FPM-1 – FPM-3 (1, 2 i 3 dana nakon postavljanja pokusa) i predstavljaju intervale određivanja učinka ekstrakata fenola lista masline na klijavost konidija izolata *V. dahliae* V-263. Inhibitoran učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola lista masline prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni bujon iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz lista masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka EF-B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz lista masline gnojidbenog tretmana s najnižom (B0), a EF-B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B (B6).

#### 4.2.2. Protugljivični učinak ekstrakata fenola na porast i morfološka obilježja micelija *Verticillium dahliae*

Primjenom ekstrakata fenola (EF-N0 – EF-N6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) izostao je inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263. Iz navedenog razloga, protugljivični učinak (% inhibicije) navedenih ekstrakata fenola, na porast i morfološka obilježja micelija *V. dahliae* V-263, u ovom istraživanju nije ispitan.

Primjenom ekstrakata fenola (EF-B0 – EF-B6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) istražen je njihov protugljivični učinak (% inhibicije) na porast micelija *V. dahliae* V-263 (Tablica 9). Ekstrakti fenola (EF-B0 – EF-B6) svih ispitanih vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) imali su značajan protugljivični učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263 (Tablica 9).

Primjena ekstrakta fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0 imala je značajno manji inhibitorni učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263 u odnosu na ekstrakte EF-B2, EF-B3

i EF-B5 (Tablica 9). Ekstrakti fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-B0 jedini su imali negativno inhibitoran, odnosno drugim riječima stimulativan učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263. Primjena ostalih ekstrakata izbojka (EF-B1 – EF-B6) imala je inhibitoran učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263, a statistički značajna razlika utvrđena je između ekstrakata fenola izbojka kontrolnog tretmana EF-B0 i EF-B2. Primjenom ekstrakata fenola lista nije utvrđena značajna razlika između kontrolnog tretmana EF-B0 i ostalih istraženih ekstrakata lista (EF-B1 – EF-B6) na porast micelija *V. dahliae* V-263. Iako statistički značajna razlika nije utvrđena između navedenih ekstrakata fenola lista, primjenom ekstrakata fenola EF-B1 i EF-B6 bio je vidljiv stimulativan učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263. Primjenom ekstrakata fenola izbojka i lista uočen je znatno manji inhibitoryni učinak (% inhibicije) na porast micelija *V. dahliae* V-263 u odnosu na učinak ekstrakata fenola korijena.

Tablica 9. Protugljivični učinak ekstrakata fenola (EF-B0 – EF-B6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) na inhibiciju porasta (% inhibicije) micelija *Verticillium dahliae* V-263 u uvjetima *in vitro* (srednja vrijednost ± standardna pogreška srednjih vrijednosti, n = 4)

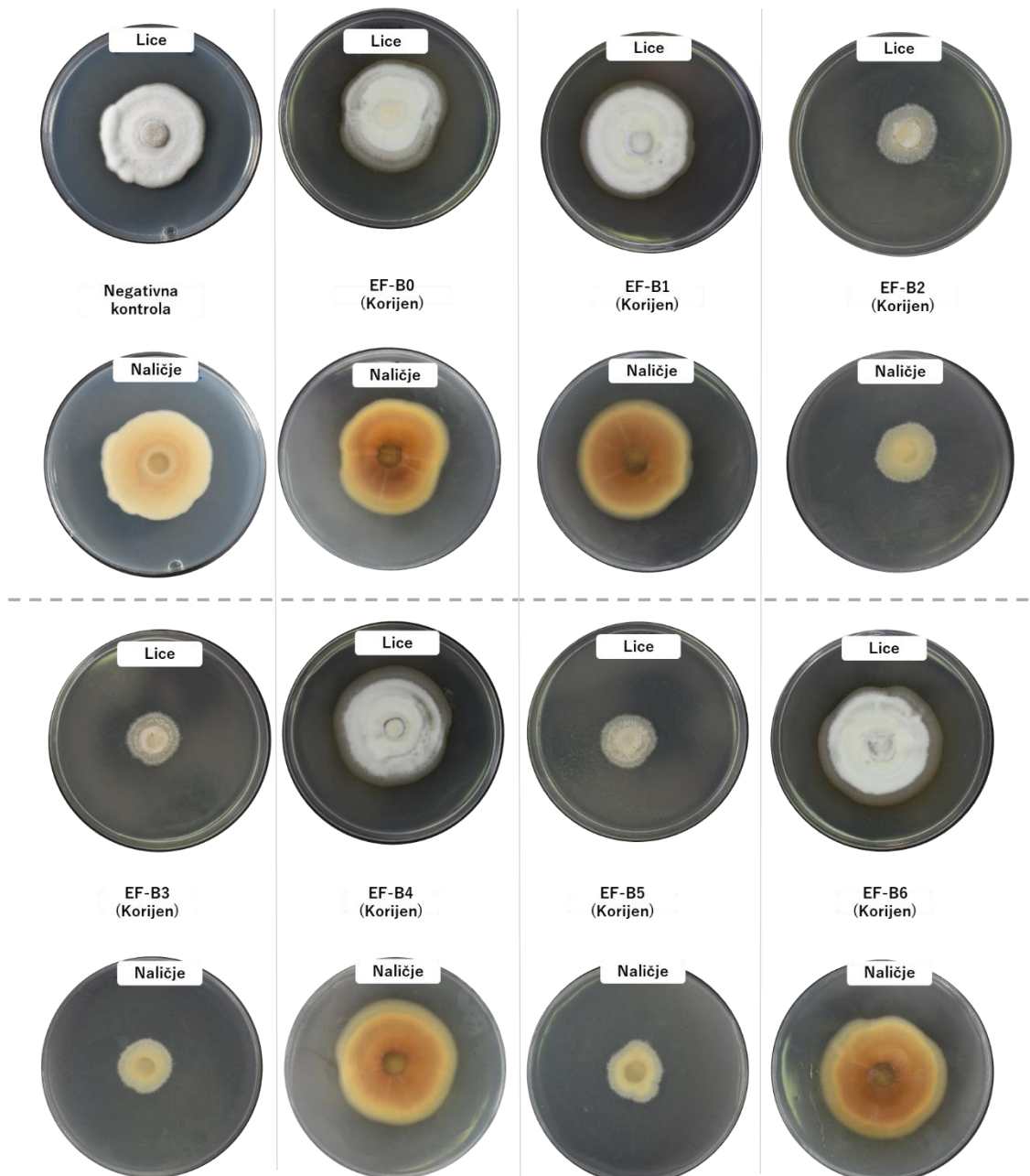
Ekstrakti fenola	Inhibicija porasta micelija (% inhibicije)		
	Ekstrakti fenola korijena	Ekstrakti fenola izbojka	Ekstrakti fenola lista
EF-B0	26,36 ± 2,26 <sup>b</sup>	-7,72 ± 3,96 <sup>b</sup>	7,04 ± 2,68 <sup>a,b</sup>
EF-B1	16,14 ± 1,47 <sup>b</sup>	5,9 ± 3,95 <sup>a,b</sup>	-8,52 ± 1,48 <sup>b</sup>
EF-B2	55,91 ± 1,88 <sup>a</sup>	12,79 ± 1,14 <sup>a</sup>	17,04 ± 2,45 <sup>a</sup>
EF-B3	54,5 ± 9,89 <sup>a</sup>	0,36 ± 4,49 <sup>a,b</sup>	2,51 ± 7,15 <sup>a,b</sup>
EF-B4	17,33 ± 1,55 <sup>b</sup>	4,23 ± 5,37 <sup>a,b</sup>	3,77 ± 4,59 <sup>a,b</sup>
EF-B5	63,93 ± 0,58 <sup>a</sup>	0,59 ± 4,92 <sup>a,b</sup>	1,83 ± 1,84 <sup>a,b</sup>
EF-B6	14,42 ± 2,22 <sup>b</sup>	9,35 ± 4,05 <sup>a,b</sup>	-5,97 ± 3,23 <sup>b</sup>
<i>p</i>	< 0,001	0,049	0,003

Različita slova u stupcima označavaju signifikantne razlike između srednjih vrijednosti (Tukeyev post hoc test:  $p \leq 0,05$ ). Signifikantnost (*p*) odnosi se na F vrijednost iz analize varijance. Inhibitoran učinak ekstrakata fenola masline (% inhibicije) određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola vegetativnih organa masline prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka EF-B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz vegetativnih organa masline gnojidbenog tretmana s najnižom (B0), a EF-B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B (B6).

Utjecaj primjene ekstrakata fenola (EF-B0 – EF-B6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list) na morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 opisan je nakon 10 dana inkubacije (Slika 9 – 11). Nakon 10 dana inkubacije, morfološka obilježja micelija *V. dahliae* V-263, tretiranih s ekstraktima fenola (EF-B0 – EF-B6) vegetativnih organa masline (korijen, izbojak, list), uspoređena su s istima kod negativne kontrole (DMSO) i ekstrakta fenola kontrolnog tretmana EF-B0 (Slika 9 – 11). Morfološka obilježja micelija *V. dahliae* V-263 na

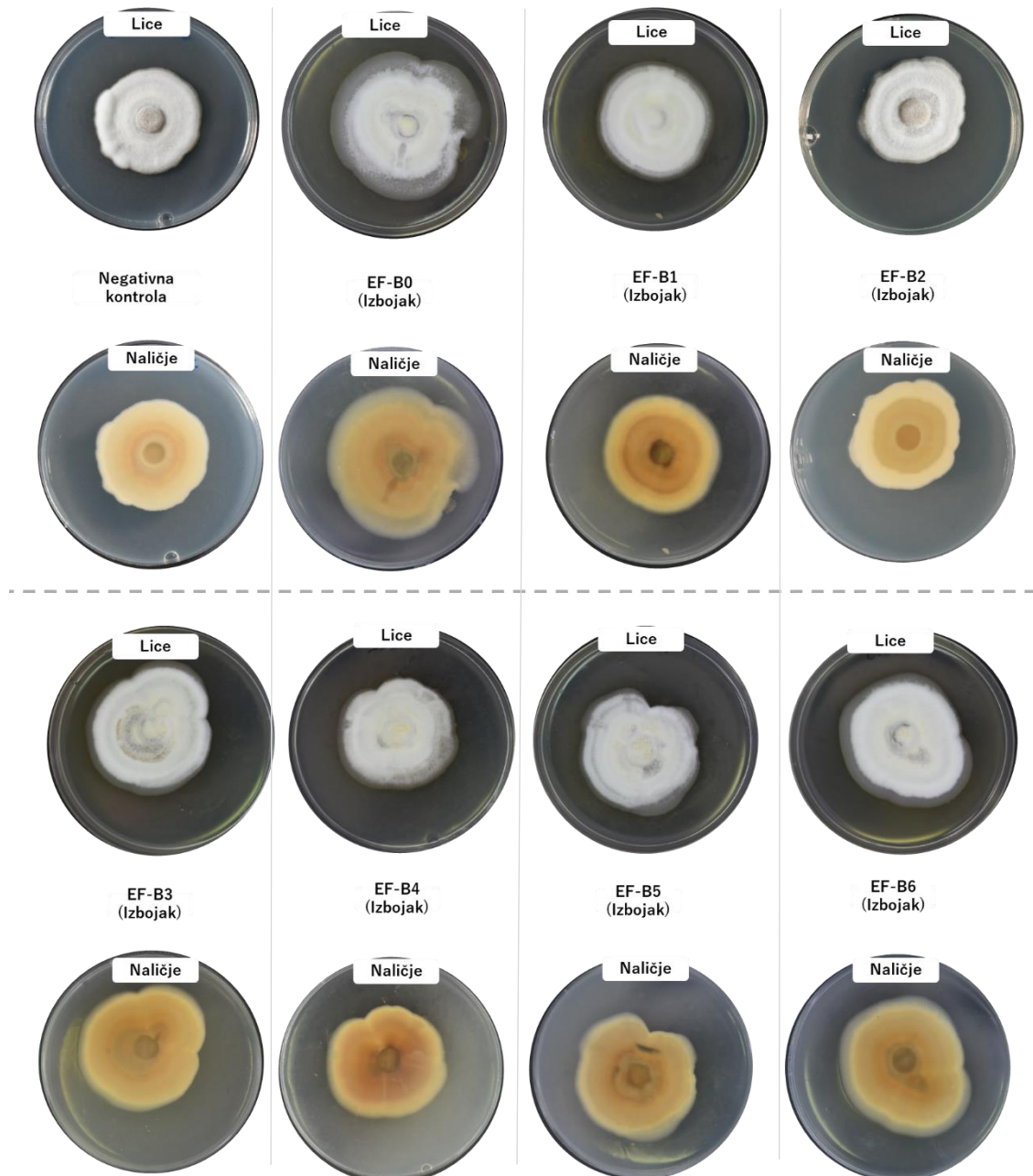
negativnoj kontroli bez dodatka otapala DMSO nisu se razlikovala u odnosu na negativnu kontrolu s dodatkom otapala DMSO i stoga ista nije uzimana u obzir (rezultat nije prikazan). Primjena ekstrakata fenola korijena (EF-B0 – EF-B6) utjecala je na pojedina morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 (Slika 9). Micelij kolonije bio je bijele boje kod primjene svih ekstrakata fenola korijena (EF-B0 – EF-B6) i kod porasta na negativnoj kontroli (DMSO). Primjenom ekstrakata fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0 uočena je mjestimična pigmentacija žute do narančaste boje na naličju kolonije. Navedena je pigmentacija izostala u negativnoj kontroli (DMSO) te primjenom ekstrakata fenola korijena EF-B2, EF-B3 i EF-B5. Oblik kolonije bio je uglavnom radijalan kod primjene istraženih ekstrakata fenola korijena. Micelij je bio obilan kod negativne kontrole (DMSO) te kod primjene ekstrakata fenola korijena EF-B0, EF-B1, EF-B4 i EF-B6. Micelij je bio prorijeđen i pruinozan primjenom ekstrakata fenola korijena EF-B2, EF-B3 i EF-B5 u odnosu na negativnu kontrolu (DMSO) i primjenu ekstrakata fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0. Razvoj mikrosklerocija je izostao na negativnoj kontroli (DMSO) i primjenom svih istraženih ekstrakata fenola korijena (EF-B0 – EF-B6).

Primjenom ekstrakata fenola izbojka (EF-B0 – EF-B6) uočen je njihov utjecaj na određena morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 (Slika 10). Micelij kolonije *V. dahliae* V-263 bio je bijele boje kod negativne kontrole (DMSO) i svih ispitanih ekstrakata fenola izbojka. Na naličju kolonije micelij je bio svijetlije boje kod negativne kontrole (DMSO), dok je primjenom ekstrakata fenola izbojka (EF-B0 – EF-B6) micelij na naličju kolonije bio različitim intenzitetom pigmentiran. Kolonija je bila radijalnog oblika na negativnoj kontroli (DMSO) i primjenom ekstrakata fenola izbojka (EF-B0 – EF-B6). Micelij je bio obilan kod negativne kontrole (DMSO), a primjenom ekstrakata fenola izbojka uočen je mjestimično prorijeđen micelij. Razvoj mikrosklerocija je izostao kod negativne kontrole (DMSO). Formiranje mikrosklerocija, uronjenih u agaroznu hranjivu podlogu (rezultat nije prikazan), zabilježeno je primjenom ekstrakata fenola izbojka EF-B5 i izostao je na kontrolnom tretmanu EF-B0. Primjena ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6) utjecala je na pojedina morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 u odnosu na negativnu kontrolu (DMSO) (Slika 11). Micelij kolonije bio je bijele boje kod negativne kontrole (DMSO) i primijenjenih ekstrakata lista (EF-B0 – EF-B6). Na naličju kolonije micelij je bio svijetlo obojen kod negativne kontrole (DMSO), dok je primjenom ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6) micelij poprimio mjestimičnu pigmentaciju žute do narančaste boje. Kolonija je bila radijalnog oblika i micelij je bio obilan u svim promatranim varijantama. Razvoj mikrosklerocija kod negativne kontrole (DMSO) je izostao, dok je kod primjene ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6) bio prisutan u različitom intenzitetu. Mikrosklerociji su bili uronjeni u agaroznu hranjivu podlogu (rezultat nije prikazan) i pravilno raspoređeni po koloniji.



Slika 9. Utjecaj primjene ekstrakata fenola korijena (EF-B0 – EF-B6) na morfološka obilježja micelija *Verticillium dahliae* V-263

Učinak ekstrakata fenola korijena masline na morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola korijena prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz korijena masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz korijena masline gnojidbenog tretmana s najnižom, a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B. Na fotografijama je prikazano lice (a) i naličje (b) iste Petrijeve zdjelice. Fotografije prikazuju reprezentativne kolonije, nakon 10 dana inkubacije pri 27°C i 24h tame.



Slika 10. Utjecaj primjene ekstrakata fenola izbojka (EF-B0 – EF-B6) na morfološka obilježja micelija *Verticillium dahliae* V-263

Učinak ekstrakata fenola izbojka masline na morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola izbojka prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz izbojaka masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz izbojka masline gnojidbenog tretmana s najnižom, a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B. Na fotografijama je prikazano lice (a) i naličje (b) iste Petrijeve zdjelice. Fotografije prikazuju reprezentativne kolonije, nakon 10 dana inkubacije pri 27°C i 24h tame.





Slika 11. Utjecaj primjene ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6) na morfološka obilježja micelija *Verticillium dahliae* V-263

Učinak ekstrakata fenola lista masline na morfološka obilježja *V. dahliae* V-263 određen je u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržavala otapalo dimetilsulfoksid. Ekstrakti fenola lista prikazani su oznakama EF-B0 – EF-B6. Kontrolni tretman prikazan je oznakom EF-B0. Konačna masena koncentracija primijenjenih otopina ekstrakata fenola u hranjivoj podlozi krumpir dekstrozni agar iznosila je 50 mg/L. Otopine ekstrakata fenola pripravljene su iz listova masline dobivenih gnojidbenim tretmanima s borom (B). Oznaka B0 označava ekstrakte fenola pripravljene iz lista masline gnojidbenog tretmana s najnižom, a B6 s najvišom primijenjenom molarnom koncentracijom B. Na fotografijama je prikazano lice (a) i naličje (b) iste Petrijeve zdjelice. Fotografije prikazuju reprezentativne kolonije, nakon 10 dana inkubacije pri 27°C i 24h tame.



## 5. RASPRAVA

### 5.1. Gnojidbeni pokusi s dušikom i borom

#### 5.1.1. Vegetativna svojstva masline, koncentracija dušika i bora u maslini

Utjecaj primjene dušičnih gnojiva na koncentraciju N u korijenu, izbojku i listu masline istražen je od različitih autora (Therios i Sakellariadis, 1988; Perica i sur., 1993; Fernández-Escobar i sur., 2014; Othman i Leskovar, 2019). Fernández-Escobar (2018) navodi da optimalna koncentracija N u listu sadnica masline iznosi 13 – 17 g/kg ST, dok Therios (2009) navodi raspon od 12 – 16 g/kg ST za list višegodišnjih stabala masline. Rezultati navedenih istraživanja ukazuju da je Pokusom 1 utvrđena koncentracija N bila ispod razine optimalnih vrijednosti u listu masline kontrolnog gnojidbenog tretmana N0 (Tablica 3). Kloroza kao simptom nedostatka N, na listovima masline nakon 150 dana od početka pokusa (GPM-3), bila je vidljiva samo u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 (Slika 5). Fernández-Escobar i sur. (2016) provodeći pokus na sadnicama sorte Picual utvrdili su da se simptomi nedostatka N na listu masline razvijaju pri koncentraciji 12,80 g/kg ST N, dok je u ovom istraživanju nedostatak N utvrđen pri koncentraciji 7,97 g/kg ST N u listu masline. U kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 masline su imale najmanji rast i razvoj pri posljednjem (GPM-3) periodu mjerenja (Grafikon 4 – 6), što uz simptome kloroze dodatno potvrđuje pojavu nedostatka N u navedenom gnojidbenom tretmanu. Ranije je utvrđeno da je N kao makroelement neophodan u pravilnom odvijanju svih primarnih fizioloških procesa masline (Makino i Osmond, 1991), što je dijelom potvrđeno i rezultatima ovog istraživanja. Naime, gnojidbeni tretmani N1 – N6 pri periodu mjerenja GPM-3 imali su značajno veću duljinu izbojka, broj internodija i listova u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0 (Grafikon 4 – 6), a primarni zaostatak u rastu i razvoju maslina u navedenom gnojidbenom tretmanu vidljiv već pri periodu mjerenja GPM-2. Boussadia i sur. (2010) navode da primjena niskih koncentracija N utječe na nepravilno odvijanje fotosintetske aktivnosti koja za posljedicu ima smanjeni porast masline. Razlaganje nukleinskih kiselina i proteina, uslijed dugotrajnijeg nedostatka N, dovodi do prekida porasta i razvoja biljke (Richard-Molard i sur., 2008; Hawkesford i sur., 2012). Stoga, može se pretpostaviti da je niska koncentracija N u kontrolnom gnojidbenom tretmanu N0 doprinijela uočenim negativnim učincima na vegetativni razvoj masline koji dodatno potvrđuju višestruke uloge N u fiziologiji masline. Nedostatak N u maslini je literaturno opisan, a granica toksičnosti N nije navedena za maslinu u dostupnim istraživanjima (Molina-Soria i Fernández-Escobar, 2008; Molina-Soria i Fernández-Escobar, 2012; Fernández-Escobar, 2019). Primjena najviših molarnih koncentracija N u gnojidbenim tretmanima N5 i N6 u Pokusu 1 nije dovela do razvoja simptoma toksičnosti (Slika 5), što je u skladu s rezultatima istraživanja Molina-Soria i

Fernández-Escobar (2012). Naime, Molina-Soria i Fernández-Escobar (2012) utvrdili su da viša koncentracija N u listu masline, u rasponu 16 – 30 g/kg ST N, pozitivno utječe na porast sadnica masline sorte Picual u kontroliranim uvjetima. Stoga, iako se prema definiranim granicama koncentracija N u listu od 22 g/kg ST smatra prekomjernom u uzgoju masline (Therios, 2009), upravo gnojdbeni tretmani N5 i N6 rezultirali su najvećim porastom izbojka (GPM-3) u odnosu na gotovo sve gnojdbene tretmane (Grafikon 4). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da zahtjevi sadnica masline prema N mogu biti različiti u odnosu na višegodišnja stabla masline, pa je utjecaj primjene različitih koncentracija N na vegetativna svojstva Istarske bjelice potrebno dodatno istražiti u uzgojnim uvjetima.

Othman i Leskovar (2019) navode da primjena viših koncentracija N pozitivno utječe na porast i razvoj korijena sadnica masline sorte Arbequina, a pozitivan učinak pojedinih dušičnih gnojiva u navedenom istraživanju postignut je tek nakon njihove dvogodišnje primjene. U ovom je istraživanju primjena gnojdbenih tretmana s višom molarnom koncentracijom N u hranivoj otopini (gnojdbeni tretmani N5 i N6), kao i viša koncentracija N u korijenu navedenih gnojdbenih tretmana u odnosu na sve ostale tretmane u Pokusu 1 (Tablica 3), pokazala jednake ili više vrijednosti volumena, duljine ili površine korijena (Tablica 1).

Unatoč nedovoljnom poznavanju mehanizama translokacije N u maslini, može se pretpostaviti da su učinkovit prijenos i distribucija N osigurali uravnotežen porast vegetativnih organa masline i u ovom istraživanju (Molina-Soria i Fernández-Escobar, 2008). Rezultati ovog istraživanja (Tablica 3) ukazuju da je relativan omjer koncentracije N u promatranim vegetativnim organima masline ujednačen kod svih gnojdbenih tretmana s primijenjenim N (N1 – N6) i prosječno iznosi 2 – 2,4 za korijen/izbojak odnosno 3 – 3,5 za list/izbojak (podaci nisu prikazani). Prema navodima Tegeder i Masclaux-Daubresse (2018) realokacija N u list smanjena je u uvjetima kada je njegova koncentracija u biljci ograničena. Navedeni omjeri kod kontrolnog gnojdbenog tretmana N0, u kojem su zabilježeni simptomi nedostatka, iznose u prosjeku 1,5 (korijen/izbojak) – 1,6 (list/izbojak). Promatraju li se različiti vegetativni organi masline prethodno je utvrđeno da najvišu koncentraciju N ima list, a slijede ga izbojak i korijen (Fernández-Escobar i sur., 2016). Usporede li se pojedinačni gnojdbeni tretmani s N na razini vegetativnog organa masline (korijen, izbojak, list), u provedenom je istraživanju nakon lista prosječno viša koncentracija N zabilježena u korijenu (Tablica 3). Naime, list je primarni organ u kojem se N nakuplja kako bi se pravilno odvijala fotosinteza, dok izbojak ima značajnu funkciju u njegovu prijenosu između organa skladištenja/usvajanja i organa aktivne potrošnje (Tegeder i Masclaux-Daubresse, 2018). Istraživanja o utjecaju gnojdbenosti masline B uglavnom su usmjerena na karakteristike prinosa, dok je utjecaj primjene ovog mikroelementa na razvoj vegetativnih organa masline slabije poznat (Perica i sur., 2001 a,b; Liakopoulos i sur., 2005; Zouari i sur., 2020). Landi i sur.

(2019) navode da je granica između nedostatka i toksičnosti B u biljkama vrlo uska, a optimalne vrijednosti B u listu masline iskazane su u vrlo različitim rasponima (Therios, 2009; Hegazi i sur., 2018; Fernández-Escobar, 2018). Iako se kao optimalna vrijednost B u listu masline navodi granica 20 – 50 mg/kg ST (Therios, 2009) odnosno 20 – 75 mg/kg ST (Hegazi i sur., 2018), pojedini autori navode da optimalna koncentracija ovog mikroelementa u listu masline iznosi 19 – 150 mg/kg ST (Fernández-Escobar, 2018). U Pokusu 2 koncentracija B bila je ispod navedenih granica optimalnih vrijednosti u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 (0,05 mg/kg ST B) i gnojidbenim tretmanima B1 – B3 (6,81 – 11,98 mg/kg ST B), dok su simptomi nedostatka B uočeni u kontrolnom tretmanu B0 (Tablica 4, Slika 6). Izostanak primjene B u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 doveo je do razvoja kloroze na listovima te smanjenog porasta i razvoja masline pri posljednjem (GPM-3) periodu vegetativnih mjerenja (Grafikon 7 – 9). Pojava simptoma nedostatka B u kontrolnom gnojidbenom tretmanu u skladu je s rezultatima prethodnih istraživanja u kojima je, primjenom niskih koncentracija B, uočen razvoj kloroze lista (Fernández-Escobar i sur., 2016). Prethodno je utvrđeno da pri nedostatku B biljke obustavljaju porast na vršnom izbojku ili meristemskom tkivu kao posljedica smanjene elongacije i diobe stanica (Poza-Viejo i sur., 2018; Matthes i sur., 2020). Može se smatrati da je navedeni učinak zapažen i u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0. Naime, razvoj meristemskog tkiva mora biti održan kako bi se odvijao optimalan razvoj biljke, a da bi se navedeni proces odvijao potreban je kontinuirani prijenos B iz tla putem korijenja i vaskularnih tkiva u vegetativne organe s aktivnim porastom (Matthes i sur., 2020). U kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 viša koncentracija B zadržana je u korijenu u odnosu na list što je vidljivo u omjeru korijen/list koji iznosi 140, dok je omjer B u gnojidbenim tretmanima B1 – B6 prosječno iznosio 0,4 – 1,6 (podaci nisu prikazani). Koncentracija B u listu gnojidbenih tretmana B0 – B3 bila je ispod preporučenih optimalnih vrijednosti (0,05 – 11,98 mg/kg ST), a u gnojidbenim tretmanima B4 – B5 (20,13 – 34,45 mg/kg ST) odnosno B6 (95,87 mg/kg ST) bila je u razini ili blago iznad literaturno opisanih optimalnih vrijednosti (Tablica 4). Rostami i sur. (2017) navode da je najveći porast sadnica sorte Konservola utvrđen pri koncentraciji 29,34 mg/kg ST B, dok je kod sorte Amygdalolia utvrđen pri koncentracijama 29,62 i 115,13 mg/kg ST B u razvijenom listu masline. U ovom je istraživanju primjena viših molarnih koncentracija B (gnojidbeni tretmani B3 – B6), u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman B0, pozitivno utjecala na nakupljanje B u listu masline (20,13 – 95,87 mg/kg ST) i vegetativna svojstva sorte Istarske bjelice nakon 150 dana (GPM-3) trajanja pokusa (Grafikon 7 – 9). U prethodnim je istraživanjima Istarska bjelica opisana kao sorta koja nakuplja više koncentracije B u odnosu na pojedine udomaćene i introducirane sorte, kao što su primjerice Drobznica ili Leccino (Pasković i sur., 2020; Pongrac i sur., 2023). Može se pretpostaviti da prethodno opisano sortno svojstvo i tendencija Istarske bjelice da nakuplja

B doprinosi njezinoj tolerantnosti na višu koncentraciju ovog mikroelementa u njezinim vegetativnim organima (Pongrac i sur., 2023).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da primjena B doprinosi njegovom aktivnom usvajanju i različitoj distribuciji između vegetativnih organa masline (Tablica 4), što je u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja (Perica i sur., 2001 b). U gnojidbenim tretmanima B0 – B3 koncentracija B bila je najveća u korijenu (korijen>izbojak>list), dok je u listu koncentracija B bila najveća u gnojidbenim tretmanima B5 – B6 (list>izbojak>korijen). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju raniju pretpostavku da je B visoko mobilan između vegetativnih organa masline, ali i da prijenos i realokacija ovog mikroelementa između različitih vegetativnih organa ovise o usvojenoj koncentraciji B (Liakopoulos i sur., 2005; Chatzissavvidis i Therios, 2010).

Svojstva korijena nisu se značajno razlikovala između kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 i ostalih tretmana u kojima je B primijenjen (B1 – B6) što ukazuje na moguću prilagodbu masline na različite koncentracije B u zoni korijena (Tablica 2). U svojim su istraživanjima Mei i sur. (2011) uočili da različite vrste citrusa modifikacijom morfoloških svojstava korijena reguliraju usvajanje B iz tla. U ovom istraživanju nije uočena razlika između morfoloških svojstava korijena i usvojenih koncentracija B u vegetativnim organima masline. Može se pretpostaviti da maslina, odnosno sorta Istarska bjelica, regulira usvajanje B iz korijena drugim mehanizmima koje je potrebno dodatno istražiti.

Određivanje optimalnih koncentracija N ili B u maslini ovisi o mnogobrojnim čimbenicima i potrebno je uzeti u obzir različita svojstva masline kako bi se u skladu s proizvodnim uvjetima odredile potrebe masline za istima (Perica i sur., 2001 a,b; Molina-Soria i Fernández-Escobar, 2008). Ishrana N ili B ne utječe samo na vegetativni porast biljke nego i na biokemijske procese koji se u njoj odvijaju (Fernández-Escobar i sur., 2006; Landi i sur., 2019). Stoga, kako bi se utvrdili zahtjevi masline za pojedinim elementima potrebno je uzeti u obzir ne samo vegetativna svojstva, već i promjene koje njihovom primjenom nastaju na razini sekundarnog metabolizma (Lukić i sur., 2020; Silva i sur., 2023).

### **5.1.2. Koncentracija fenolnih spojeva u maslini**

Zastupljenost i distribucija pojedinačnih fenolnih spojeva u vegetativnim organima masline je sortno svojstvo (Ortega-García i Peragón, 2010), a pod utjecajem je i različitih čimbenika u koje ubrajamo i gnojidbu s N ili B (Karioti i sur., 2006; Talhaoui i sur., 2015; Dabbaghi i sur., 2018).

Rezultati prethodnih istraživanja navode da ishrana visokim koncentracijama N negativno utječe na koncentraciju fenolnih spojeva u maslinovim uljima (Fernández-Escobar i sur., 2006; Erel i sur., 2013), dok utjecaj N na koncentraciju fenolnih spojeva u korijenu, izbojku i listu masline ostaje većim dijelom neistražen (Tekaya i sur., 2016; Dabbaghi i sur., 2018).

Veće nakupljanje pojedinačnih fenolnih spojeva kao što su hidroksitirozol i tirozol, u izbojku u odnosu na korijen masline, utvrđeno je u istraživanjima na sorti Picual (Ortega-García i Peragón, 2010). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da primjena gnojidbenih tretmana (N0 – N6) nije utjecala na trend nakupljanja hidroksitirozola i tirozola u izbojku u odnosu na korijen masline (Tablica 5) i u skladu je s rezultatima navedenog istraživanja. Na koncentraciju tirozola u korijenu negativno je utjecala primjena N (gnojidbeni tretmani N0 > N4 – N6), dok je utjecaj primjene N na koncentraciju tirozola u listu bio pozitivan (gnojidbeni tretmani N4 – N6 > N0). Nekoliko grupa autora (Fernández-Escobar i sur., 2006; Erel i sur., 2013) zaključuje da je primjena viših koncentracija N negativno povezana s koncentracijom fenolnih spojeva u listu masline i maslinovom ulju. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da primjena različitih molarnih koncentracija N (gnojidbeni tretmani N0 – N6) nije podjednako utjecala na koncentraciju hidroksitirozola i tirozola, a učinak gnojidbenih tretmana razlikovao se ovisno o vegetativnom organu masline. Vrlo jaka pozitivna veza utvrđena između koncentracije N i tirozola u listu (Tablica 6), može biti posljedica njegove uloge u porastu masline i metabolizmu N (Silva i sur., 2021).

Istraživanja na sorti Istarska bjelica ukazuju da list ove sorte sadrži niže koncentracije verbaskozida u listu u odnosu na sorte kao što je Drobница, a na njegovo nakupljanje osim sorte može utjecati koncentracija pojedinačnih makro- i mikroelemenata u listu masline (Lukić i sur., 2020). Rezultati istraživanja Japón-Luján i Luque de Castro (2007) navode da je koncentracija verbaskozida u listu prosječno 4 – 9 puta veća u odnosu na njegovu koncentraciju u izbojku različitih sorata masline. U ovom je istraživanju koncentracija verbaskozida bila u prosjeku viša u listu u odnosu na izbojak primjenom gnojidbenih tretmana N0 – N4, dok je primjenom ostalih gnojidbenih tretmana (N5 – N6) koncentracija verbaskozida bila u prosjeku viša u izbojku u odnosu na list (Tablica 5). Navedeni rezultati ukazuju na potencijalan učinak N na distribuciju fenolnih spojeva u vegetativnim organima masline. Nadalje, u ovom je istraživanju primjena više koncentracije N u gnojidbenom tretmanu N6, u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0, negativno utjecala na koncentraciju verbaskozida u listu masline (Tablica 5 – 6). Martínez-Navarro i sur. (2023) utvrdili su jaku negativnu vezu između koncentracije hidroksitirozola, fenolnog spoja koji sudjeluje u biosintezi verbaskozida, te verbaskozida u listu različitih sorata masline. U ovom je istraživanju povezanost između navedenih fenolnih spojeva i N izostala ili je bila negativna (Tablica 6). Iako je u prethodnim istraživanjima uočena veza između koncentracije verbaskozida i biosinteze njegovih međuprodukata, utjecaj primjene N na sukcesivne promjene u metabolizmu fenolnih spojeva masline potrebno je dodatno istražiti. Negativan učinak primjene N u uzgoju masline uočen je za pojedine flavonoide u listu i plodu masline te maslinovom ulju (Debbaghi i sur., 2018; Silva i sur., 2023), dok je negativan učinak N na koncentraciju luteolina-7-O-glukozida opisan u drugim biljnim vrstama (Kováčik

i Klejdus, 2014). Primjena viših koncentracija N u gnojidbenom tretmanu N6, u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0, negativno je utjecala na koncentraciju luteolina-7-O-glukozida u svim istraženim vegetativnim organima masline (Tablica 5). Istraživanja različitih grupa autora (Lukić i sur., 2020; Pasković i sur., 2020) navode da se sorta Istarska bjelica izdvaja zbog relativno niže koncentracije luteolina-7-O-glukozida u odnosu na druge sorte masline, a rezultati ovog istraživanja dalje ukazuju da bi prekomjerna gnojidba N mogla dodatno smanjiti nakupljanje ovog fenolnog spoja i u uzgojnim uvjetima.

U svom su istraživanju Tekaya i sur. (2016) utvrdili da primjena viših koncentracija N, u kombinaciji s drugim elementima, negativno utječe na koncentraciju oleuropeina u listu masline. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s navodima navedene grupe autora budući da se kontrolni gnojidbeni tretman N0 izdvojio u odnosu na gnojidbene tretmane N4 – N6 zbog niže koncentracije oleuropeina u korijenu i izbojku (Tablica 5, Grafikon 10). U listu je koncentracija oleuropeina bila značajno veća u gnojidbenom tretmanu N4 u odnosu na gnojidbene tretmane N5 i N6 te kontrolni gnojidbeni tretman N0. Prema Song i sur. (2020) primjena optimalne koncentracije N pozitivno utječe na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaza, dok nedostatak N negativno utječe na njegovu aktivnost. Međutim, navedena grupa autora nije istražila učinak primjene viših koncentracija N na aktivnost enzima  $\beta$ -glukozidaza. S obzirom da je biosinteza oleuropeina u listu masline regulirana navedenim enzimom (Koudounas i sur., 2021), može se pretpostaviti da je nakupljanje oleuropeina u listu gnojidbenog tretmana N4, u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0, bilo potaknuto optimalnom koncentracijom N. Stoga, potrebna su dodatna istraživanja kojima bi se utvrdio utjecaj primjene nižih/viših koncentracija N na enzimsku aktivnost i opisala njihova povezanost s koncentracijom oleuropeina u vegetativnim organima masline.

Erel i sur. (2013) uočili su da primjena viših koncentracija N negativno utječe na koncentraciju ukupnih fenola u maslinovom ulju. Navedena su zapažanja u skladu s rezultatima ovog istraživanja usporede li se gnojidbeni tretmani N4 – N6 u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0 za korijen i izbojak masline (Tablica 5). Primjena gnojidbenih tretmana s N (N1 – N6) u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0 nije značajno utjecala na koncentraciju ukupnih fenola u listu masline. Keski-Saari i Julkunen-Tiitto (2003) navode da razlika u koncentraciji ukupnih fenola može biti pokazatelj indirektnog utjecaja N na biosintezu fenolnih spojeva, ali i posljedica njihova razrjeđenja koje nastupa povećanim porastom ukupne biomase masline.

Prema navodima Pasković i sur. (2019) primjena B ne utječe na koncentraciju hidroksitirozola u listu sadnica masline sorte Leccio del Corno, dok je nakupljanje tirozola u listu navedene sorte povezano s koncentracijom i vremenom proteklim od njegove primjene. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je primjena gnojidbenih tretmana s B (B1 – B6) negativno utjecala na koncentraciju tirozola u listu, dok je utjecaj na koncentraciju

hidroksitirozola uočen samo u izbojku Istarske bjelice (Tablica 7). Jasna veza između primijenjenih gnojidbenih tretmana, utvrđene koncentracije B i navedenih fenolnih spojeva u ovom je istraživanju izostala (Tablica 8, Grafikon 11). Prema navodima Alipieva i sur. (2014) u biosintezi verbaskozida sudjeluju hidroksitirozol i tirozol. Obied i sur. (2008) predlažu da tirozol sudjeluje u biosintezi oleuropeina, dok esteri hidroksitirozola i elenolinske kiseline tvore oleuropein. U ovom je istraživanju uočena povezanost između hidroksitirozola ili tirozola i verbaskozida ( $p = 0,006$ ,  $r = 0,502$ ;  $p = 0,005$ ,  $r = 0,513$ ) odnosno hidroksitirozola ili tirozola i oleuropeina ( $p = 0,001$ ,  $r = 0,596$ ;  $p < 0,001$ ,  $r = -0,646$ ) u listu masline (podaci nisu prikazani). Koncentracija navedenih fenolnih spojeva može biti posljedica direktnog utjecaja B, uočenih fizioloških promjena nastalih primjenom gnojidbenih tretmana, ali i njihove uloge u biosintezi složenijih spojeva kao što su verbaskozid ili oleuropein.

Maslina pored verbaskozida sadrži i druge fenolne spojeve s *orto*-difenolnom strukturom kojima pripadaju hidroksitirozol i oleuropein (Soufi i sur., 2014). Grupa autora (Silva i sur., 2023) uočila je da izostanak primjene gnojiva s B ne utječe na koncentraciju *orto*-difenola u plodu masline i maslinovom ulju. U ovom je istraživanju utvrđena zamjetno viša koncentracija verbaskozida u listu masline kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 u odnosu na tretmane B2 – B5 (Tablica 7). Nakupljanje fenolnih spojeva *orto*-difenolne strukture, u uvjetima nedostatka ili relativno viših koncentracija B u listu, nije zabilježeno u svim vegetativnim organima masline ili je za pojedine fenolne spojeve u ovom istraživanju u potpunosti izostalo. Tekaya i sur. (2016) uočili su da primjena gnojiva koja sadrže B različito utječe na pojedinačne fenolne spojeve navedene strukture i nije usko povezana s njegovom koncentracijom u listu masline. Rezultati ovog istraživanja dodatno ukazuju da je odnos između koncentracije B i fenolnih spojeva skupine *orto*-difenola u vegetativnim organima masline varijabilan, a ulogu B u nakupljanju fenolnih spojeva navedene strukture potrebno je dodatno istražiti.

Visoka koncentracija oleuropeina u listu Istarske bjelice značajno je svojstvo ove sorte (Pasković i sur., 2020). Neovisno o primijenjenom gnojidbenom tretmanu s B, u ovom je istraživanju koncentracija oleuropeina bila najviša u listu, nakon kojeg su slijedili korijen i izbojak (Tablica 7). Osim što list masline sadrži visoke koncentracije navedenog fenolnog spoja, omjer verbaskozida i oleuropeina navodi se kao značajno sortno svojstvo i prosječno se kreće u rasponu 0,05 – 0,63 (Tsimidou i Papatou, 2010). U listu kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 omjer verbaskozida i oleuropeina je iznosio 0,11, dok je u ostalim gnojidbenim tretmanima (B1 – B6) iznosio 0,03 – 0,04 (podaci nisu prikazani). Navedeni rezultati ukazuju da na omjer verbaskozida i oleuropeina, osim karakteristika sorte, može utjecati i primjena gnojidbenih tretmana s B (Tablica 7). Iako navedeni učinak B prethodno nije istražen, Mechri i sur. (2019) navode da na omjer verbaskozida i oleuropeina utječu i pojedini

abiotički čimbenici. Promatra li se utjecaj gnojidbenih tretmana s B na koncentraciju oleuropeina u vegetativnim organima masline, može se uočiti da je njihov učinak na koncentraciju oleuropeina u korijenu i izbojku masline izostao (Tablica 7). Pasković i sur. (2019) iznose da folijarna gnojidba B, u periodu od 90 dana nakon njegove primijene, povećava koncentraciju oleuropeina u mladom i starom listu sorte Leccio del Corno. U ovom je istraživanju koncentracija oleuropeina u listu bila značajno manja u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0 u odnosu na pojedine gnojidbene tretmane (B1, B2 i B6) u kojima je B primijenjen. Nadalje, kontrolni gnojidbeni tretman B0 izdvojio se u odnosu na pojedine tretmane po nižoj koncentraciji oleuropeina u korijenu (Grafikon 11). Uočene razlike u koncentraciji oleuropeina mogu biti posljedica izraženije biosinteze verbaskozida ili oleuropeina uslijed nastalog fiziološkog stresa (Mechri i sur., 2019), ali i specifičan odgovor Istarske bjelice koja nakuplja relativno veće koncentracije B i oleuropeina u listu u odnosu na pojedine sorte maslina (Lukić i sur., 2020; Pongrac i sur., 2023).

Istraživanja provedena na sadnicama sorte Manaki ukazuju da nedostatak B ne utječe na koncentraciju luteolina-7-O-glukozida u listu masline (Liakopoulos i Karabourniotis, 2005). U navedenom je istraživanju utvrđena relativno viša koncentracija B (8,8 mg/kg ST B) u odnosu na koncentraciju B (0,05 mg/kg ST B) utvrđenu u listu kontrolnog gnojidbenog tretmana B0 (Tablica 4). Može se pretpostaviti da je dugotrajniji nedostatak B negativno utjecao na koncentraciju luteolina-7-O-glukozida, dok su relativno niže (6,81 – 6,88 mg/kg ST B) i relativno više (95,87 mg/kg ST) koncentracije B utjecale na njegovo nakupljanje u listu sorte Istarske bjelice (Tablica 7). Wimmer i sur. (2019) ističu da primjena viših koncentracija B nema uvijek pozitivan utjecaj na nakupljanje fenolnih spojeva, a učinak B može biti vrlo varijabilan i stoga često kontradiktoran. U ovom je istraživanju učinak B na koncentraciju luteolina-7-O-glukozida u korijenu izostao, dok je primjena viših koncentracija B negativno utjecala na koncentraciju luteolina-7-O-glukozida u izbojku Istarske bjelice (Tablica 7 – 8).

Ruiz i sur. (1998) navode da je optimalna koncentracija B u listu povezana s negativnom aktivnošću enzima ključnih u biosintezi fenolnih spojeva. Navedena grupa autora zaključuje da optimalna ishranjenost B negativno utječe na koncentraciju fenolnih spojeva, dok nedostatak i suvišak B povećavaju njihovu koncentraciju u listu. Negativan učinak optimalnog sadržaja B, utvrđenog u listu masline gnojidbenih tretmana B3 – B5 (B6), na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva je izostao u svim istraženim vegetativnim organima masline (Tablica 7). Stoga, iako Ruiz i sur. (1998) zaključuju da primjena B ima nelinearan učinak na koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva, u ovom je istraživanju navedeni učinak B izostao. Wimmer i sur. (2019) navode pretpostavku da, osim izravnog utjecaja B na metabolizam fenolnih spojeva, porast u koncentraciji navedene skupine spojeva može biti posljedica fizioloških promjena koje su u biljci nastupile uslijed nedostatka ili suviška ovog



mikroelementa. U ovom su istraživanju uočeni simptomi nedostatka B u kontrolnom gnojidbenom tretmanu B0, a koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u navedenom se gnojidbenom tretmanu nije izdvojila u odnosu na ostale tretmane (Tablica 7). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da ishrana masline B može značajno, ali vrlo različito utjecati na koncentraciju fenolnih spojeva u pojedinim vegetativnim organima masline, a potrebna su dodatna istraživanja kojima će se utvrditi utjecaj njegove primjene u uzgojnim uvjetima na ova i ostala svojstva Istarske bjelice.

## 5.2. Protugljivični učinak ekstrakata fenola na *Verticillium dahliae*

Negativan utjecaj primjene dušičnih gnojiva na tolerantnost masline na *V. dahliae* prethodno je istražen (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Pérez-Rodríguez i sur., 2022). Pérez-Rodríguez i sur. (2022) uočili su da je primjena gnojiva koja sadrže isključivo N, u odnosu na primjenu NPK gnojiva ili potpuni izostanak primjene gnojiva, značajno povećala intenzitet razvoja *V. dahliae* kod sorte Picual. Navedena grupa autora nije ispitala učinak primjene različitih koncentracija N na koncentraciju fenolnih spojeva u vegetativnim organima masline i ulogu fenolnih spojeva u razvoju *V. dahliae*. Stoga, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak gnojidbe N na sastav fenola masline (Pokus 1) i učinak gnojidbom modificiranih ekstrakata fenola masline (Pokus 3 a) na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u uvjetima *in vitro*.

López-Moral (2022) navodi da je klijavost konidija *V. dahliae* znatno veća primjenom eksudata korijena osjetljive sorte Picual u odnosu na primjenu eksudata korijena tolerantne sorte Frantoio u uvjetima *in vitro*. U ovom je istraživanju primjena ekstrakata fenola korijena EF-N1 (FPM-1 – FPM-3) imala značajno veći negativno inhibitoran odnosno stimulatívni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u odnosu na kontrolni tretman EF-N0 (Grafikon 12). Značajno veći stimulatívni učinak na početnu klijavost konidija *V. dahliae* V-263 (FPM-1), u odnosu na kontrolni tretman EF-N0, uočen je primjenom ekstrakata fenola korijena EF-N5. Ovi su rezultati u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je utvrđeno da primjena viših koncentracija N modificira sastav eksudata korijena i time potiče klijavost konidija *V. dahliae* (López-Moral i sur., 2022 b). Stoga, prethodno opisan intenzivniji razvoj *V. dahliae* u uzgojnim uvjetima masline gdje je primijenjena viša koncentracija dušičnih gnojiva (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011), može biti posljedica negativnog utjecaja N na sastav fenolnih spojeva koji imaju značajnu ulogu u obrambenim mehanizmima masline. Ipak, prethodna istraživanja ukazuju da veća dostupnost N utječe i na intenzivniji porast biljnog tkiva uslijed čega su biosinteza lignina i stanične stijenke smanjeni, a osjetljivost na različite patogene je izraženija (Sun i sur., 2020). Potrebna su dodatna

istraživanja kojima bi se utvrdila povezanost između sastava fenolnih spojeva osjetljivih/tolerantnih sorata masline, utjecaja primjene dušičnih gnojiva na njihov sastav te kolonizacije korijena masline vrstom *V. dahliae*.

U svom su istraživanju López-Moral i sur. (2022 a) primjenom biostimulatora modificirali sastav ekstrakta izbojka masline sorte Picual i time povećali njegov inhibitorni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* u uvjetima *in vitro*. U ovom su istraživanju ekstrakti fenola izbojka (EF-N0 – EF-N6) imali stimulatívni učinak na klijavost konidija *V. dahliae* V-263, a stimulatívni učinak kontrolnog tretmana EF-N0 bio je značajno veći u odnosu na ekstrakte fenola EF-N1, EF-N3 i EF-N4 (FPM-2 – FPM-3) (Grafikon 13). Nadalje, pojedini su ekstrakti fenola izbojka (EF-N1 i EF-N4) imali veći početni stimulatívni učinak (FPM-1) u odnosu na isti u posljednjem (FPM-3) periodu mjerenja. Konidiji su strukture neophodne u vaskularnom širenju *V. dahliae* u maslini (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; López-Moral i sur., 2022 a), a rezultati ovog i prethodnih istraživanja ukazuju da sastav izbojka masline može utjecati, kako negativno tako i pozitivno, na njihov razvoj. Prema navodima Godene i sur. (2022) Istarska bjelica je vrlo osjetljiva na nedefolijacijske izolate *V. dahliae* i može se pretpostaviti da bi neuravnotežena primjena N u uzgojnim uvjetima masline mogla dodatno povećati njezinu osjetljivost na ovog patogena. Naime, u ovom istraživanju primjena N nije utjecala na koncentraciju verbaskozida u izbojku masline, ali je utjecala na koncentraciju oleuropeina u izbojku gnojidbenog tretmana N0 koja je bila najveća (Tablica 5). Markakis i sur. (2010) uočili su više koncentracije oleuropeina zastupljene u sortama masline osjetljivima na *V. dahliae* u odnosu na tolerantne sorte. Može se pretpostaviti da bi potpuni izostanak primjene N mogao negativno utjecati na razvoj masline u uzgojnim uvjetima i izmijeniti sastav fenolnih spojeva u korist *V. dahliae*. Sudeći po rezultatima ovog istraživanja provedenom *in vitro*, tako izmijenjen sastav fenolnih spojeva masline mogao bi stimulirati klijavost konidija u njezinom vaskularnom tkivu čime bi učestalost sekundarnih infekcija i širenje *V. dahliae* u vegetativnim organima masline pri neuravnoteženoj gnojidbi N bili izraženiji. Navedeno je potrebno provjeriti u budućim istraživanjima *in vivo*.

Varo i sur. (2017) uočili su da ekstrakt lista tolerantne sorte Frantoio ima veći inhibitorni učinak na razvoj micelija *V. dahliae* u odnosu na ekstrakt lista osjetljive sorte Leccino, a utjecaj ekstrakata lista masline na klijavost konidija *V. dahliae* ostaje neistražen. Primjena ekstrakata fenola lista masline (EF-N0 – EF-N6) imala je stimulatívni učinak (FPM-1 – FPM-3) na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 (Grafikon 14). Analizom fenolnih spojeva u listu masline, nakon primjene gnojidbenih tretmana s N (Pokus 1), uočena je viša koncentracija gotovo svih fenolnih spojeva u odnosu na ostale vegetativne organe masline (Tablica 5). Cardoni i sur. (2023) navode da tolerantna sorta Frantoio sadrži više koncentracije oleuropeina i niže koncentracije verbaskozida u odnosu na osjetljivu sortu Picual, dok Markakis i sur. (2010) navode da je viša koncentracija verbaskozida u odnosu na oleuropein

utvrđena u tolerantnoj sorti Koroneiki u odnosu na osjetljivu sortu Amfissis. U ovom je istraživanju list masline sadržavao relativno veće koncentracije svih fenolnih spojeva (Tablica 5), ali je omjer verbaskozida i oleuropeina (0,02 – 0,04) u tom vegetativnom organu bio najmanji (rezultati nisu prikazani). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je unatoč prosječno većoj koncentraciji fenolnih spojeva u listu masline nizak omjer pojedinačnih fenolnih spojeva, kao što su verbaskozid i oleuropein, stimulirao klijavost konidija *V. dahliae* V-263. Nadalje, prethodno je ustanovljeno da otpalo lišće masline može sadržavati propagule *V. dahliae* i time doprinijeti njegovu širenju unutar i između različitih nasada masline (Tjamos i Despina, 1987; López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). Uočen negativan učinak N na fenolni sastav lista Istarske bjelice, kao i stimulatívni učinak gnojdbom modificiranih ekstrakata fenola lista na konidije *V. dahliae* V-263, potrebno je dodatno istražiti kako bi se utvrdilo utječe li primjena dušičnih gnojiva na vijabilnost konidija, a time i širenje vrste *V. dahliae* listom masline u proizvodnim uvjetima.

Rezultati ovog istraživanja *in vitro* ukazuju da bi umjerena primjena dušičnih gnojiva, u odnosu na izostanak njihove primjene ili primjenu visokih koncentracija N, mogla doprinijeti manjoj osjetljivosti masline na nedefolijacijske izolate *V. dahliae*. Stoga, potrebno je dodatno istražiti, pokusima *in vivo*, utječe li umjerena opskrbljenost masline N na sastav fenolnih spojeva koji doprinose njezinoj manjoj osjetljivosti i većoj stopi oporavka od *V. dahliae*.

Pozitivan utjecaj primjene B na tolerantnost različitih biljnih vrsta prethodno je istražen za pojedine vrste roda *Verticillium* (Graham i Webb, 1991; Singh, 2015), dok utjecaj gnojdbom B na razvoj *V. dahliae* u maslini ostaje neistražen (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020; Zhang i sur., 2021). Pasković i sur. (2019) zaključuju da primjena B značajno utječe na sastav fenolnih spojeva masline, a izmjena sastava navedene skupine spojeva mogla bi utjecati na razvoj *V. dahliae* u maslini. Kako bi se utvrdio utjecaj gnojdbom izmijenjenog sastava fenolnih spojeva na *V. dahliae*, istražen je učinak modificiranih ekstrakata fenola vegetativnih organa masline (Pokus 2) na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u uvjetima *in vitro* (Pokus 3 b).

Literaturno je opisano da nedostatak B u biljkama utječe na sastav eksudata korijena koji potom stimulira infekciju korijena biljke različitim vrstama patogenih gljiva (Singh, 2015). Graham i Webb (1991) navode da primjena viših koncentracija B smanjuje intenzitet razvoja vrste *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth u korijenu rajčice. U ovom je istraživanju primjena ekstrakata fenola korijena (EF-B3 – EF-B5) imala inhibitorni učinak (FPM-2, FPM-3) na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 (Grafikon 15). Singh (2015) uočeni učinak primjene B na *V. albo-atrum* dovodi u usku vezu s njegovom ulogom u metabolizmu biljaka. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u korijenu masline (Pokus 2) značajno se razlikovala između gnojdbenih tretmana s B (Tablica 7). U ovom je istraživanju uočena

relativno viša koncentracija verbaskozida u korijenu u odnosu na druge vegetativne organe masline, a na njegovu je koncentraciju primjena gnojidbenih tretmana s B značajno utjecala (Tablica 7). Povezanost između koncentracije verbaskozida i osjetljivosti/tolerantnosti masline na *V. dahliae* razlikuje se između istraženih sorata masline (Markakis i sur., 2010; Cardoni i sur., 2023). Iako u ovom istraživanju nije uočena jasna veza između koncentracije verbaskozida utvrđene u korijenu masline te klijavosti konidija *V. dahliae* V-263, može se pretpostaviti da su koncentracija i omjer pojedinačnih fenolnih spojeva u ekstraktima fenola korijena masline doprinijeli uočenom inhibitornom učinku. Nadalje, za pretpostaviti je da uloga fenolnih spojeva kao signalnih molekula i kemoatraktanata ne doprinosi samo prepoznavanju biljke domaćina (Osheroi i May, 2001), već i intenzitetu razvoja *V. dahliae* u vegetativnim organima iste budući da je klijavost konidija postupno smanjena primjenom pojedinih ekstrakata fenola korijena u kasnijim periodima mjerenja (FPM-1 – FPM-3). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da primjena gnojidbenih tretmana s B može modificirati sastav fenolnih spojeva u korijenu Istarske bjelice koji različito inhibiraju razvoj konidija izolata *V. dahliae* V-263. Potrebna su dodatna istraživanja u proizvodnim uvjetima kojima bi se utvrdilo može li primjena gnojiva koja sadrže B smanjiti razvoj nedefolijacijskih izolata *V. dahliae* u osjetljivim sortama kao što je Istarska bjelica.

Prema navodima Berlinger i Powelson (2005) konidiji su ključni u kolonizaciji vaskularnog biljnog tkiva gdje, uz porast micelija, doprinose akropetalnom širenju vrste *V. dahliae*. Ranijim je istraživanjima utvrđeno da su konidiji u takvom okruženju izloženi različitoj koncentraciji i sastavu fenolnih spojeva (Báidez i sur., 2007). U ovom je istraživanju primjena ekstrakata fenola izbojka masline (EF-B2) inhibitorno utjecala (FPM-2 – FPM-3) na klijavost konidija *V. dahliae* V-263, dok je primjena ekstrakata fenola kontrolnog tretmana (EF-B0) imala najveći stimulativni učinak (Grafikon 16). U izbojku masline gnojidbenog tretmana B0 (Pokus 2), u odnosu na gnojidbeni tretman B2, utvrđene su značajno niže koncentracije hidroksitirozola, verbaskozida i luteolina-7-O-glukozida (Tablica 7). Báidez i sur. (2007) navode da *V. dahliae* svojom hidrolitičkom aktivnošću može razgraditi pojedine fenolne spojeve i tako savladati obrambene mehanizme masline. U navedenom je istraživanju utvrđen značajan protugljivični učinak luteolina-7-O-glukozida na razvoj micelija vrste *V. dahliae*. Ipak, jasna poveznica između koncentracije fenolnih spojeva određenih u izbojku masline (Tablica 7) i protugljivičnog učinka ekstrakata fenola izbojka masline na klijavost konidija *V. dahliae* (Pokus 3 b; Grafikon 16) u ovom istraživanju nije uočena.

Istraživanja o utjecaju ekstrakata fenola lista, modificiranih primjenom B, na klijavost konidija *V. dahliae* nisu bila dostupna u pregledanoj literaturi. Primjena ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6), u odnosu na ekstrakte fenola korijena i izbojka masline, nije dovela do inhibitornog učinka na klijavost konidija *V. dahliae* V-263 u ovom istraživanju (Grafikon 17). Stimulativni učinak ekstrakta fenola lista kontrolnog tretmana EF-B0 bio je veći u

odnosu na primjenu ekstrakata fenola EF-B2 i EF-B6 (FPM-3). U listu masline gnojdbenih tretmana B2 i B6 (Pokus 2), u odnosu na kontrolni gnojdbeni tretman B0, utvrđena je manja koncentracija tirozola te viša koncentracija luteolina-7-O-glukozida i oleuropeina (Tablica 7). Uočeni stimulativni učinak ekstrakata fenola može biti povezan s relativno nižom koncentracijom verbaskozida u listu u odnosu na korijen masline (Tablica 7), ali i većoj zastupljenosti onih fenolnih spojeva čiji je protugljivični učinak na *V. dahliae* relativno niži (Báidez i sur., 2007). Prethodno je utvrđeno da eksudati lišća pojedinih biljnih vrsta mogu stimulirati/inhibirati klijavost spora vrste *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastu u tlu (Bailey i Lazarovits, 2003). Stoga, potrebno je dodatno istražiti dovode li otpali listovi masline, koji su značajan dio ostataka rezidbe i čiji je sastav fenola modificiran primjenom B, do stimulativnog ili inhibitornog učinka na klijavost konidija *V. dahliae* u tlu. Na porast micelija *V. dahliae* mogu utjecati fiziološke karakteristike, ali i distribucija sekundarnih metabolita, kao što su fenolni spojevi, u vegetativnim organima masline (Markakis i sur., 2010; Gharbi i sur., 2017; Cardoni i sur., 2023). U ovom je istraživanju ispitan učinak ekstrakata fenola (korijen, izbojak, list) na porast i obilježja micelija gljive *V. dahliae* V-263 (Pokus 4). Protugljivični učinak pojedinačnih fenolnih spojeva na porast micelija *V. dahliae* ranije je opisan za jednostavne fenole, fenolne kiseline, flavonoide i sekoiridoide (Báidez i sur., 2007; El Hadrami i sur., 2011; Drais i sur., 2021). Unatoč tome, istraživanja o protugljivičnom učinku ekstrakata fenola masline, modificiranih primjenom B, na micelij vrste *V. dahliae* nisu bila dostupna u pregledanoj literaturi.

U ovom je istraživanju (Pokus 4) primjena ekstrakata fenola korijena (EF-B0 – EF-B6) imala inhibitorni učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263 (Tablica 9). Inhibitorni učinak ekstrakata fenola korijena kontrolnog tretmana EF-B0, na porast micelija *V. dahliae* V-263, bio je značajno manji u odnosu na ekstrakte fenola korijena EF-B2, EF-B3 i EF-B5 (FPM-4). Može se pretpostaviti da je niža koncentracija verbaskozida (Tablica 7), utvrđena u korijenu masline pojedinih gnojdbenih tretmana (B2, B3 i B5), imala značajan utjecaj na porast micelija *V. dahliae* V-263. Markakis i sur. (2010) uočili su pozitivnu vezu između koncentracije DNA *V. dahliae* i verbaskozida u korijenu osjetljivih sorata masline, iako nije jasno ukoliko je koncentracija navedenog spoja u navedenom istraživanju bila povezana s intenzivnijom biosintezom verbaskozida kao značajnog fenolnog spoja u obrambenim mehanizmima masline ili je bila posljedica nastalog biotičkog stresa. Osim inhibitornog učinka ekstrakata fenola korijena na porast micelija uočen je i njihov utjecaj na morfološka obilježja micelija (FPM-4) *V. dahliae* V-263 (Slika 9). U odnosu na kontrolni tretman EF-B0, micelij *V. dahliae* V-263 bio je prorijeđen i pruinozan primjenom ekstrakata fenola korijena EF-B2, EF-B3 i EF-B5 (Slika 9). Báidez i sur. (2007) uočili su da fenolni spojevi utječu na morfološka obilježja micelija *V. dahliae* i zaključuju da navedene promijene mogu biti posljedica njihova toksičnog učinka na ovu vrstu. Navedeni rezultati potencijalan su

pokazatelj različitih mehanizama djelovanja fenolnih spojeva na *V. dahliae* koje je potrebno dodatno istražiti i utvrditi njihov značaj u interakciji nedefolijacijskih izolata vrste *V. dahliae* s maslinom.

Primjena ekstrakata fenola izbojka imala je različit protugljivični učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263 (Tablica 9). Primjena kontrolnog tretmana EF-B0 imala je stimulativan učinak, a ekstrakt fenola izbojka EF-B2 imao je značajno veći inhibitorni učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263 u odnosu na navedeni kontrolni tretman (FPM-4). Analizom izbojka masline utvrđena je značajno viša koncentracija hidroksitirozola, verbaskozida i luteolina-7-O-glukozida u gnojidbenom tretmanu B2 u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman B0 (Tablica 7). Báidez i sur. (2007) uočili su da masline, u kojima je *V. dahliae* zastupljen, imaju izraženije aktivno nakupljanje fenolnih spojeva u izbojku, u odnosu na one masline u kojima *V. dahliae* nije utvrđen. Istraženi ekstrakti fenola izbojka masline imali su neznatan inhibitoran učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263, a može se pretpostaviti da bi viša koncentracija konstitutivnih fenolnih spojeva, uz njihovo aktivno nakupljanje u izbojku masline, mogli imati drukčiji protugljivični učinak na *V. dahliae* u proizvodnim uvjetima. Pored navedenoga, primjena ekstrakata fenola izbojka EF-B5 stimulirala je formiranje mikrosklerocija *V. dahliae* V-263 u hranjivoj podlozi (Slika 10), što ukazuje na moguću prilagodbu *V. dahliae* na nepovoljne uvjete formiranjem mikrosklerocija (Montes-Osuna i Mercado-Blanco, 2020), a u uvjetima *in vivo* predstavljali bi nepovoljan ishod za maslinu kao biljku domaćina.

Varo i sur. (2017) uočili su da primjena ekstrakata lista tolerantne sorte Frantoio i osjetljive sorte Leccino inhibitorno utječe na porast micelija *V. dahliae*, dok je njihov utjecaj na vijabilnost mikrosklerocija *V. dahliae* u uvjetima *in vitro* izostao. U navedenom istraživanju nije utvrđena značajna razlika u inhibitornom učinku ekstrakata lista navedenih sorata na porast micelija nedefolijacijskog izolata *V. dahliae*. U ovom istraživanju također nisu utvrđene značajne razlike između protugljivičnog učinka (FPM-4) ekstrakata fenola lista kontrolnog tretmana EF-B0 i ostalih ispitanih ekstrakata fenola lista masline na porast micelija *V. dahliae* V-263 (Tablica 9). Nadalje, ekstrakti fenola lista EF-B1 i EF-B6 imali su stimulativan učinak na porast micelija *V. dahliae* V-263. Povezanost između protugljivičnog učinka primijenjenih ekstrakata fenola lista (Pokus 4) i utvrđene koncentracije fenola u listu masline (Pokus 2) u ovom istraživanju nije jasna. Ipak, rezultati ovog istraživanja ukazuju da izmjena sastava ekstrakata fenola lista masline, primjenom gnojidbenih tretmana s B, može doprinijeti njihovom protugljivičnom učinku. Promatra li se učinak ekstrakata lista na morfološka obilježja *V. dahliae* V-263, u ovom je istraživanju uočeno da je primjena ekstrakata fenola lista (EF-B0 – EF-B6) stimulirala razvoj mikrosklerocija u odnosu na negativnu kontrolu (DMSO) (Slika 11). Prema navodima Báidez i sur. (2007) fenolni spojevi utječu na zadebljanje stanične stijenke hife te predlažu da ovim mehanizmom *V. dahliae*

nastoji smanjiti toksičan učinak fenolnih spojeva na njegov razvoj i preživljavanje. Iako mikrosklerociji nisu opisani u navedenom istraživanju, rezultati ovog istraživanja ukazuju da specifičan sastav fenolnih spojeva lista masline može potaknuti njihovo formiranje. Razlike uočene između učinka ekstrakata fenola lista na klijavost konidija i formiranje mikrosklerocija, gdje je s jedne strane utvrđena stimulacija te klijavosti i formiranja mikrosklerocija, a s druge strane gdje je porast micelija bio inhibiran, ukazuju da bi fenolni spojevi masline mogli imati jednako različite mehanizme djelovanja na pojedine strukture *V. dahliae* u uvjetima *in vivo*.

Rezultati ovog *in vitro* istraživanja ukazuju da bi primjena B prije sadnje i/ili u uzgojnim uvjetima masline mogla doprinijeti njezinoj većoj tolerantnosti na *V. dahliae* uslijed izmijenjenog sastava fenolnih spojeva u njezinim vegetativnim organima. U uzgojnim uvjetima gdje je utvrđena prisutnost propagula *V. dahliae*, ishrana sadnica masline višim koncentracijama B prije sadnje mogla bi izmijeniti sastav fenolnih spojeva korijena i povećati tolerantnost masline na nedefolijacijske izolate *V. dahliae*. Naime, izmijenjen sastav konstitutivnih fenolnih spojeva u korijenu masline mogao bi smanjiti uspješnost kolonizacije navedenog vegetativnog organa i daljnje akropetalno širenje *V. dahliae* u maslini. U uvjetima kada je infekcija višegodišnjih stabala masline *V. dahliae* već utvrđena, primjena umjerenih koncentracija B mogla bi smanjiti sekundarno klijanje konidija i razvoj micelija u drvenastim organima masline. Prethodnim je istraživanjima uočen oporavak masline od *V. dahliae* (Jiménez-Díaz i sur., 2012), a izmjena sastava fenolnih spojeva masline primjenom B mogla bi doprinijeti istome. S obzirom da su istraživanja na maslini provedena u kontroliranim uvjetima (Pokus 1 i 2), te da su istraživanja na *V. dahliae* provedena u uvjetima *in vitro* (Pokus 3 a,b; Pokus 4), budućim će istraživanjima *in vivo* biti potrebno utvrditi vezu između ishranom izmijenjenog sastava fenolnih spojeva i osjetljivosti/tolerantnosti masline na *V. dahliae* u uzgojnim uvjetima.

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenoga istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

**1 A. Koncentracija oleuropeina** u vegetativnim organima masline, ispitana u vezi s primijenjenim gnojidbenim tretmanima (B0 – B6), nije u skladu s postavljenom hipotezom budući da primjena najniže i najviše molarne koncentracije B nije povećala koncentraciju oleuropeina u korijenu, izbojku i listu masline u odnosu na ostale gnojidbene tretmane.

**1 B. Protugljivični učinak** na klijanje konidija i porast micelija *V. dahliae* V-263, ispitani u vezi s primjenom ekstrakata fenola masline proizašlih iz gnojidbenih tretmana (B0 – B6), nije u skladu s postavljenom hipotezom. Primjena ekstrakata fenola korijena (EF-B3 – EF-B5) i izbojka (EF-B2) pokazala je protugljivični učinak jer je dovela do inhibicije klijanja konidija *V. dahliae* V-263, a takav protugljivični učinak, na porast micelija, utvrđen je i kod primjene gotovo svih ekstrakata fenola vegetativnih organa masline.

**1 C. Rast i razvoj korijena te izbojka masline**, ispitani u vezi s primijenjenim gnojidbenim tretmanima (B0 – B6), nisu u skladu s postavljenom hipotezom budući da je primjena viših molarnih koncentracija B (B4 – B6) pozitivno utjecala na istražena vegetativna svojstva korijena i izbojka masline u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman B0.

**1 D. Koncentracija B** u korijenu i listu masline, ispitana u vezi s primijenjenim gnojidbenim tretmanima (B0 – B6), pratila je porast molarne koncentracije B u hranivoj otopini. Koncentracija B u izbojku masline nije pratila porast molarne koncentracije hranive otopine, stoga se postavljena hipoteza djelomično prihvaća.

**2 A. Koncentracija oleuropeina** u korijenu i izbojku masline, ispitana u vezi s primijenjenim gnojidbenim tretmanima (N0 – N6), potvrđuje postavljenu hipotezu budući da je koncentracija oleuropeina bila značajno manja u gnojidbenim tretmanima u kojima je primijenjena viša molarna koncentracija N (gnojidbeni tretmani N4 – N6) u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0. Koncentracija oleuropeina u listu masline je primjenom viših molarnih koncentracija N (gnojidbeni tretmani N4 – N6), u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0, bila različita i stoga nije u potpunosti u skladu s postavljenom hipotezom.

**2 B. Protugljivični učinak** na klijanje konidija *V. dahliae* V-263, ispitani u vezi s primjenom ekstrakata fenola masline proizašlih iz istraženih gnojidbenih tretmana (N0 – N6), nije u skladu s postavljenom hipotezom. Primjena svih istraženih ekstrakata fenola vegetativnih organa masline (EF-N0 – EF-N6) stimulirala je klijavost konidija *V. dahliae* V-263, čime je stoga izostao protugljivični učinak.

**2 C. Koncentracija N** u vegetativnim organima masline, ispitana u vezi s primijenjenim gnojidbenim tretmanima (N0 – N6), pratila je porast viših molarnih koncentracija N



(gnojidbeni tretmani N4 – N6) u hranivoj otopini u odnosu na kontrolni gnojidbeni tretman N0 i u skladu je s postavljenom hipotezom.

**2 D. Utvrđeni rast i razvoj korijena i izbojka masline**, ispitani u vezi s primijenjenim gnojidbenim tretmanima (N0 – N6), u skladu su s postavljenim hipotezama budući da je primjena viših molarnih koncentracija N (gnojidbeni tretmani N4 – N6) pozitivno utjecala na istražena vegetativna svojstva korijena i izbojka masline.

**3. Rezultati ovog multidisciplinarnog istraživanja** potvrđuju pretpostavku da ishrana B ili N ima značajan utjecaj na koncentraciju fenolnih spojeva u vegetativnim organima masline, ali i da ishranom modificirani sastav fenolnih spojeva masline može značajno utjecati na razvoj *V. dahliae*.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Acosta-Estrada B.A., Gutiérrez-Urbe J.A., Serna-Saldivar S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry* 152: 46-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
2. Agosteo G., Sanzani S., Macri C., Cacciola S., Nicosia M.L.D., Schena L. (2015). Olive leachates affect germination of *Colletotrichum godetiae* conidia and the development of appressoria. *Phytopathologia Mediterranea* 54: 35-44. doi: [10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14302](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14302)
3. Alagna F., Mariotti R., Panara F., Caporali S., Urbani S., Veneziani G., Esposito S., Taticchi A., Rao R., Perrotta G., Servili M., Baldoni L. (2012). Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC plant biology* 12: 1-19. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-162>
4. Alipieva K., Korkina L., Orhan I.E., Georgiev M.I. (2014). Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology advances* 32: 1065-1076. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.001>
5. Ammar S., Contreras M.D.M., Gargouri B., Segura-Carretero A., Bouaziz M. (2017). RP-HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS based metabolic profiling of the potential *Olea europaea* by-product “wood” and its comparison with leaf counterpart. *Phytochemical Analysis* 28: 217-229. doi: <https://doi.org/10.1002/pca.2664>
6. Andrews M., Raven J.A., Lea P.J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of applied biology* 163: 174-199. doi: <https://doi.org/10.1111/aab.12045>
7. Anguita-Maeso M., Trapero-Casas J. L., Olivares-García C., Ruano-Rosa D., Palomo-Ríos E., Jiménez-Díaz R.M., Navas-Cortés J., Landa B.B. (2021). *Verticillium dahliae* inoculation and *in vitro* propagation modify the xylem microbiome and disease reaction to *Verticillium* wilt in a wild olive genotype. *Frontiers in Plant Science* 12: 632689. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.632689>
8. Báidez A.G., Gómez P., Del Río J.A., Ortuño A. (2007). Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 3373-3377. doi: <https://doi.org/10.1021/jf063166d>
9. Bailey K.L., Lazarovits G. (2003). Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and tillage research* 72: 169-180. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00086-2)

10. Bandelj D., Jakše J., Javornik B. (2004). Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. *Euphytica* 136: 93-102. doi: <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000019552.42066.10>
11. Barbara D.J., Clewes E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there?. *Molecular plant pathology* 4: 297-305. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00172.x>
12. Baroudy F., Habib W., Tanos G., Gerges E., Saab C., Choueiri E., Nigro F. (2018). Long-distance spread of *Verticillium dahliae* through rivers and irrigation systems. *Plant disease* 102: 1559-1565. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1189-RE>
13. Barranco D., Rallo L. (2000). Olive cultivars in Spain. *Hort. Technology* 10: 107-110. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.10.1.107>
14. Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G. (1998). Olive germplasm: cultivars and world-wide collections. FAO Library, Rome, Italy. Available at: <http://www.apps3.fao.org/wIEWS/olive/oliv.jsp>. [Pristupljeno: 15.09.2022.]
15. Benčić Đ., Cukon J., Gunjača J. (2009). Morfološka različitost fenotipova masline (*Olea europaea* L.) lokalnog naziva „Bjelice“ u Istri. *Sjemenarstvo* 26: 39-46. Available at: <https://hrcak.srce.hr/47792> [Pristupljeno: 08.10.2022.]
16. Benloch M., Arboleda F., Barranco D., Fernandez-Escobar R. (1991). Response of young olive trees to sodium and boron excess in irrigation water. *HortScience* 26: 867-870. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.7.867>
17. Berlanger I., Powelson M.L. (2005). Verticillium wilt. The Plant Health Instructor. Available at: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/VerticilliumWilt.aspx> [Pristupljeno: 19.02.2023.]
18. Besnard G., Terral J.F., Cornille A. (2018). On the origins and domestication of the olive: A review and perspectives. *Annals of Botany* 121: 385-403. doi: <https://doi.org/10.1093/aob/mcy002>
19. Biała W., Jasiński M. (2018). The phenylpropanoid case—it is transport that matters. *Frontiers in Plant Science* 9: 1610. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01610>
20. Blanco-López M.A., Rodríguez-Jurado D., Jiménez-Díaz R.M. (1990). Incidence and seasonal variation of Verticillium wilt in olive orchards. Book of Abstracts – 5<sup>th</sup> International Verticillium Symposium, Leningrad, Russia, str. 9.
21. Bolaños L., Lukaszewski K., Bonilla I., Blevins D. (2004). Why boron? *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 907-912. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.11.002>
22. Boudet A.M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68: 2722-2735. doi: [10.1016/j.phytochem.2007.06.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012)
23. Boussadia O., Steppe K., Zgallai H., El Hadj S.B., Braham M., Lemeur R., Van Labeke M.C. (2010). Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status

- and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. *Scientia Horticulturae* 123: 336-342. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.023>
24. Bowers J.H., Nameth S.T., Riedel R.M., Rowe R.C. (1996). Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopathology* 86: 614-621. doi: 10.1094/Phyto-86-614
25. Brkić Bubola K., Lukić M., Mofardin I., Butumović A., Koprivnjak O. (2017). Filtered vs. naturally sedimented and decanted virgin olive oil during storage: Effect on quality and composition. *LWT* 84: 370-377. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.069>
26. Broadley M., Brown P., Cakmak I., Rengel Z., Zhao F., Marschner P. (2012). *Function of Nutrients: Micronutrients*. Academic Press, Elsevier Ltd., Oxford, United Kingdom.
27. Brown P.H., Bellaloui N., Wimmer M.A., Bassil E.S., Ruiz J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F., Römheld V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biology* 4: 205-223. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2002-25740>
28. Brown P.H., Hu H. (1998). Boron mobility and consequent management in different crops. *Better Crops* 82: 28-31. Available at: <https://ucanr.edu/sites/nm/files/76661.pdf> [Pristupljeno: 14.8.2022.]
29. Bruno G.L., Sermani S., Triozzi M., Tommasi F. (2020). Physiological response of two olive cultivars to secondary metabolites of *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Physiol. Biochem.* 151: 292-298. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.029>
30. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Second edition. Wiley Blackwell, John Wiley & Sons Ltd., London, United Kingdom.
31. Bui T.-T., Harting R., Braus-Stromeyer S.A., Tran V.-T., Leonard M., Höfer A., Abelmann A., Bakti F., Valerius O., Schlüter R. (2019). *Verticillium dahliae* transcription factors Som1 and Vta3 control microsclerotia formation and sequential steps of plant root penetration and colonisation to induce disease. *New Phytologist* 221: 2138-2159. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.15514>
32. Cardoni M., Mercado-Blanco J., Villar R. (2021). Functional traits of olive varieties and their relationship with the tolerance level towards verticillium wilt. *Plants* 10: 1079. doi: <https://doi.org/10.3390/plants10061079>
33. Cardoni M., Olmo-García L., Serrano-García I., Carrasco-Pancorbo A., Mercado-Blanco J. (2023). The roots of olive cultivars differing in tolerance to *Verticillium dahliae* show quantitative differences in phenolic and triterpenic profiles. *Journal of Plant Interactions*, 18: 2206840. doi: <https://doi.org/10.1080/17429145.2023.2206840>
34. Chatzissavvidis C., Therios I. (2010). Response of four olive (*Olea europaea* L.) cultivars to six B concentrations: Growth performance, nutrient status and gas exchange

- parameters. *Scientia Horticulturae* 127: 39-38. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.008>
35. Chatzissavvidis C., Therios I., Antonopoulou C. (2004). Seasonal variation of nutrient concentration in two olive (*Olea europaea* L.) cultivars irrigated with high boron water. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 683-688. doi: <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511826>
36. Chen J.Y., Klosterman S.J., Hu X.P., Dai X.F., Subbarao K.V. (2021). Key insights and research prospects at the dawn of the population genomics era for *Verticillium dahliae*. *Annual Review of Phytopathology* 59: 31-51. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620-121925>
37. Cheynier V., Comte G., Davies K.M., Lattanzio V., Martens S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry* 72: 1-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
38. Clemens S., Weber M. (2016). The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant Signaling & Behavior* 11: 1114197. doi: <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1114197>
39. Coccozza C., Abdeldaym E.A., Brunetti G., Nigro F., Traversa A. (2021). Synergistic effect of organic and inorganic fertilization on the soil inoculum density of the soilborne pathogens *Verticillium dahliae* and *Phytophthora* spp. Under open-field conditions. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 8: 1-11. doi: <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00223-w>
40. Cvjetković, B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. Zrinski Dd, Čakovec, Hrvatska.
41. Dabbaghi O., Tekaya M., M'barki N., Ouled S., Öden S., Mezghani M. A., Attia F., Labidi F., Prinsen E., Hammami M., Mechri B. (2018). Effect of foliar bio-fertilization on growth and biochemical parameters of olive trees at flowering. *Journal of Plant Nutrition* 41: 2281-2297. doi: <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1500592>
42. Dag A., Ben-David E., Kerem Z., Ben-Gal A., Erel R., Basheer L., Yermiyahu U. (2009). Olive oil composition as a function of nitrogen, phosphorus and potassium plant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 1871-1878. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3664>
43. Damtoft S., Franzyk H., Jensen S.R. (1995a). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: Secoiridoid precursors. *Phytochemistry* 40: 773-784. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00211-O](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00211-O)
44. Damtoft S., Franzyk H., Jensen S.R. (1995b). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: carbocyclic iridoid precursors. *Phytochemistry* 40: 785-792. doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00210-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00210-X)

45. Datnoff L.E., Elmer W.H., Huber D.M. (2007). Mineral nutrition and plant disease. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, United States.
46. De Jonge R., Bolton M.D., Thomma B.P. (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current opinion in plant biology* 14: 400-406. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.005>
47. De la Rosa A.B., Fomsgaard I.S., Laursen B., Mortensen A.G., Olvera-Martínez L., Silva-Sánchez C., Mendoza-Herrera A., Gonzáles-Castañeda J., De León-Rodríguez A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science* 49: 117-121. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.07.012>
48. Diez C.M., Trujillo I., Martínez-Urdiroz N., Barranco D., Rallo L., Marfil P., Gaut B.S. (2015). Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist* 206: 436-447. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.13181>
49. Dong X., Wang M., Ling N., Shen Q., Guo S. (2016). Effects of iron and boron combinations on the suppression of Fusarium wilt in banana. *Scientific Reports* 6: 38944. doi: <https://doi.org/10.1038/srep38944>
50. Drais M.I., Pannucci E., Caracciolo R., Bernini R., Romani A., Santi L., Varvaro L. (2021). Antifungal activity of hydroxytyrosol enriched extracts from olive mill waste against *Verticillium dahliae*, the cause of Verticillium wilt of olive. *Phytopatol. Med* 60: 139-147. doi: <https://doi.org/10.36253/phyto-12019>
51. El Hadrami A., Adam L.R., Daayf F. (2011). Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing antimicrobial metabolites. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 328-335. doi: 10.1094/MPMI-04-10-0098
52. Erel R., Dag A., Ben-Gal A., Schwartz A., Yermiyahu U. (2008). Flowering and fruit set of olive trees in response to nitrogen, phosphorus, and potassium. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 639-647. doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.5.639>
53. Erel R., Kerem Z., Ben-Gal A., Dag A., Schwartz A., Zipori I., Basheer L., Yermiyahu U. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) tree nitrogen status is a key factor for olive oil quality. *Journal of agricultural and food chemistry* 61: 11261-11272. doi: <https://doi.org/10.1021/jf4031585>
54. Failla O., Pedò S., Bassi D., Gigliotti C. (2008). Determination of olive leaf boron critical levels in Northern Italy. *Acta Hort.* 791: 763-768. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.791.116>
55. Fernández-Escobar R. (2018). Trends in olive nutrition. *Acta Hort.* 1199, 215-224 doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1199.35>

56. Fernández-Escobar R. (2019). Olive Nutritional Status and Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science* 10: 1151. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01151>
57. Fernández-Escobar R., Antonaya-Baena M.F., Sánchez-Zamora M.A., Molina-Soria C. (2014). The amount of nitrogen applied and nutritional status of olive plants affect nitrogen uptake efficiency. *Scientia Horticulturae* 167: 1-4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.12.026>
58. Fernández-Escobar R., Beltrán G., Sánchez-Zamora M.A., García-Novelo J., Aguilera M.P., Uceda M. (2006). Olive oil quality decreases with nitrogen over-fertilization. *HortScience* 41: 215-219. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.1.215>
59. Fernández-Escobar R., Guerreiro M., Benlloch M., Benlloch-González M. (2016). Symptoms of nutrient deficiencies in young olive trees and leaf nutrient concentration at which such symptoms appear. *Scientia Horticulturae* 209: 279-285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.07.002>
60. Fernández-Escobar R., Marin L., Sánchez-Zamora M.A., García-Novelo J.M., Molina-Soria C., Parra M.A. (2009a). Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile. *European Journal of Agronomy* 31: 223-232. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.08.001>
61. Fernández-Escobar R., Parra M.A., Navarro C., Arquero, O. (2009b). Foliar diagnosis as a guide to olive fertilization. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7: 212-223. doi: <https://doi.org/10.5424/sjar/2009071-413>
62. Ferreira I., Arrobas M., Moutinho-Pereira J., Correia C.M., Rodrigues M.A. (2020). The effect of nitrogen applications on the growth of young olive trees and nitrogen use efficiency. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 44: 278-289. doi: <https://doi.org/10.3906/tar-1905-26>
63. Fradin E.F., Thomma B.P. (2006). Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathology* 7: 71-86. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00323.x>
64. Gharbi Y., Barkallah M., Bouazizi E., Hibar K., Gdoura R., Triki M.A. (2017). Lignification, phenols accumulation, induction of PR proteins and antioxidant-related enzymes are key factors in the resistance of *Olea europaea* to Verticillium wilt of olive. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 43. doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2343-z>
65. Giorgi A., Mingozzi M., Madeo M., Speranza G., Cocucci M. (2009). Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rchb). *Food Chemistry* 114: 204-211. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.039>

66. Godena S., Ivić D., Ban D., Goreta Ban S. (2022). Characterization of *Verticillium dahliae* isolates from olive and susceptibility of local olive cultivars to Verticillium wilt in Istria, Croatia. *Scientia Horticulturae* 292: 110630. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110630>
67. González-Fontes A. (2020). Why boron is an essential element for vascular plants: A comment on Lewis (2019) 'Boron: The essential element for vascular plants that never was.' *New Phytologist* 226: 1228-1230. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.15519>
68. Grace S.C., Logan B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355: 1499-1510. doi: <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0710>
69. Graham R.D., Webb M.J. (1991). Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. *Micronutrients in agriculture* 4, 329-370. doi: <https://doi.org/10.2136/sssabookser4.2ed.c10>
70. Gros-Balthazard M., Besnard G., Sarah G., Holtz Y., Leclercq J., Santoni S., Khadari B. (2019). Evolutionary transcriptomics reveals the origins of olives and the genomic changes associated with their domestication. *The Plant Journal* 100: 143-157. doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.14435>
71. Grozić K., Pasković I., Žurga P., Majetić Germek V., Lukić I., Brkljača M., Urlić B., Klanjac J., Marčelić Š., Ban D., Kaliterna J., Herak Ćustić M., Goreta Ban S. (2020). Fenolni profil lista masline sorte 'Istarska bjelica' pri različitoj koncentraciji bora u hranivoj otopini. *Glasnik Zaštite Bilja* 43: 56-62. doi: <https://doi.org/10.31727/gzb.43.5.7>
72. Guodong R., Jianguo Z., Xiaoxia L., Ying L. (2019). Identification of putative genes for polyphenol biosynthesis in olive fruits and leaves using full-length transcriptome sequencing. *Food Chemistry* 300: 125246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125246>
73. HAPIH (2023) Hrvatska agencija za hranu poljoprivredu i selo. Available at: <https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2021/07/2.1.-Popis-sorti-vocnih-vrsta.pdf> [Pristupljeno 14.03.2023.]
74. Haukioja E., Ossipov V., Koricheva J., Honkanen, T., Larsson S., Lempa K. (1998). Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization?. *Chemoecology* 8: 133-139. doi: <https://doi.org/10.1007/s000490050018>
75. Hawkesford M., Horst W., Kichey T., Lambers H., Schjoerring J., Møller, I.S., White, P. (2012). Marschner's mineral nutrition of higher plants. Functions of macronutrients. Academic Press, London, United Kingdom, str. 135-189.
76. Hegazi E.S., El-Motaium R.A., Yehia T.A., Hashim M.E. (2018). Effect of foliar boron application on boron, chlorophyll, phenol, sugars and hormones concentration of olive



- (*Olea europaea* L.) buds, leaves, and fruits. Journal of Plant Nutrition 41: 749-765. doi: <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425438>
77. Heimler D., Romani A., Ieri F. (2017). Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: a review. European Food Research and Technology 243: 1107-1115. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2826-6>
78. Inderbitzin P., Bostock R.M., Davis R.M., Usami T., Platt H.W., Subbarao K.V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. PloS One 6: 28341. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
79. Inderbitzin P., Davis R.M., Bostock R.M., Subbarao K.V. (2013). Identification and differentiation of *Verticillium* species and *V. longisporum* lineages by simplex and multiplex PCR assays. PloS One 8: 65990. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065990>
80. Ivić D., Ivanović A. (2012). Najznačajnije bolesti masline u svijetu. Glasilo Biljne Zaštite 12: 348-354. Available at: <https://hrcak.srce.hr/168837> [Pristupljeno: 20.01.2023.]
81. Japón-Luján R., Luque de Castro M.D. (2007). Small Branches of Olive Tree: A Source of Biophenols Complementary to Olive Leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 4584-4588. doi: <https://doi.org/10.1021/jf070215t>
82. Jiménez-Díaz R.M., Cirulli M., Bubici G., Mar Jimenez-Gasco M., Antoniou P.P. (2012). *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. Plant Disease 96: 304-329. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0496>
83. Jiménez-Ruiz J., Leyva-Pérez M.D.L.O., Gómez-Lama Cabanás C., Barroso J.B., Luque F., Mercado-Blanco J. (2019). The transcriptome of *Verticillium dahliae* responds differentially depending on the disease susceptibility level of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar. Genes 10: 251. doi: <https://doi.org/10.3390/genes10040251>
84. Kaliterna J., Milicevic T., Bencic D., Mesic A. (2016). First report of *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* on Olive trees in Croatia. Plant Disease 100: 2526-2526. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0481-PDN>
85. Karioti A., Chatzopoulou A., Bilia A.R., Liakopoulos G., Stavrianakou S., Skaltsa H. (2006). Novel secoiridoid glucosides in *Olea europaea* leaves suffering from boron deficiency. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 70: 1898-1903. doi: <https://doi.org/10.1271/bbb.60059>
86. Keski-Saari S., Julkunen-Tiitto R. (2003). Resource allocation in different parts of juvenile mountain birch plants: effect of nitrogen supply on seedling phenolics and growth. Physiologia Plantarum 118: 114-126. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00077.x>

87. Keykhasaber M., Thomma B.P., Hiemstra J.A. (2018). Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* in woody plants with emphasis on olive and shade trees. *European journal of plant pathology* 150: 21-37. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1273-y>
88. Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E., Subbarao K.V. (2009). Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species. *Annual Review of Phytopathology* 47: 39-62. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081748>
89. Koudounas K., Thomopoulou M., Rigakou A., Angeli E., Melliou E., Magiatis P., Hatzopoulos P. (2021). Silencing of oleuropein  $\beta$ -glucosidase abolishes the biosynthetic capacity of secoiridoids in olives. *Frontiers in Plant Science* 12: 671487. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.671487>
90. Kováčik J., Klejdus B. (2014). Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. *Food chemistry* 142: 334-341. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.074>
91. Kováčik J., Klejdus B., Bačkor M., Repčák M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science* 172: 393-399. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.10.001>
92. Kowalska B. (2021). Management of the soil-borne fungal pathogen – *Verticillium dahliae* Kleb. Causing vascular wilt diseases. *Journal of Plant Pathology* 103: 1185-1194. doi: <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00937-8>
93. Kuć J. (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 33: 275-297. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.001423>
94. Kumar S., Abedin M.M., Singh A.K., Das S. (2020). Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. U: *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* (ur. Lone R., Shuab R., Kamili A.), Springer, Singapore, str. 517-532.
95. Landa B.B., Pérez A.G., Luaces P., Montes-Borrego M., Navas-Cortés J.A., Sanz C. (2019). Insights into the effect of *Verticillium dahliae* defoliating-pathotype infection on the content of phenolic and volatile compounds related to the sensory properties of virgin olive oil. *Frontiers in Plant Science* 10: 232. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00232>
96. Landi M., Margaritopoulou T., Papadakis I.E., Araniti F. (2019). Boron toxicity in higher plants: An update. *Planta* 250: 1011-1032. doi: [10.1007/s00425-019-03220-4](https://doi.org/10.1007/s00425-019-03220-4)
97. Larbat R., Paris C., Le Bot J., Adamowicz S. (2014). Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science* 224: 62-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.010>

98. Levin A.G., Lavee S., Tsrur L. (2003). Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology* 52: 212-218. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00809.x>
99. Lewis D.H. (1980a). Are there inter-relations between the metabolic role of boron, synthesis of phenolic phytoalexins and the germination of pollen? *New Phytologist* 84: 261-270. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04426.x>
100. Lewis D.H. (1980b). Boron, lignification and the origin of vascular plants-a unified hypothesis. *New Phytologist* 84: 209-229. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04423.x>
101. Leyva-Pérez M.D.L.O., Jiménez-Ruiz J., Gómez-Lama Cabanás C., Valverde-Corredor A., Barroso J.B., Luque F., Mercado-Blanco J. (2018). Tolerance of olive (*Olea europaea*) cv Frantoio to *Verticillium dahliae* relies on both basal and pathogen-induced differential transcriptomic responses. *New Phytologist* 217: 671-686. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.14833>
102. Liakopoulos G., Karabourniotis G. (2005). Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: A combined growth chamber and field study. *Tree Physiology* 25: 307-315. doi: <https://doi.org/10.1093/treephys/25.3.307>
103. Liakopoulos G., Stavrianakou S., Filippou M., Fasseas C., Tsadilas C., Drossopoulos I., Karabourniotis G. (2005). Boron remobilization at low boron supply in olive (*Olea europaea*) in relation to leaf and phloem mannitol concentrations. *Tree Physiology* 25: 157-165. doi: <https://doi.org/10.1093/treephys/25.2.157>
104. Liu Q., Li Y., Wu H., Zhang B., Liu C., Gao Y., Guo H., Zhao J. (2023). Hyphopodium-Specific Signaling Is Required for Plant Infection by *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi* 9: 484. doi: <https://doi.org/10.3390/jof9040484>
105. López-Escudero F.J., Mercado-Blanco J. (2011). *Verticillium* wilt of olive: A case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil* 344: 1-50. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0629-2>
106. López-Moral, A. (2022). Control de la Verticilosis del Olivo mediante nutrientes, bioestimulantes e inductores de resistencia. Tesis Doctorales, Universidad de Córdoba, Cordoba, Spain.
107. López-Moral A., Agustí-Brisach C., Leiva-Egea F.M., Trapero A. (2022a). Influence of Cultivar and Biocontrol Treatments on the Effect of Olive Stem Extracts on the Viability of *Verticillium dahliae* Conidia. *Plants* 11: 554. doi: <https://doi.org/10.3390/plants11040554>
108. López-Moral A., Agustí-Brisach C., Ruiz-Blancas C., Antón-Domínguez B.I., Alcántara E., Trapero A. (2022b). Elucidating the Effect of Nutritional Imbalances of N

- and K on the Infection of *Verticillium dahliae* in Olive. Journal of Fungi 8: 139. doi: <https://doi.org/10.3390/jof8020139>
109. López-Moral A., Llorens E., Scalschi L., García-Agustín P., Trapero A., Agustí-Brisach C. (2022c). Resistance Induction in Olive Tree (*Olea europaea*) Against Verticillium Wilt by Two Beneficial Microorganisms and a Copper Phosphite Fertilizer. Frontiers in Plant Science 13: 831794. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.831794>
110. Lukić I., Krapac M., Horvat I., Godena S., Kosić U., Brkić Bubola K. (2018). Three-factor approach for balancing the concentrations of phenols and volatiles in virgin olive oil from a late-ripening olive cultivar. Lwt 87: 194-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.082>
111. Lukić I., Pasković I., Žurga P., Majetić Germek V., Brkljača M., Marcelić Š., Ban D., Grozić K., Lukić M., Užila Z., Goreta Ban S. (2020). Determination of the variability of biophenols and mineral nutrients in olive leaves with respect to cultivar, collection period and geographical location for their targeted and well-timed exploitation. Plants 9: 1667. doi: <https://doi.org/10.3390/plants9121667>
112. Makino A., Osmond B. (1991). Effects of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplasts and mitochondria in pea and wheat. Plant Physiology 96: 355-362. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.96.2.355>
113. Marcelić Š., Vidović N., Pasković I., Lukić M., Špika M.J., Palčić I., Lukić I., Petek M., Pecina M., Herak Ćustić M., Ban D., Grozić K., Polić Pasković M., Cukrov M., Pongrac P., Goreta Ban S. (2022). Combined Sulfur and Nitrogen Foliar Application Increases Extra Virgin Olive Oil Quantity without Affecting Its Nutritional Quality. Horticulturae 8: 203. doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030203>
114. Markakis E.A., Tjamos S.E., Antoniou P.P., Roussos P.A., Paplomatas E.J., Tjamos E.C. (2010). Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. Plant Disease 94: 1156-1162. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1156>
115. Martelli G.P. (1999). Infectious diseases and certification of olive: An overview. EPPO Bulletin 29: 127-133. Acta Hort. 586, 701-708. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1999.tb00806.x>
116. Matthes M.S., Robil J.M., McSteen P. (2020). From element to development: the power of the essential micronutrient boron to shape morphological processes in plants. Journal of experimental botany 71: 1681-1693. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa042>
117. Martínez-Navarro M.E., Kaparakou E.H., Kanakis C.D., Cebrián-Tarancón C., Alonso G.L., Salinas M.R., Tarantilis P.A. (2023). Quantitative Determination of the Main Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Toxicity of Aqueous Extracts of Olive

- Leaves of Greek and Spanish Genotypes. *Horticulturae* 9: 55. doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010055>
118. Mauch-Mani B., Baccelli I., Luna E., Flors V. (2017). Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology* 68: 485-512. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
119. Maupetit A., Larbat R., Pernaci M., Andrieux A., Guinet C., Boutigny A.L., Halkett F. (2018). Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science* 9: 1396. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01396>
120. Mechri B., Tekaya M., Cheheb H., Attia, F., Hammami M. (2015). Accumulation of flavonoids and phenolic compounds in olive tree roots in response to mycorrhizal colonization: A possible mechanism for regulation of defense molecules. *Journal of Plant Physiology* 185: 40-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.015>
121. Mechri B., Tekaya M., Hammami M., Chehab H. (2019). Root verbascoside and oleuropein are potential indicators of drought resistance in olive trees (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 141: 407-414. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.024>
122. Mechri B., Tekaya M., Hammami M., Chehab H. (2020). Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*). *Biochemical Systematics and Ecology* 92: 104112. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104112>
123. Mei L., Sheng O.U., Peng S.A., Zhou G.F., Wei Q.J., Li Q.H. (2011). Growth, root morphology and boron uptake by citrus rootstock seedlings differing in boron-deficiency responses. *Scientia Horticulturae* 129: 426-432. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.012>
124. Mercado-Blanco J., López-Escudero F.J. (2012). Verticillium wilt of olive and its control: The heat is on. *Plant and Soil* 355: 17-21. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1091-5>
125. Molina-Soria C., Fernández-Escobar R. (2008). A proposal of new critical leaf nitrogen concentrations in olive. *Acta Hort.* 949: 283-286. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.949.41>
126. Molina-Soria C., Fernández-Escobar R. (2012). A proposal of new critical leaf nitrogen concentrations in olive. *Acta Horticulturae* 949: 283-286. doi: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.949.4>
127. Montes-Osuna N., Mercado-Blanco J. (2020). Verticillium wilt of olive and its control: What did we learn during the last decade? *Plants* 9: 735. doi: <https://doi.org/10.3390/plants9060735>

128. Mur L.A., Simpson C., Kumari A., Gupta A.K., Gupta K.J. (2017). Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of Botany* 119: 703-709. doi: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw179>
129. Muratore C., Espen L., Prinsi B. (2021). Nitrogen uptake in plants: the plasma membrane root transport systems from a physiological and proteomic perspective. *Plants* 10: 681. doi: <https://doi.org/10.3390/plants10040681>
130. Nicholson R.L., Hammerschmidt R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002101>
131. Nicolì F., Negro C., Vergine M., Aprile A., Nutricati E., Sabella E., Bellis L. (2019). Evaluation of phytochemical and antioxidant properties of 15 Italian *Olea europaea* L. cultivar leaves. *Molecules* 24: 1998. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24101998>
132. Novo M., Silvar C., Merino F., Martínez-Cortés, T., Lu F., Ralph J., Pomar F. (2017). Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annuum* L. to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Science* 258: 12-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.01.014>
133. Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Stitt M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular plant* 3: 973-996. doi: <https://doi.org/10.1093/mp/ssq04>
134. Obied H.K., Prenzler P.D., Ryan D., Servili M., Taticchi A., Esposito S., Robards K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports* 25: 1167-1179. doi: <https://doi.org/10.1039/b719736e>
135. Omondi J.O., Lazarovitch N., Rachmilevitch S., Yermiyahu U., Sperling O. (2019). High nitrogen availability limits photosynthesis and compromises carbohydrate allocation to storage in roots of *Manihot esculenta* Crantz. *Frontiers in Plant Science* 10: 1041. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01041>
136. Ortega-García F., Peragón J. (2010). HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 2295-2300. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4085>
137. Osharov N., May G.S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS microbiology letters* 199: 153-160. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x>
138. Othman Y.A., Leskovar D. (2019). Nitrogen management influenced root length intensity of young olive trees. *Scientia Horticulturae* 246: 726-733. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.052>

139. Pasković I., Lukić I., Žurga P., Majetić Germek V., Brkljača M., Koprivnjak O., Major N., Grozić K., Franić M., Ban D., Marcelić Š., Goreta Ban S. (2020). Temporal Variation of Phenolic and Mineral Composition in Olive Leaves Is Cultivar Dependent. *Plants*, 9: 1099. doi: <https://doi.org/10.3390/plants9091099>
140. Pasković I., Soldo B., Talhaoui N., Palčić I., Brkljača M., Koprivnjak O., Majetić Germek V., Ban D., Klanjac J., Franić M., Žurga P., Grozić K., Lukić I., Goreta Ban S. (2019). Boron foliar application enhances oleuropein level and modulates volatile compound composition in olive leaves. *Scientia Horticulturae* 257: 108688. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108688>
141. Pegg G.F., Brady B.L. (2002). *Verticillium wilts*. CABI Publishing, USA.
142. Pereira G.L., Siqueira J.A., Batista-Silva W., Cardoso F.B., Nunes-Nesi A., Araújo W.L. (2021). Boron: More Than an Essential Element for Land Plants? *Frontiers in Plant Science* 11: 2234. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610307>
143. Pérez-Rodríguez M., Alcántara E., Amaro M., Serrano N., Lorite I.J., Arquero O., López-Escudero F.J. (2015). The influence of irrigation frequency on the onset and development of *Verticillium* wilt of olive. *Plant Disease* 99: 488-495. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0599-RE>
144. Pérez-Rodríguez M., Santos-Rufo A., López-Escudero F.J. (2022). High Input of Nitrogen Fertilization and Short Irrigation Frequencies Forcefully Promote the Development of *Verticillium* Wilt of Olive. *Plants* 11: 3551. doi: <https://doi.org/10.3390/plants11243551>
145. Perica S., Androulakis I.I., Loupassaki M.H. (1993). Effect of summer application of nitrogen and potassium on mineral composition of olive leaves. *Acta Hort.* 356: 221-224. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1994.356.48>
146. Perica S., Bellaloui N., Greve C., Hu H., Brown P.H. (2001b). Boron transport and soluble carbohydrate concentrations in Olive. *Journal of the American Society of Horticulture Science* 126: 291-296. doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.126.3.291>
147. Perica S., Brown P.H., Connell J.H., Nyomora A.M., Dordas C., Hu H., Stangoulis J. (2001a). Foliar boron application improves flower fertility and fruit set of olive. *HortScience* 36: 714-716. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.4.714>
148. Perica S., Goreta S., Vuletin Selak G. (2008). Growth, biomass allocation and leaf ion concentration of seven olive (*Olea europaea* L.) cultivars under increased salinity. *Scientia Horticulturae* 117: 123-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.03.020>
149. Perry J.W., Evert R.F. (1983). The effect of colonization by *Verticillium dahliae* on the root tips of Russet Burbank potatoes. *Can. J. Bot.* 61: 3422-3429. doi: <https://doi.org/10.1139/b83-385>

150. Pevalek-Kozlina B. (2003). Fiziologija bilja. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Proifl-Klett, Zagreb, Hrvatska.
151. Pichersky E., Gang D.R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science* 5: 439-445. doi: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01741-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01741-6)
152. Poljuha D., Sladonja B., Brkić Bubola K., Radulović M., Brščić K., Šetić E., Krapac M., Milotić A. (2008a). A multidisciplinary approach to the characterisation of autochthonous Istrian olive (*Olea europaea* L.) varieties. *Food Technology and Biotechnology* 46: 347-354. Available at: <https://hrcak.srce.hr/clanak/48111> [Pristupljeno: 24.11.2022.]
153. Poljuha D., Sladonja B., Šetić E., Milotić A., Bandelj D., Jakše J., Javornik B. (2008b). DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers. *Scientia horticulturae* 115: 223-230. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.08.018>
154. Pongrac P., Kelemen M., Vogel-Mikuš K., Vavpetič P., Pelicon P., Žurga P., Vidović N., Polić Pasković M., Goreta Ban S., Lukić I., Pasković I. (2023). Tissue-specific calcium and magnesium allocation to explain differences in bulk concentration in leaves of one-year-old seedlings of two olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 194: 619-626. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.11.040>
155. Pouzoulet J., Pivovarov A.L., Santiago L.S., Rolshausen P.E. (2014). Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science* 5: 253. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00253>
156. Poza-Viejo L., Abreu I., González-García M.P., Allauca P., Bonilla I., Bolaños L., Reguera M. (2018). Boron deficiency inhibits root growth by controlling meristem activity under cytokinin regulation. *Plant Science* 270: 176-189. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.005>
157. Prieto P., Navarro-Raya C., Valverde-Corredor A., Amyotte S.G., Dobinson K.F., Mercado-Blanco J. (2009). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb. Biotechnol* 2: 499-511. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00105.x>
158. Pullman G.S., DeVay J. E., Garber R.H., Weinhold A.R. (1981). Soil solarization: Effects on *Verticillium* wilt of cotton and soilborne populations of *Verticillium dahliae*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, and *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 71: 954-959. doi: <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-954>
159. Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition* 50: 586-621. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>



- 
160. Ramírez-Tejero J.A., Jiménez-Ruiz J., Leyva-Pérez M.D.L.O., Barroso J.B., Luque F. (2020). Gene expression pattern in olive tree organs (*Olea europaea* L.). *Genes* 11: 544. doi: <https://doi.org/10.3390/genes11050544>
161. Ramírez-Tejero J.A., Jiménez-Ruiz J., Serrano A., Belaj A., León L., Rosa R., Luque F. (2021). Verticillium wilt resistant and susceptible olive cultivars express a very different basal set of genes in roots. *BMC Genomics* 22: 1-16. doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07545-x>
162. Regni L., Proietti P. (2019). Effects of nitrogen foliar fertilization on the vegetative and productive performance of the olive tree and on oil quality. *Agriculture* 9: 252. doi: <https://doi.org/10.3390/agriculture9120252>
163. Richard-Molard C., Krapp A., Brun F., Ney B., Daniel-Vedele F., Chaillou S. (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *Journal of experimental botany* 59: 779-791. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm363>
164. Robert C., Bancal M.O., Lannou C. (2002). Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. *Phytopathology* 92: 762-768. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.7.762>
165. Rodríguez E., García-Garrido J.M., García P.A., Campos M. (2011). Implications of plant material origin, land use history and soil properties in the incidence of Verticillium wilt in olive groves. *Journal of Plant Pathology* 93: 111-118.
166. Rolshausen P.E., Gubler W.D. (2005). Use of boron for the control of Eutypa dieback of grapevines. *Plant Disease*, 89: 734-738. doi: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0734>
167. Romanyà J., Sancho-Adamson M., Ortega D., Trillas M.I. (2019). Early stage effects of Verticillium wilt of olive (WVO) on nutrient use in young olive trees grown in soils amended with compost and mineral fertilisation. *Plant and Soil* 436: 193-209. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03923-9>
168. Rostami H., Tabatabaei S.J., Zare Nahandi F. (2017). Effects of different boron concentration on the growth and physiological characteristics of two olive cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 40: 2421-2431. doi: <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1346680>
169. Ruggieri G. (1946). Una nuova malattia dell'olivo. *L'Italia Agric* 83: 369-372.
170. Ruiz J.M., Bretones G., Baghour M., Ragala L., Belakbir A., Romero L. (1998). Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves. *Phytochemistry* 48: 269-272. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01132-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01132-1)
171. Ruiz J.M., Romero L. (2001). Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants. *Studies in Natural Products Chemistry* 25: 651-681. doi: [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(01\)80020-X](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(01)80020-X)

172. Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* 92: 147-176. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00287-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00287-4)
173. Scheible W., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Palacios-Rojas N., Schindelasch D. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology* 136: 2483-2499. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.104.047019>
174. Schilirò E., Ferrara M., Nigro F., Mercado-Blanco J. (2012). Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PLoS One* 7: 48646. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048646>
175. Shkolnik M.Y.A. (1984). Boron. U: Trace Elements in Plants (ur. Shkolnik M.Y.A). Elsevier Ltd., Amsterdam, Netherlands, str. 68-109.
176. Silva G.H., de Souza J.A.R., Macedo W.R., Pinto F.G. (2021). Tyrosol, a phenolic compound from *Phomopsis* sp., is a potential biostimulant in soybean seed treatment. *Phytochemistry Letters* 43: 40-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.03.005>
177. Silva E., Gonçalves A., Martins S., Pinto L., Rocha L., Ferreira H., Moutinho-Pereira J., Rodrigues M.A., Correia C.M. (2023). Moderate Nitrogen Rates Applied to a Rainfed Olive Grove Seem to Provide an Interesting Balance between Variables Associated with Olive and Oil Quality. *Horticulturae* 9: 110. doi: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010110>
178. Singh D.P. (2015). Plant nutrition in the management of plant diseases with particular reference to wheat. *Recent advances in the diagnosis and management of plant diseases*, 273-284. doi: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2571-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2571-3_20)
179. Solomon P.S., Tan K.C., Oliver R.P. (2003). The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Molecular Plant Pathology* 4: 203-210. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00161.x>
180. Song X., Razavi B.S., Ludwig B., Zamanian K., Zang H., Kuzyakov Y., Dippold M.A., Gunina A. (2020). Combined biochar and nitrogen application stimulates enzyme activity and root plasticity. *Science of the Total Environment* 735: 139393. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139393>
181. Soufi O., Romero C., Louaileche H. (2014). *Ortho*-diphenol profile and antioxidant activity of Algerian black olive cultivars: Effect of dry salting process. *Food chemistry*, 157: 504-510. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.075>
182. Souza F.B.M.D., Coelho V.A.T., Pio R., Rodas C.L., Silva I.P.D., Melo E.T.D., Farias D.D. H. (2019). Visual symptoms and nutritional deficiencies in olive plants subjected to

- nutrient deprivation. *Acta Scientiarum. Agronomy* 41: 1807-8621. doi: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v41i1.39582>
183. Strikić F., Gugić J., Klepo T. (2012). Stanje hrvatskog maslinarstva. *Glasilo biljne zaštite* 12: 271-276. Available at: <https://hrcak.srce.hr/168826> [Pristupljeno: 10.11.2022.]
184. Strikić F., Klepo T., Rošin J., Radunić M. (2010). Udomaćene sorte masline u Republici Hrvatskoj. Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split, Hrvatska.
185. Sun Y., Wang M., Mur L.A.J., Shen Q., Guo S. (2020). Unravelling the roles of nitrogen nutrition in plant disease defences. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 572. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21020572>
186. Takano J., Miwa K., Fujiwara T. (2008). Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* 13: 451-457. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.05.007>
187. Talhaoui N., Taamalli A., Gómez-Caravaca A.M., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International* 77: 92-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.011>
188. Tavernier V., Cadiou S., Pageau K., Laugé R., Reisdorf-Cren M., Langin T., Masclaux-Daubresse C. (2007). The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in Phaseolus leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of Experimental Botany* 58: 3351-3360. doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm182>
189. Tegeder M., Masclaux-Daubresse C. (2018). Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New phytologist* 217: 35-53. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.14876>
190. Tekaya M., El-Gharbi S., Mechri B., Chehab H., Bchir A., Chraief I., Ayachi M., Boujnah D., Attia F., Hammami M. (2016). Improving performance of olive trees by the enhancement of key physiological parameters of olive leaves in response to foliar fertilization. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 1-12. doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2122-x>
191. Tenuta M., Lazarovits G. (2002). Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92: 255-264. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.3.255>
192. Termorshuizen A.J., Goud J.K.C., Gams W. (2003). Morphology of *Verticillium dahliae* and *V. tricorpus* on semi-selective media used for the detection of *V. dahliae* in soil. *Mycological Research* 107: 822-830. doi: <https://doi.org/10.1017/s0953756203008050>
193. Therios I. (2009) Olives. CAB, London, United Kingdom.

194. Therios I.N., Sakellariadis S.D. (1988). Effects of nitrogen form on growth and mineral composition of olive plants (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 35: 167-177. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90110-0](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90110-0)
195. Tian G., Bi Y., Sun Z., Zhang L. (2015). Phenolic acids in the plow layer soil of strawberry fields and their effects on the occurrence of strawberry anthracnose. *European Journal of Plant Pathology* 143: 581-594. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0711-y>
196. Tjamos E.C., Botseas D. (1987). Occurrence of *Verticillium dahliae* in leaves of Verticillium-wilted olive trees. *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 86. doi: <https://doi.org/10.1080/07060668709501916>
197. Toledano A., Serrano L., Balu A.M., Luque R., Pineda A., Labidi J. (2013). Fractionation of organosolv lignin from olive tree clippings and its valorization to simple phenolic compounds. *ChemSusChem* 6: 529-536. doi: <https://doi.org/10.1002/cssc.201200755>
198. Trapero C., Alcántara E., Jiménez J., Amaro-Ventura M.C., Romero J., Koopmann B., Karlovsky P., Tiedemann A., Pérez-Rodríguez M., López-Escudero F.J. (2018). Starch hydrolysis and vessel occlusion related to wilt symptoms in olive stems of susceptible cultivars infected by *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science* 9: 72. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00072>
199. Trapero C., Roca L.F., Alcántara E., López-Escudero F.J. (2011). Colonization of olive inflorescences by *Verticillium dahliae* and its significance for pathogen spread. *Journal of Phytopathology* 159: 638-640. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01809.x>
200. Tripathi D., Singh M., Pandey-Rai S. (2022). Crosstalk of nanoparticles and phytohormones regulate plant growth and metabolism under abiotic and biotic stress. *Plant Stress*: 100107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100107>
201. Tsadilas C.D. (2004). Diagnosis, Prediction and Control of Boron Deficiency in Olive Trees. U: Production Practices and Quality Assessment of Food Crops (ur. Dris R.U., Jain S.M.), Springer, The Netherlands, str. 129-132.
202. Tsimidou M.Z., Papoti V.T. (2010). Bioactive ingredients in olive leaves. U: Olives and olive oil in health and disease prevention (ur. Preedy V. R., Watson R. R.), Elsevier Ltd., Academic Press, London, United Kingdom, str. 349-356.
203. Vallad G.E., Subbarao K.V. (2008). Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 98: 871-885. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-8-0871>

204. Valverde Caballero P., Barranco Navero D., López Escudero F.J., Muñoz Diez C., Trapero Ramírez C. (2023). Efficiency of breeding olives for resistance to *Verticillium* wilt. *Frontiers in Plant Science* 14: 566. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1149570>
205. Varo A., Mulero-Aparicio A., Adem M., Roca L.F., Raya-Ortega M.C., López-Escudero F.J., Trapero A. (2017). Screening water extracts and essential oils from Mediterranean plants against *Verticillium dahliae* in olive. *Crop Protection* 92: 168-175. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.018>
206. Varo A., Raya-Ortega M. C., Trapero A. (2016). Enhanced production of microsclerotia in recalcitrant *Verticillium dahliae* isolates and its use for inoculation of olive plants. *Journal of Applied Microbiology* 121: 473-484. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.13167>
207. Verardo V., Riciputi, Y., Sorrenti G., Ornaghi P., Marangoni B., Caboni M.F. (2013). Effect of nitrogen fertilisation rates on the content of fatty acids, sterols, tocopherols and phenolic compounds, and on the oxidative stability of walnuts. *LWT-Food Science and Technology* 50: 732-738. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.018>
208. Vidović N., Pasković I., Lukić I., Žurga P., Majetić Germek V., Grozić K., Goreta Ban S. (2021). Biophenolic Profile Modulations in Olive Tissues as Affected by Manganese Nutrition. *Plants* 10: 1724. doi: <https://doi.org/10.3390/plants10081724>
209. Vogt T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant* 3: 2-20. doi: <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
210. Volk J., Sarafeddinov A., Unver T., Marx S., Tretzel J., Zotzel J., Warzecha H. (2019). Two novel methylesterases from *Olea europaea* contribute to the catabolism of oleoside-type secoiridoid esters. *Planta* 250: 2083-2097. doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03286-0>
211. Ward J.L., Forcat S., Beckmann M., Bennett M., Miller S.J., Baker J.M., Grant M. (2010). The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *The Plant Journal* 63: 443-457. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04254.x>
212. Whetten R., Sederoff R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1001. doi: <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1001>
213. Wilhelm S. (1955). Longevity of *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45: 180-188.
214. Wimmer M.A., Abreu I., Bell R.W., Bienert M.D., Brown P.H., Dell B., Fujiwara T., Goldbach H.E., Lehto T., Mock H.P., Wirén N., Bassil E., Bienert G.P. (2019). Boron: an essential element for vascular plants. *New Phytologist* 226: 1232-1237. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.16127>

215. Yadeta K.A., Thomma B.P.H.J. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in plant science* 4: 97. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>
216. Yang J., Li B., Shi W., Gong Z., Chen L., Hou Z. (2018). Transcriptional activation of anthocyanin biosynthesis in developing fruit of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by preharvest and postharvest UV irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 10931-10942. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03081>
217. Yoshinari A., Takano J. (2017). Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 1951. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01951>
218. Yu J.M., Cafarov I.H., Babadoost M. (2016). Morphology, molecular identity, and pathogenicity of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* associated with internally discolored horseradish roots. *Plant Disease* 100: 749-757. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0846-RE>
219. Zha L., Yang, C., Fang G., Zhi M., Chen B., Zhou Z., Meng Y. (2022). Crop residue return reduces cotton *Verticillium* wilt by altering potassium nutrition and root exudates. *Applied Soil Ecology* 177: 104545. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104545>
220. Zhang Y., Zhao L., Feng Z., Guo H., Feng H., Yuan Y., Wei F., Zhu H. (2021). The role of a new compound micronutrient multifunctional fertilizer against *Verticillium dahliae* on cotton. *Pathogens* 10: 81. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10010081>
221. Zhang Y.L., Li Z.F., Feng Z.L., Feng H.J., Zhao L.H. (2015). Isolation and functional analysis of the pathogenicity-related gene VdPR3 from *Verticillium dahliae* on cotton. *Curr. Genet.* 61: 555-566. doi: <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0476-z>
222. Zhou L., Hu Q., Johansson A., Dixelius C. (2006). *Verticillium longisporum* and *V. dahliae*: Infection and disease in *Brassica napus*. *Plant Pathology* 55: 137-144. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01311.x>
223. Zipori I., Erel R., Yermiyahu U., Ben-Gal A., Dag A. (2020). Sustainable management of olive orchard nutrition: A review. *Agriculture* 10: 11. doi: <https://doi.org/10.3390/agriculture10010011>
224. Zouari I., Mechri B., Attia F., Cheraief I., Mguidiche A., Laabidi F., Hammami M., Martins M., Ribeiro H., Aïachi-Mezghani M. (2020). Mineral and carbohydrates changes in leaves and roots of olive trees receiving biostimulants and foliar fertilizers. *South African Journal of Botany* 135: 18-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.032>

## ŽIVOTOPIS AUTORA

Kristina Grozić rođena je 25. veljače 1989. godine. Preddiplomski studij upisuje 2007. godine na Veleučilištu u Rijeci, Poljoprivrednom odjelu u Poreču, Stručnom studiju Vinarstva. Studij završava 2011. godine obranom završnog rada naslova „Kriomaceracija Terana i ekstrakcija polifenola“ pod mentorstvom prof.v.š.dr.sc. Marija Stavera. Diplomski studij Fitomedicina na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu upisuje 2011. godine. U okviru stručnog rada provodi istraživanje na temu grozdovog moljca pod mentorstvom prof.dr.sc. Renate Bažok. U sklopu LLP ERASMUS programa boravi u Padovi (Italija) gdje pohađa redoviti studij Scienze e Tecnologie Agrarie na Università degli studi di Padova. Izvrsnost u studiju donosi joj godišnju nagradu Hrvatskog društva biljne zaštite za najboljeg studenta, a kasnije i nagradu Akademik „Milan Maceljski“. Studij dovršava 2014. godine obranom diplomskog rada naslova “Zaraženost sorte Muškat momjanski (*Vitis vinifera* L.) virusima” pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Darka Vončine.

Na Institutu za poljoprivredu i turizam provodi stručno stažiranje pod mentorstvom dr.sc. Marijana Buble. Nedugo nakon toga pridružuje se projektu Winetwork (Horizon 2020), gdje sudjeluje na mnogobrojnim edukacijama i simpozijima čija su tema bile bolesti drva i zlatna žutica vinove loze. Znanstvene edukacije ostvaruje u sklopu projekta „Sustainable control of grapevine trunk diseases“ (COST FA1303) u vidu jednomjesečnog boravka, pod mentorstvom dr.sc. Laure Mugnai, na Università degli studi di Firenze (Italija). U okviru navedenog projekta usavršava se i na Universitat Politècnica de Valencia (Španjolska) pod mentorstvom dr.sc. Josea Armengola, dr.sc. Davida Gramajea i dr.sc. Artura Alvesa.

Na istoj se instituciji kao asistentica/doktorandica zapošljava 2018. godine, gdje sudjeluje na projektima Hrvatske zaklade za znanost „Projekt razvoja karijere mladih istraživača-izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2018-09-1841) i „Bilinogojstvom do sekundarnih biljnih metabolita: primjena mineralnih hraniva i elicitora za povećanje koncentracije fenola u listu masline“ (UIP-2017-05-8464) čiji je voditelj dr.sc. Igor Pasković. Poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu upisuje 2018. godine. Znanstveno se usavršava u Laboratoriju za mikologiju, Centru za zaštitu bilja, te putem tečaja u organizaciji International Olive Council i Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza (Španjolska). U navedenom se periodu dodatno educira sudjelovanjem na više od 100 webinaru različite tematike. Sudjeluje u publikaciji 18 znanstvenih radova, 10 indeksiranih u Web of Science Core Collection (WoS). Trenutni joj H-indeks iznosi 5, ukupna citiranost 98 (WoS). Dobitnica je dviju međunarodnih nagrada za digitalnu ilustraciju u području znanstvene i popularno-edukativne ilustracije.

## Znanstvene publikacije

Marcelić Š., Vidović N., Pasković I., Lukić M., Špika M.J., Palčić I., Lukić I., Petek M., Pecina M., Herak Ćustić M., Ban D., **Grozić K.**, Polić Pasković M., Cukrov M., Pongrac P., Goreta Ban S. (2022). Combined Sulfur and Nitrogen Foliar Application Increases Extra Virgin Olive Oil Quantity without Affecting Its Nutritional Quality. *Horticulturae* 8: 203.

**Grozić K.**, Pasković I., Radić T., Lukić M., Žurga P., Palčić I., Urlić B., Brkljača M., Ban D., Kaliterna J., Klanjac J., Major N., Matotan Z., Goreta Ban S. (2021). Processing tomato response to arbuscular mycorrhizal fungi application under conventional production practice. *Journal of Central European Agriculture* 22: 72-85.

Majetić Germek V., Žurga P., Koprivnjak O., **Grozić K.**, Previšić I., Marcelić Š., Goreta Ban S., Pasković I. (2021). Phenolic composition of Croatian olive leaves and their infusions obtained by hot and cold preparation. *Czech journal of food sciences* 39: 393-401.

Pasković I., Soldo B., Goreta Ban S., Radić T., Lukić M., Urlić B., Mimica M., Brkić Bubola K., Colla G., Roupael Y., Major N., Šimpraga M., Ban D., Palčić I., Franić M., **Grozić K.**, Lukić I. (2021). Fruit quality and volatile compound composition of processing tomato as affected by fertilisation practices and arbuscular mycorrhizal fungi application. *Food Chemistry* 359: 129961.

Vidović N., Pasković I., Lukić I., Žurga P., Majetić Germek V., **Grozić K.**, Cukrov M., Marcelić Š., Ban D., Talhaoui N., Palčić I., Rubinić V., Goreta Ban S. (2021). Biophenolic profile modulations in olive tissues as affected by manganese nutrition. *Plants* 10: 1724.

**Grozić K.**, Pasković I., Žurga P., Majetić Germek V., Lukić I., Brkljača M., Urlić B., Klanjac J., Marcelić Š., Ban D., Kaliterna J., Herak Ćustić M., Goreta Ban S. (2020). Fenolni profil lista masline sorte 'Istarska bjelica' pri različitoj koncentraciji bora u hranivoj otopini. *Glasnik Zaštite Bilja* 43: 56-62.

Lukić I., Pasković I., Žurga P., Majetić Germek V., Brkljača M., Marcelić Š., Ban D., **Grozić K.**, Lukić M., Užila Z., Goreta Ban S. (2020). Determination of the variability of biophenols and mineral nutrients in olive leaves with respect to cultivar, collection period and geographical location for their targeted and well-timed exploitation. *Plants* 9: 1667.

Pasković I., Lukić I., Žurga P., Majetić Germek V., Brkljača M., Koprivnjak O., Major N., **Grozić K.**, Franić M., Ban D., Marcelić Š., Goreta Ban S. (2020). Temporal variation of phenolic and mineral composition in olive leaves is cultivar dependent. *Plants* 9: 1099.

## Kongresna priopćenja

Kaliterna J., Martinko K., Marcelić Š., **Grozić K.**, Vidović N., Polić Pasković M., Toth K., Pasković I. (2023). Inhibitory potential of olive leaf extract on plant pathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb. Book of Abstracts; 58th Croatian & 18th International Symposium on Agriculture; Carović-Stanko K.; Širić I. (ur.).



Pasković I., Žurga P., Majetić Germek V., **Grozić K.**, Marcelić Š., Cukrov M., Vidović N., Polić Pasković M., Kaliterna J., Simonić Kocijan S., Kinkela Devičić M., Ban D., Lukić I., Palčić I., Jukić Špika M., Goreta Ban S. (2022). Maslina kao tvornica fitokemikalija. Zbornik radova, 57. hrvatski i 17. međunarodni simpozij agronoma; Majić I.; Antunović Z. (ur.).

**Grozić K.**, Pasković I., Žurga P., Majetić Germek V., Palčić I., Marcelić Š., Ban D., Kaliterna J., Goreta Ban S. (2021). Utjecaj gnojidbe borom na koncentracije oleuropeina i verbaskozida u listu masline (*Olea europaea* L.). 56. Hrvatski i 16. Međunarodni simpozij agronoma; Rozman V.; Antunović Z. (ur.)

**Grozić K.**, Majetić Germek V., Žurga P., Marcelić Š., Klanjac J., Major N., Kaliterna J., Ban D., Goreta Ban S., Pasković I. (2020). Razlike u ukupnim fenolima i antioksidativnom kapacitetu lista masline ovisno o kultivaru i lokaciji. 55. hrvatski i 15. međunarodni simpozij agronoma; Mioč B.; Širić I. (ur.).

**Grozić K.**, Soldo B., Brkljača M., Urlić B., Palčić I., Majetić Germek V., Žurga P., Kaliterna J., Ban D., Cukrov M., Goreta Ban S., Pasković I. (2020). Utjecaj folijarne primjene cinka na fenolni profil lista masline (*Olea europaea* L.). Zbornik skupa: Održivi razvoj poljoprivrede i turizma u kontekstu klimatskih promjena.

Pasković I., Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Franić M., **Grozić K.**, Ban D., Goreta Ban S., Černe M., Vavpetič P., Kelemen M., Pelikon P. (2020). Kontrastna raspodjela makro i mikroelemenata u lišću masline. 55. hrvatski i 15. međunarodni simpozij agronoma. Mioč B.; Širić I. (ur.).

Žurga P., Majetić Germek V., **Grozić K.**, Marcelić Š., Klanjac J., Ban D., Goreta Ban S., Palčić I., Pasković I. (2020). Utjecaj gnojidbe dušikom na fenolni sastav lista masline. 55. Hrvatski i 15. Međunarodni Simpozij Agronoma; Mioč B.; Širić I. (ur.).