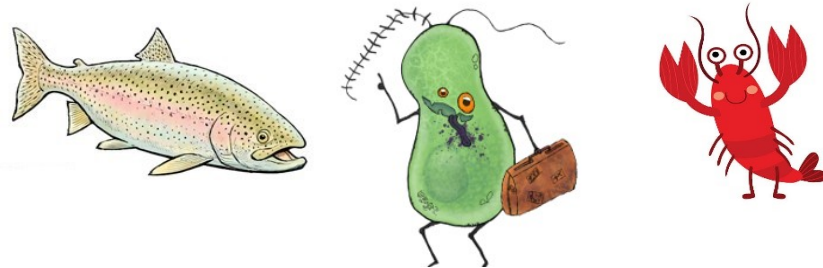


Inhibicijsko djelovanje eteričnog ulja samoniklog mediteranskog bilja na životne stadije oomicetnih patogena značajnih u slatkovodnoj akvakulturi, *Aphanomyces astaci* i *Saprolegnia parasitica*

Anđela Miljanović



UVOD:

Oomycetes

Saprolegnia parasitica

- Oomycota
- saprofiti i paraziti
- biljni i životinjski patogeni
- veliki gubitci u slatkovodnoj akvakulturi
- *Saprolegnia parasitica*
- uzročnik saprolegnioze
- pogađa sve razvojne stadije ribe
- loši uvjeti uzgoja rezultiraju porastom incidencije bolesti



Kalifornijska pastrva zaražena patogenom *S. parasitica* (vlastita fotografija).
Simptom bolesti označen crvenim krugom.

UVOD:

Oomycetes

Aphanomyces astaci

- uzročnik bolesti račije kuge
- unesen u Europu u 19. st. preko sjevernoameričkih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova
- melanizacija



Uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus* (vlastita fotografija).



Melanizacija kutikule uskoškarg raka (vlastita fotografija).



Signalni rak *Pacifastacus leniusculus* (vlastita fotografija).

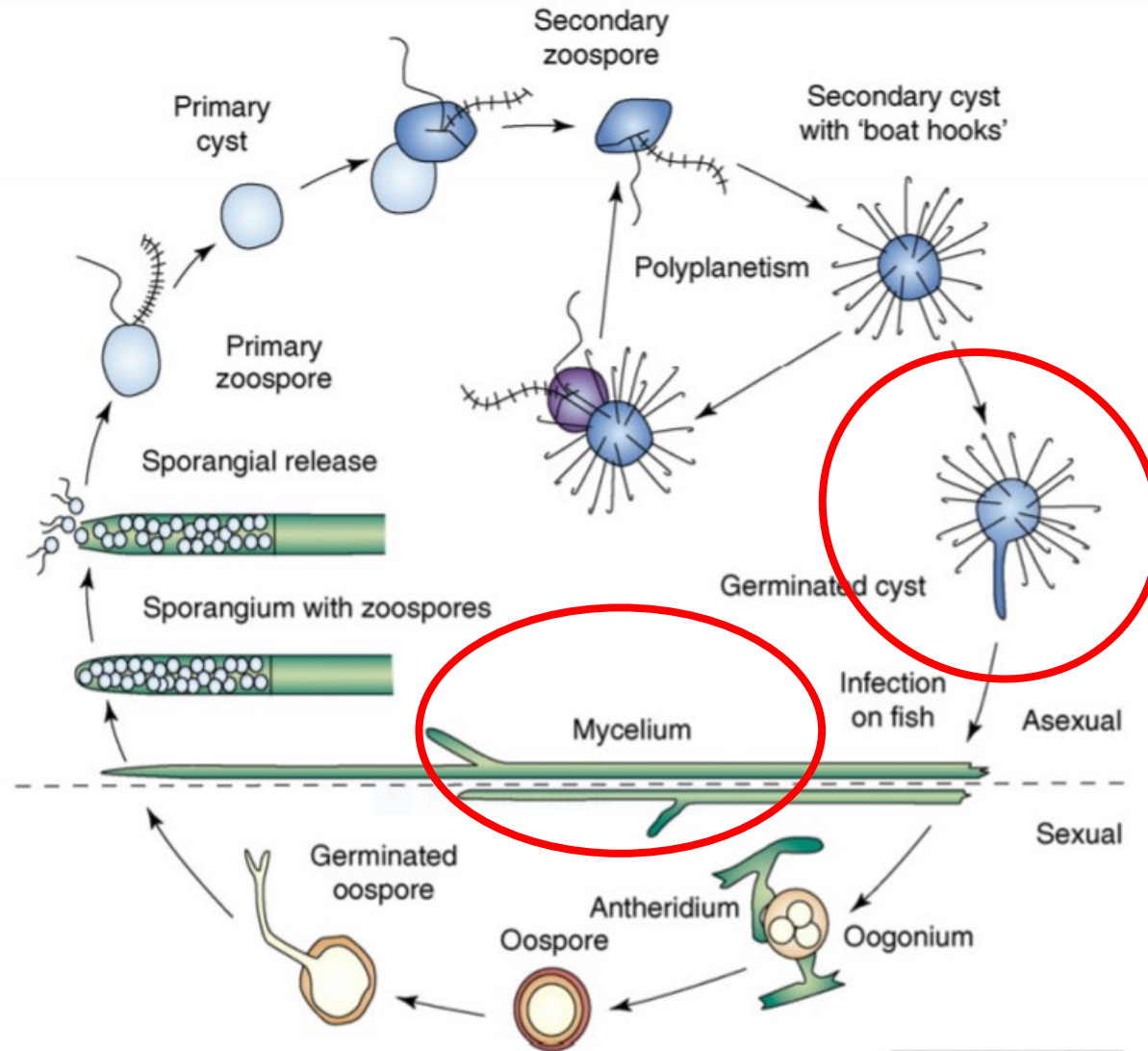
- zabrana malahitnog zelenila
- formaldehid, bronopol, bakar sulfat, peroctena kiselina
- potrebne ekološki prihvatljive metode kontrole
- Cilj: odrediti inhibicijski potencijal eteričnih ulja lovora, kadulje i ružmarina prema rastu micelija i zoosporama patogenih oomiceta



Vs.



- razvojni stadiji životnog ciklusa neseksualne faze važni za razvoj bolesti
- pokretljivost i klijavost zoospora
- rast micelija



Životni ciklus patogena *Saprolegnia parasitica* (preuzeto od Philips et al., 2007 i van West, 2006).



Salvia officinalis (Lamiaceae)



Rosmarinus officinalis (Lamiaceae)



Laurus nobilis (Lauraceae)

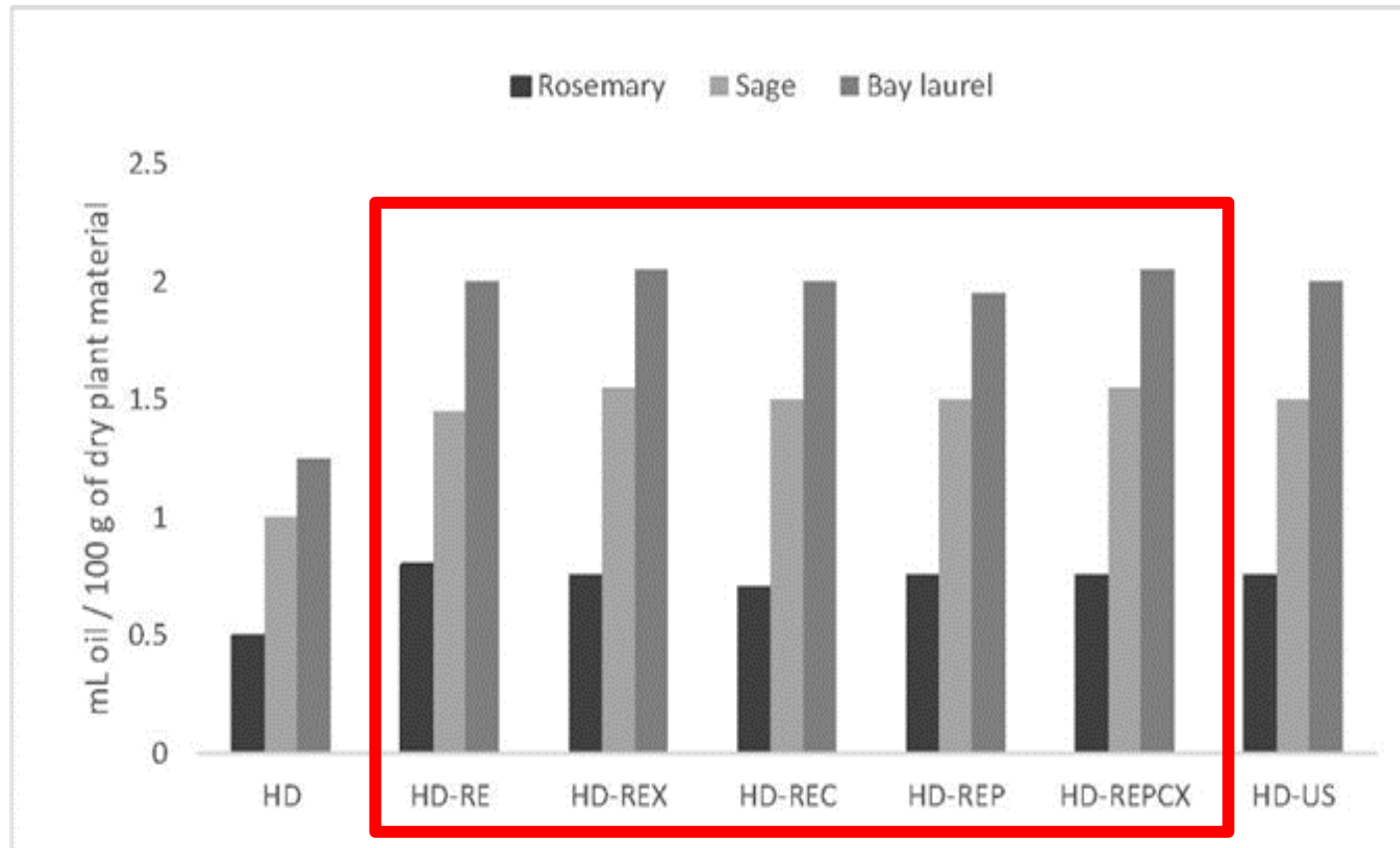
- parna destilacija ili vodena destilacija
- Clevenger aparatura
- nedostatak – mali prinos ulja
- predtretmani hidrodestilaciji



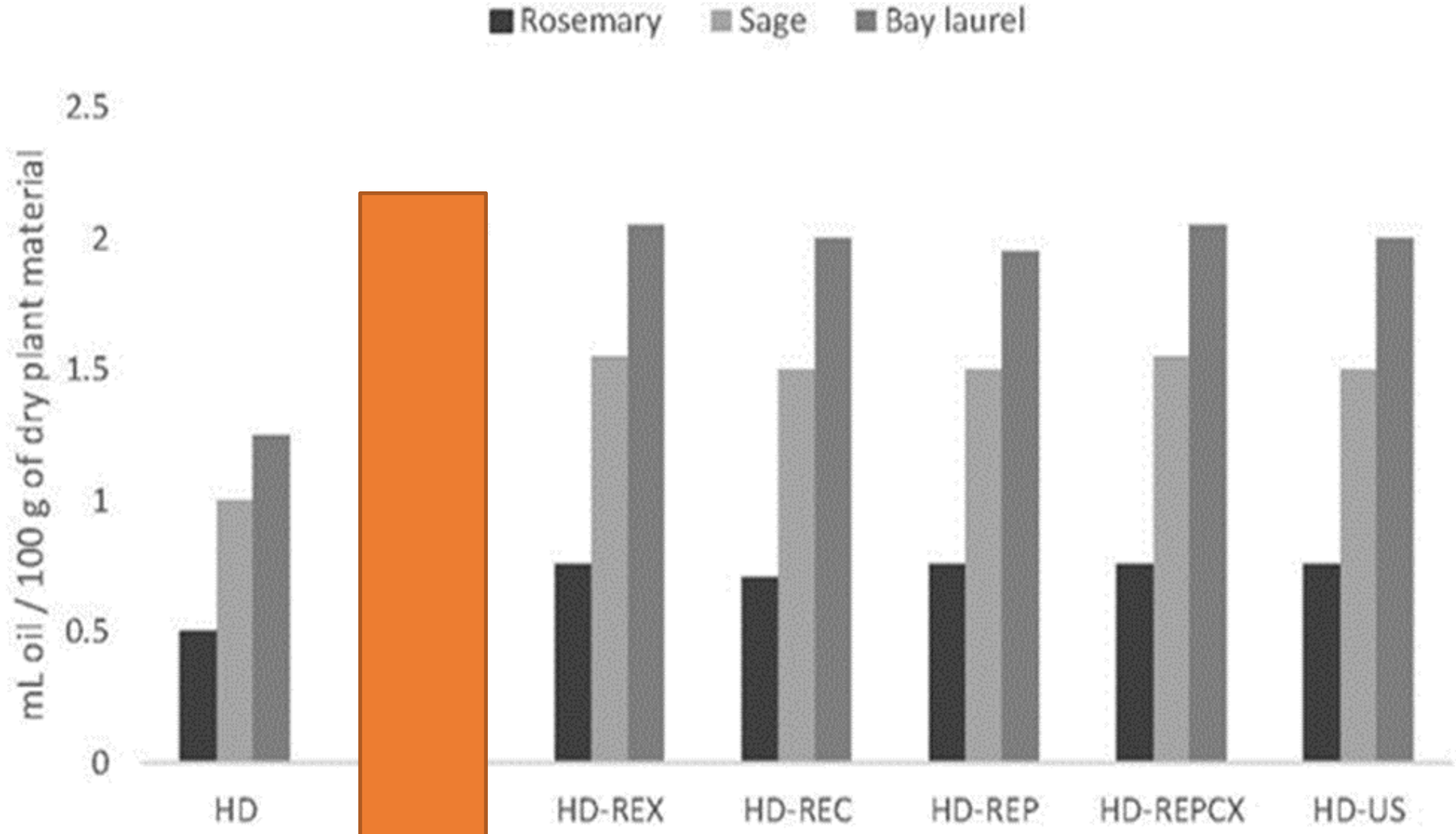
Clevenger hidrodestilacija eteričnog ulja (vlastita fotografija).

EKSPERIMENTALNI DIO:

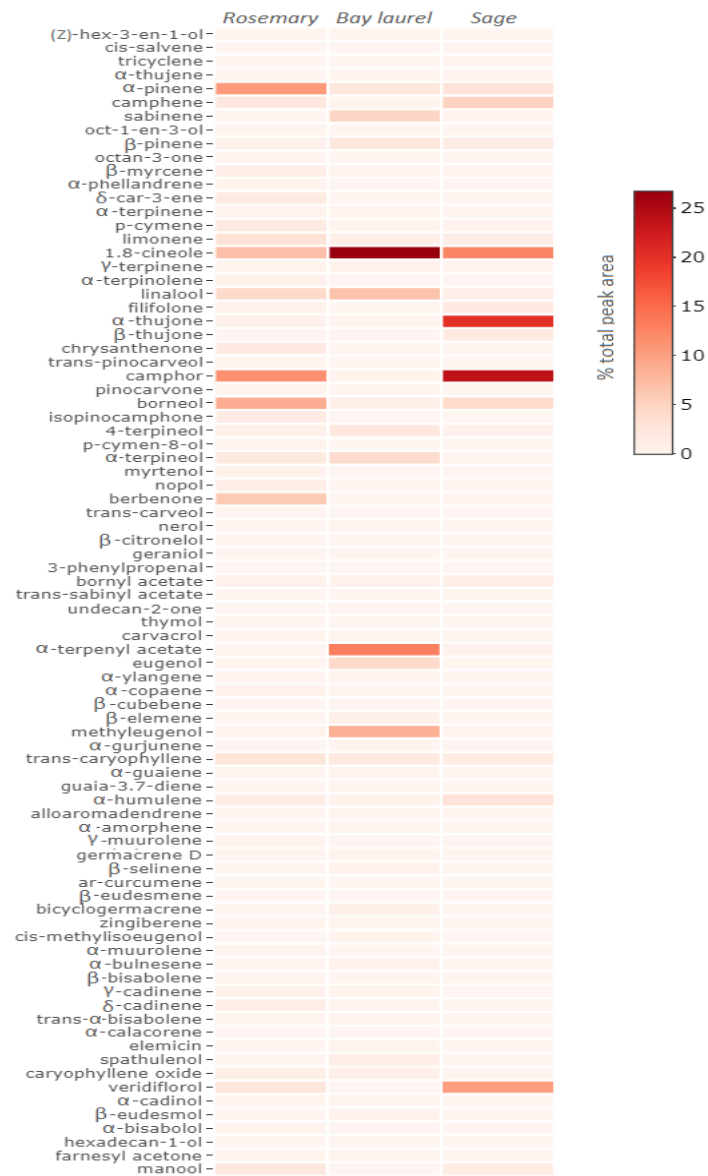
Utvrđivanje uvjete izolacije eteričnih ulja iz samoniklog mediteranskog bilja, kadulje, lovora i ružmarina, kojima se dobiva maksimalan prinos ulja.



Pregled ekstrakcijskih protokola koji će se koristiti za izolaciju eteričnog ulja. US – ekstrakcija ultrazvukom, RE – klasična ekstrakcija s refluksiranjem, REX, REP, REC, REXPC – klasična ekstrakcija s refluksiranjem uz dodatak enzima ksilanaze, pektinaze, celulaze, odnosno njihove kombinacije.



ELSEVIER
Enzym (Laur...
Abden...
Hervé C...
ELSEVIER
Enzym...
capita...
chem...
Karim...
Houcir...
ELSEVIER
Analytical...
Enzym...



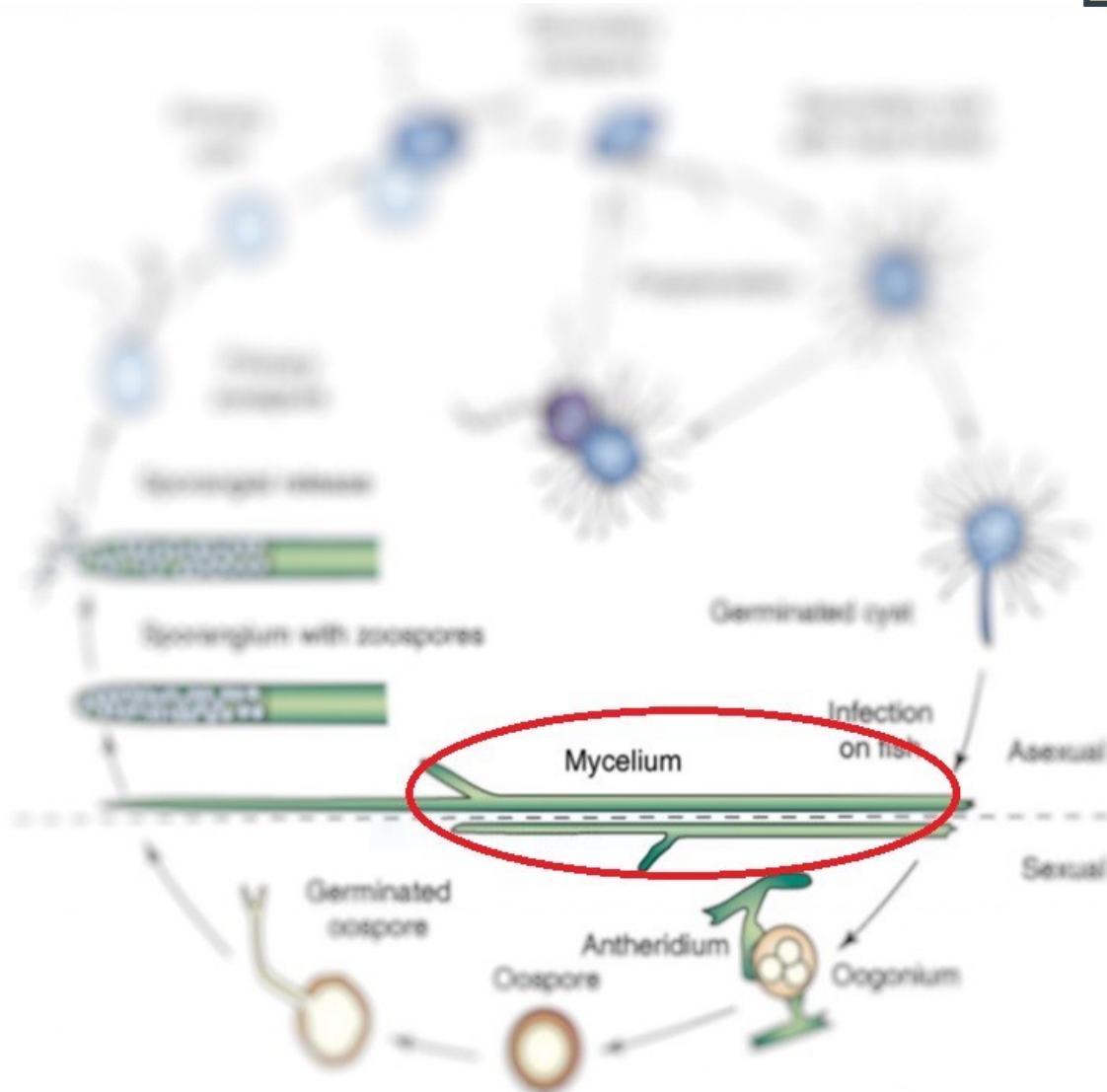
eterična ulja

- GCMS
- bogata hlapivim bioaktivnim komponentama kao kamfor, 1,8 – cineole i α -tujon

EKSPERIMENTALNI DIO

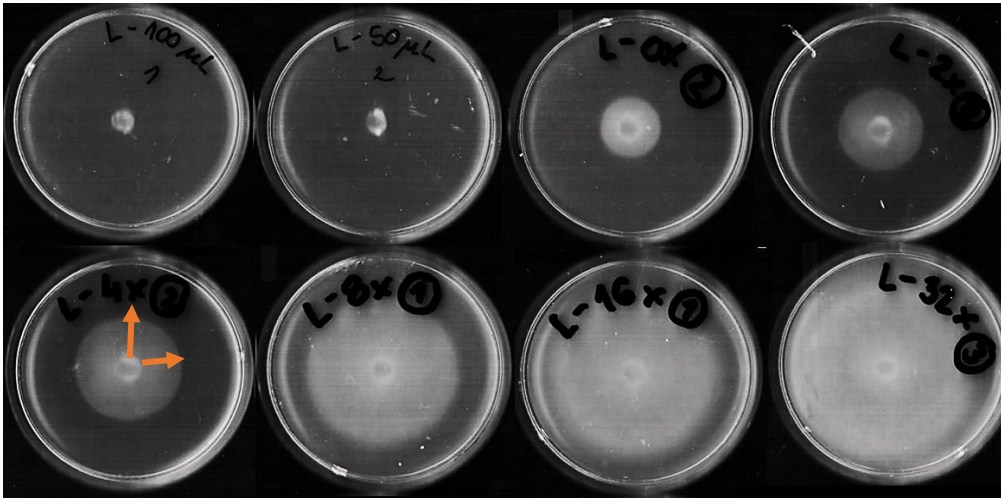
Određivanje inhibicijskog potencijala eteričnog ulja kadulje, lovora i ružmarina prema oomicetnim patogenima *A. astaci* i *S. parasitica*

Inhibicija rasta micelija

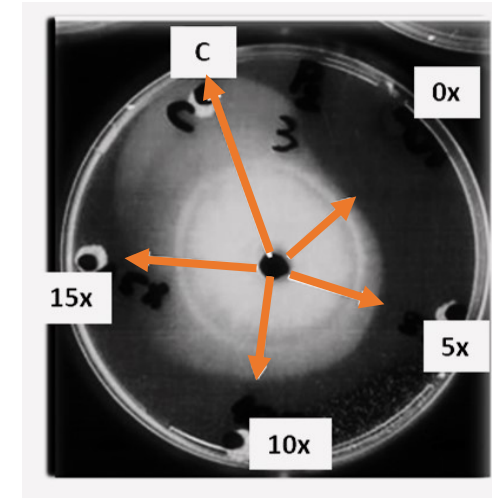


Inhibicija rasta micelija

- raspon koncentracija testiranih komponenti
- mjerenje radijalnog rasta micelija programom Image J
- određivanje EC_{50} values vrijednosti statističkim programom GraphPadPrism

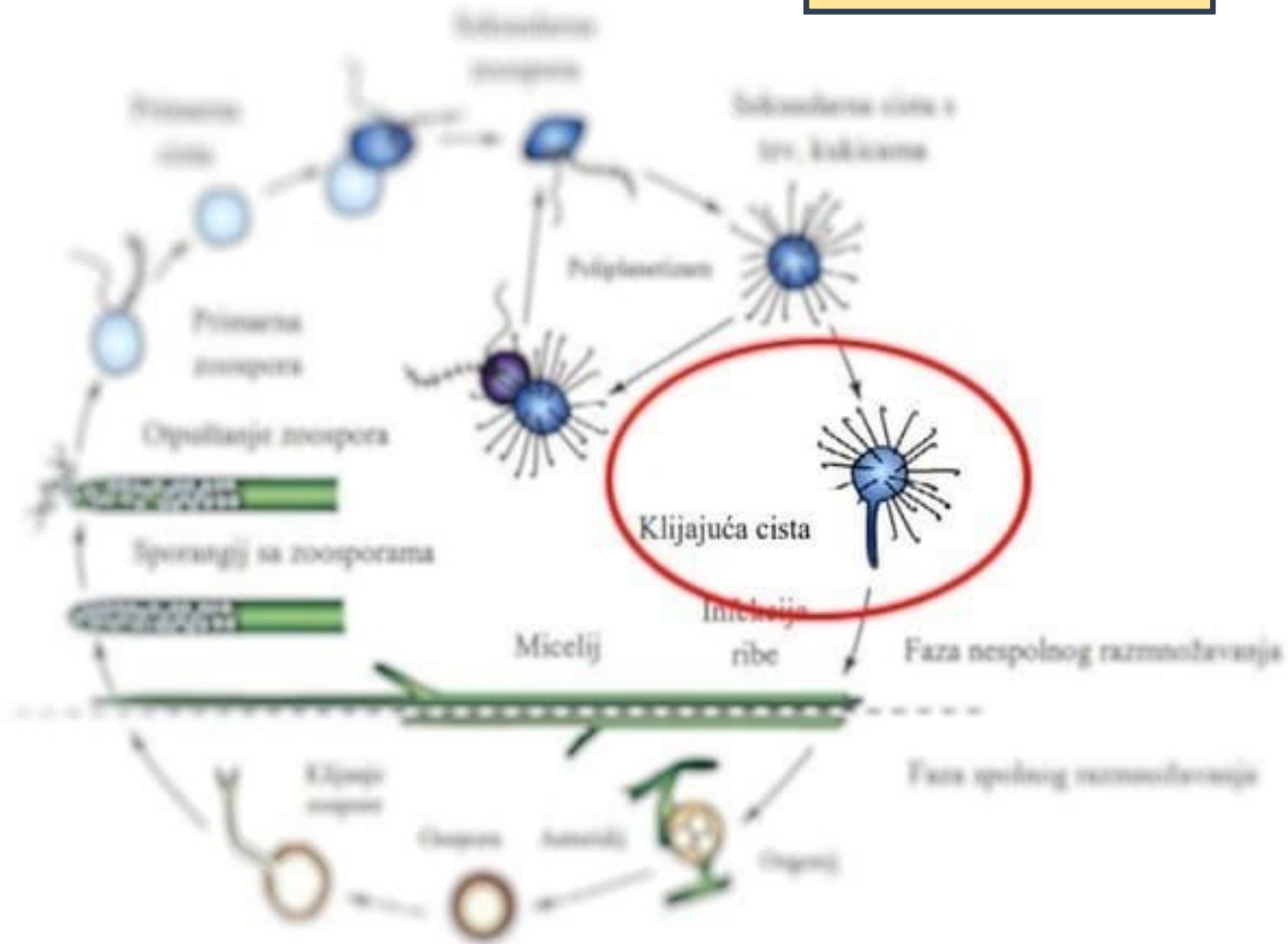


Inhibicija radijalnog rasta micelija patogena *S. parasitica* pomoću eteričnog ulja lovora (vlastita fotografija).



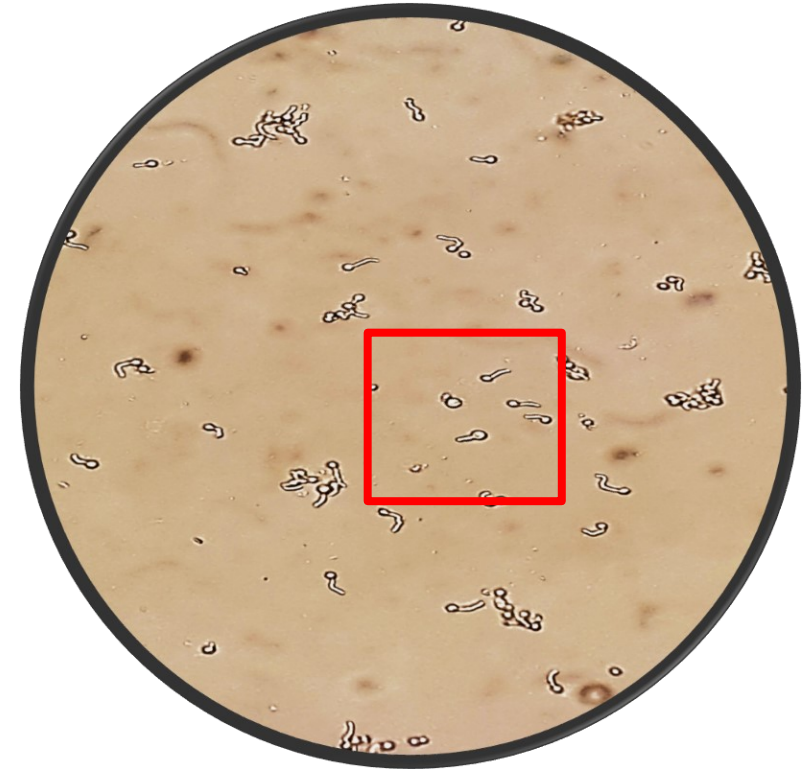
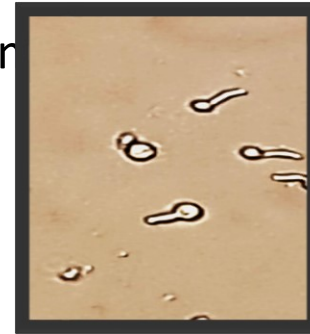
Disk difuzijska metoda inhibicije rasta micelija patogena *S. parasitica* pomoću propolisa (vlastita fotografija).

Inhibicija klijavosti zoospora

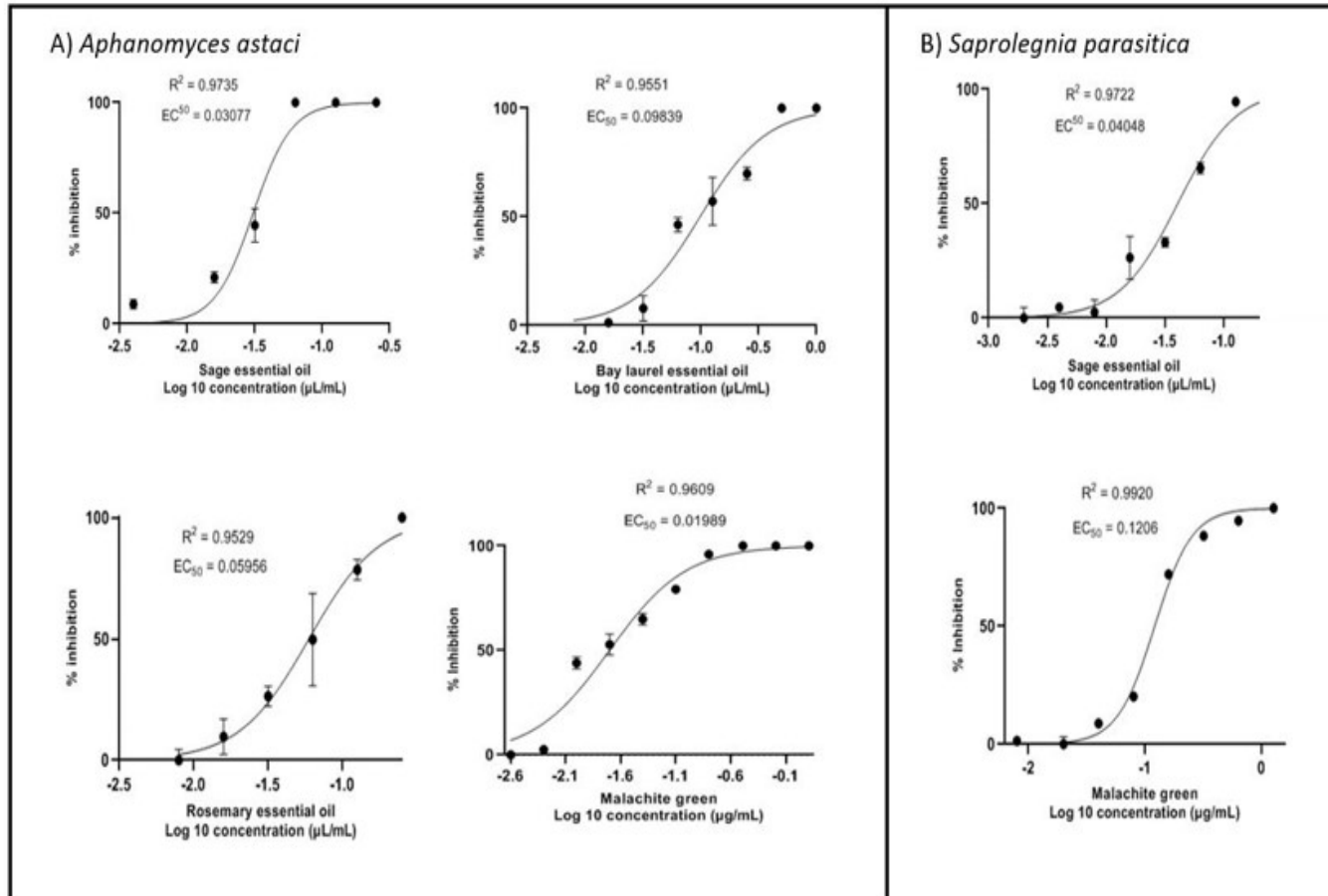


Inhibicija klijavosti
zoospora

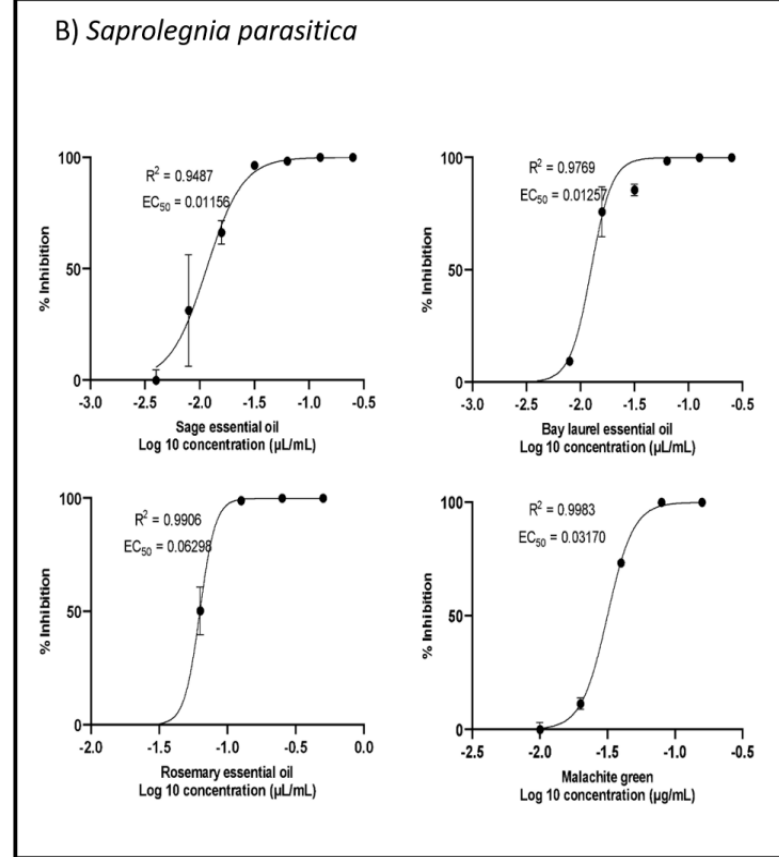
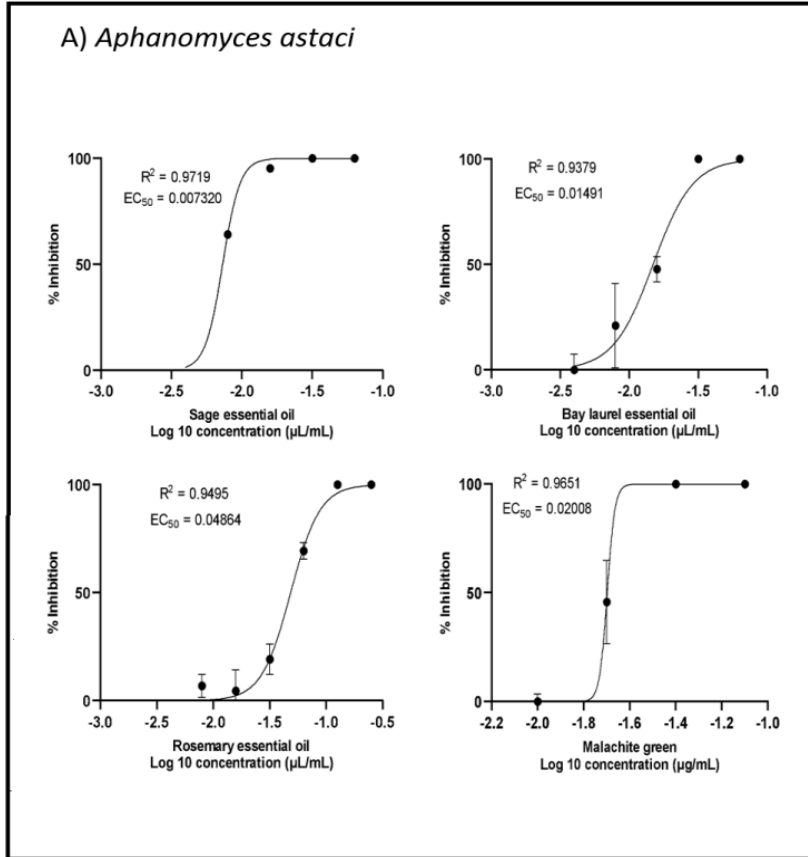
- određivanje optimalnih uvjete sporulacije
- određivanje optimalnih uvjete klijavosti
- 12-well plates
- određivanje EC_{50} vrijednosti za inhibiciju klijavosti u programu GraphPrism



Inhibicija rasta micelija



Inhibicija klijavosti zoospora



EKSPERIMENTALNI DIO

Određivanje inhibicijskog potencijala eteričnih ulja kadulje, lovora i ružmarina prema oomicetnim patogenima *A. astaci* i *S. parasitica*

A. Astaci micelij je osjetljiviji nego *S. parasitica* micelij na sve testirane komponente.

Osjetljivost klijavosti zoospora na testirane komponente je slična za oba patogene.

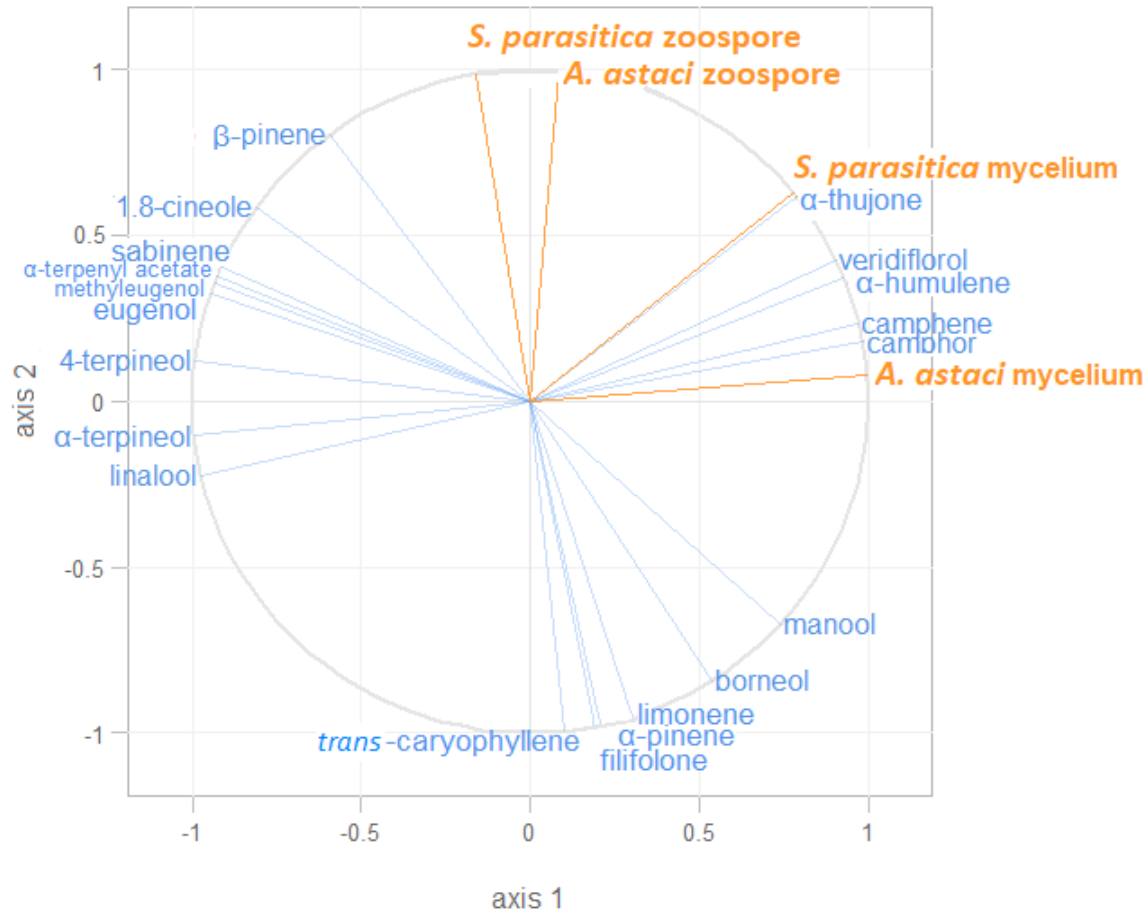
Zoospore su osjetljivije u odnosu na micelij.

Eterično ulje kadulje je najjači inhibitor rasta micelija.

Eterična ulje kadulje i lovora su najjači inhibitori klijavosti zoospora.

| | EC ₅₀ za rast micelija (μL/mL) | | EC ₅₀ za klijavost zoospora (μL/mL) | |
|---|--|----------------------|---|----------------------|
| | <i>A. astaci</i> | <i>S. parasitica</i> | <i>A. astaci</i> | <i>S. parasitica</i> |
| Eterično ulje ružmarina | 0.060 | N.D.* | 0.049 | 0.063 |
| Eterično ulje kadulje | 0.031 | 0.040 | 0.007 | 0.012 |
| Eterično ulje lovora | 0.098 | N.D.* | 0.015 | 0.013 |
| | μg/mL | | μg/mL | |
| Malahitno zelenilo (pozitivna kontrola) | 0.020 | 0.120 | 0.020 | 0.032 |

PLS-R2 radar korelacije



- kamfor, kamfene, α -humulene, veridiflorol, α -tujone su pozitivno korelirani s inhibicijom rasta micelija
- β -pinene i 1,8-cineol su pozitivno korelirani s inhibicijom klijavosti zoospora
- sinergistička aktivnost brojnih komponenti

Ekološki prihvatljiva kontrola patogenih oomiceta

dodatak prehrani

umakanje jaja i
životinja u kupke s
testiranim uzorcima

poboljšanje rasta
(Sönmez et al.,
2015)

poboljšanje
imunskog odgovora
(Firmino, 2020; Sari and
Ustuner – Aydal, 2018,
Mişe Yonar et al. 2017)





poboljšanje otpora
prema oomicetama
(Yogeshwari et al.,
2015)

povećanje stope
izleganja jaja
(Khosravi et al.,
2012; Metin et al.,
2015)

zacjeljivanje
kožnih lezija
(Harikrishnana et
al., 2005)

Article

Essential Oils of Sage, Rosemary, and Bay Laurel Inhibit the Life Stages of Oomycete Pathogens Important in Aquaculture

Anđela Miljanović¹, Dorotea Grbin¹, Dora Pavić¹, Maja Dent¹ , Igor Jerković² , Zvonimir Marijanović² 
and Ana Bielen^{1,*} 

- ¹ Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia; amiljanovic@pbf.hr (A.M.); dorotea.polo@gmail.com (D.G.); dpavic@pbf.hr (D.P.); maja.dent@pbf.unizg.hr (M.D.)
- ² Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Rudera Boškovića 35, 21 000 Split, Croatia; igor@ktf-split.hr (I.J.); zmarijanovic@ktf-split.hr (Z.M.)
- * Correspondence: abielen@pbf.hr; Tel.: +385-1-483-6013

Abstract: *Saprolegnia parasitica*, the causative agent of saprolegniosis in fish, and *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, are oomycete pathogens that cause economic losses in aquaculture. Since toxic chemicals are currently used to control them, we aimed to investigate their inhibition by essential oils of sage, rosemary, and bay laurel as environmentally acceptable alternatives. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) analysis showed that the essential oils tested were rich in bioactive volatiles, mainly monoterpenes. Mycelium and zoospores of *A. astaci* were more sensitive compared to those of *S. parasitica*, where only sage essential oil completely inhibited mycelial growth. EC₅₀ values (i.e., concentrations of samples at which the growth was inhibited by 50%) for mycelial growth determined by the radial growth inhibition assay were 0.031–0.098 µL/mL for *A. astaci* and 0.040 µL/mL for *S. parasitica*. EC₅₀ values determined by the zoospore germination inhibition assay were 0.007–0.049 µL/mL for *A. astaci* and 0.012–0.063 µL/mL for *S. parasitica*. The observed inhibition, most pronounced for sage essential oil, could be partly due to dominant constituents of the essential oils, such as camphor, but more likely resulted from a synergistic effect of multiple compounds. Our results may serve as a basis for in vivo experiments and the development of environmentally friendly methods to control oomycete pathogens in aquaculture.

Keywords: anti-oomycete activity; *Aphanomyces astaci*; EC₅₀ values; Mediterranean wild plants; *Saprolegnia parasitica*



Citation: Miljanović, A.; Grbin, D.; Pavić, D.; Dent, M.; Jerković, I.; Marijanović, Z.; Bielen, A. Essential Oils of Sage, Rosemary, and Bay Laurel Inhibit the Life Stages of Oomycete Pathogens Important in Aquaculture. *Plants* **2021**, *10*, 1676. <https://doi.org/10.3390/plants10081676>

Academic Editor: Stefania Garzoli



Ana Bielen, PhD
Dora Pavić, PhD
Dorotea Grbin, PhD
Maja Dent, PhD
Tonči Rezić, PhD
Martina Andlar, PhD
Sandra Pedisić, PhD



Ivana Maquire, PhD



Igor Jerković, PhD
Zvonimir Marijanović, PhD



FACULTY OF CHEMISTRY
AND TECHNOLOGY

Ovo istraživanje financirano je projektom Hrvatske zaklade za znanost:

- “Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša”
- (InteractOomyc, UIP-2017-05-6267)



Hvala svima!