



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Laura Koščak

**OSJETLJIVOST HRVATSKIH
AUTOHTONIH SORTI MASLINE NA
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*
I MOGUĆNOSTI KONTROLE
KORIŠTENJEM BIOAKTIVNIH SPOJEVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Laura Koščak

**SUSCEPTIBILITY OF CROATIAN
AUTOCHTHONOUS OLIVE VARIETIES TO
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*
AND POSSIBILITIES OF CONTROL USING
BIOACTIVE COMPOUNDS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Laura Koščak

**OSJETLJIVOST HRVATSKIH
AUTOHTONIH SORTI MASLINE NA
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*
I MOGUĆNOSTI KONTROLE
KORIŠTENJEM BIOAKTIVNIH SPOJEVA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Edyta Đermić

dr. sc. Sara Godena

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Laura Koščak

**SUSCEPTIBILITY OF CROATIAN
AUTOCHTHONOUS OLIVE VARIETIES TO
Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi*
AND POSSIBILITIES OF CONTROL USING
BIOACTIVE COMPOUNDS**
DOCTORAL THESIS

Supervisors:

prof. dr. sc. Edyta Ćeremić

dr. sc. Sara Godena

Zagreb, 2025.

Bibliografska stranica

Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: Poljoprivreda (Agronomija)
- Znanstvena grana: Fitomedicina
- Institucija: Institut za poljoprivredu i turizam, Poreč
- Voditelji doktorskog rada: prof. dr. sc. Edyta Đermić, dr. sc. Sara Godena
- Broj stranica: 137
- Broj slika: 13
- Broj tablica: 16
- Broj priloga: 1
- Broj literaturnih referenci: 194
- Datum obrane doktorskog rada: 2025.
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:
 1. prof.dr.sc. Darko Vončina
 2. dr.sc. Gabriela Vuletin Selak
 3. dr.sc. Marin Krapac

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p. 550, 10 000 Zagreb,

Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog Fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 02.05. 2023., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 25.10.2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, **Laura Koščak**, izjavljujem da sam samostalno izradila doktorski rad pod

naslovom:

OSJETLJIVOST HRVATSKIH AUTOHTONIH SORTI MASLINE NA *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* I MOGUĆNOSTI KONTROLE KORIŠTENJEM BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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).

U Zagrebu, dana 2025.

Potpis doktorandice

Ocjena doktorskog rada

Ovu disertaciju je ocijenilo povjerenstvo u sastavu:

1. prof.dr.sc. Darko Vončina, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta
2. dr.sc. Gabriela Vuletin Selak, viša znanstvena suradnica Instituta za jadranske kulture i melioracije krša u Splitu
3. dr.sc. Marin Krapac, viši znanstveni suradnik Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču

Disertacija je obranjena _____. na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof.dr.sc. Darko Vončina _____
redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta
2. dr. sc. Gabriela Vuletin Selak _____
viša znanstvena suradnica Instituta za jadranske kulture i melioracije krša u Splitu
3. dr. sc. Marin Krapac _____
viši znanstveni suradnik Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču

Mentor 1: prof. dr. sc. Edyta Đermić

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

Matični broj znanstvenika: 225544

Kretanje u službi:

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

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

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

2008.-2013. Docent, SuZg Agronomski fakultet

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mentor 2 : dr. sc. Sara Godena

Matični broj znanstvenika: 295364

Kretanje u službi:

2023.- viša znanstvena suradnica na Institutu za poljoprivredu i turizam, Poreč

2019. - voditeljica laboratorija za zaštitu bilja na Institutu za poljoprivredu i turizam, Poreč

2013. - doktor znanosti u području biotehničkih znanosti, polje poljoprivrede na Institutu za poljoprivredu i turizam, Poreč

2007.- Institut za poljoprivredu i turizam, Poreč

Znanstveni interesi: virusni patogeni masline i ekološka zaštita masline

Projekti: Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ): projekt UIP-2020-02-7413 „Prirodni bioaktivni spojevi kao izvor potencijalnih antimikrobnih tvari u suzbijanju bakterijskih i drugih gljivičnih patogena masline (Anti-Mikrobi-OL)“. Dva projekta HRZZ „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2021-02-2882 i DOK-NPOO-2023-10-3327). VIP projekt Ministarstva poljoprivrede „Uzročnici sindroma sušenja masline u održivom maslinarstvu“; zatim projekt Zaklade Adris „Istraživanje uzročnika sindroma sušenja stabala masline – nova i slabo istraživana pojava u maslinarstvu“; te komercijalni projekt „Ispitivanje djelotvornosti pripravka (tekuće suspenzije) na bazi kaolina u suzbijanju maslinine muhe (*Bactrocera oleae* Gmelin.)“. U ulozi koordinatora na ustanovi vodila je ukupno tri projekta: European Space Agency (ESA) AMSADE – Employing Machine Learning for AMbrosia SATellite DETection using Earth Observation Data, (nositelj: LIST LABS d.o.o.); zatim COST Action CA16107 EuroXanth - Integrating science on Xanthomonadaceae for integrated plant disease management in Europe (nositelj: Institut de Recherche pour le Développement); te PKP-2016-06-8290 „Procjena adaptabilnosti hrvatskog sortimenta kukuruza i soje u funkciji oplemenjivanja za toleranost na sušu“ (nositelj: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet). U ulozi suradnika bila je na ukupno 11 projekata (Horizon 2020, ERDF, HRZZ, MP, MZOŠ, EFRR i dr.).

Skupovi: Sudjelovala je na nekoliko međunarodnih, nacionalnih znanstvenih i stručnih skupova u RH i inozemstvu, te se znanstveno usavršavala u raznim međunarodnim institucijama.

Radovi: Do danas je kao prvi autor ili koautor objavila više od 40 znanstvenih radova, od kojih je 30 zastupljeno u Current Contents i u Science Citation Index Expanded bazama.



Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-UIP-2020-02-7413 „Prirodni bioaktivni spojevi kao izvor potencijalnih antimikrobnih tvari u suzbijanju bakterijskih i drugih gljivičnih patogena masline“, Anti-Mikrobi-OL, (URL: <http://antimikrobiol.iptpo.hr/>).

Infrastrukturnu, administrativnu i tehničku potporu za izradu ovog doktorskog rada pružila je matična Organizacija, Institut za poljoprivredu i turizam, Poreč.

OSJETLJIVOST HRVATSKIH AUTOHTONIH SORTI MASLINE NA *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* I MOGUĆNOSTI KONTROLE KORIŠTENJEM BIOAKTIVNIH SPOJEVA

Jedna od najpoznatijih bolesti masline (*Olea europaea* L.) je rak masline, uzrokovan infekcijom Gram-negativnom bakterijom *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Mehanizam infekcije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* uključuje sintezu dva hormona rasta – auksina i citokinina, koji uzrokuju hiperplaziju, što dovodi do formiranja hipertrofiranog tkiva ili nekontrolirane diobe stanica u različitim dijelovima masline. Bakterija je identificirana molekularnom metodom *real-time* PCR. Kolonije izolata morfološki i biokemijski su karakterizirane prema testovima opisanim u LOPAT shemi za razlikovanje vrsta roda *Pseudomonas*. Prisutnost *P. savastanoi* pv. *savastanoi* potvrđena je u 31,4% uzoraka. Za više od 70% bakterijskih izolata utvrđen je tipičan biokemijski profil za vrstu. Eterična ulja, biljni ekstrakti i nusproizvodi prerade bilja, imaju antimikrobni potencijal, što se pripisuje raznolikoj kemijskoj strukturi spojeva i njihovoj sposobnosti da djeluju toksično na različite metaboličke procese u stanicama fitopatogena. Tako je u ovom istraživanju antibakterijski potencijal utvrđen kvalitativno metodom difuzije aktivne tvari kroz kruti hranjivom medij pomoću diskova te kvantitativno metodom razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju za komercijalno dostupna eterična ulja od mente, timijana, mravinca, mažurana, kadulje i muškatne kadulje te njihovih najkoncentriranijih sastojaka, odnosno DL-mentol, timol, karvakrol, (–)-terpinen-4-ol, linalil acetat i $\alpha\beta$ -tujon. Također je istražen potencijal biljne vode masline dobivenih nakon dvofazne ekstrakcije maslinovog ulja od sorti Istarska bjelica, Leccino, Rosinjola, Buža i Buža puntoža. Najjači antibakterijski potencijal utvrđen je na tretmanu eteričnim uljem paprene metvice (*Mentha × piperita*), timijana (*Thymus vulgaris*) i mravinca (*Origanum compactum*), te najzastupljenijih komponenata tih ulja – DL-mentol, timol i karvakrol. Karvakrol je rezultirao najvećim potencijalom za daljnju evaluaciju zbog niske minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) od 1,25 mg/mL. Na svim tretmanima utvrđeno je baktericidno djelovanje kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u testu *time-kill*. Istim testom utvrđeno je da karvakrol, timol i DL-mentol imaju brzo antibakterijsko djelovanje. Spojevi timol i karvakrol inhibirali su rast bakterije pri svim testiranim koncentracijama, održavajući baktericidni učinak tijekom 24 sata. Međutim, kod ulja je zabilježen ponovni rast bakterije unutar 24 sata, ovisno o tretmanu. Ulje mravinca i karvakrol, dodatno su testirani kako bi se utvrdio mehanizam djelovanja temeljem istjecanja metabolita iz stanica bakterije. Oba tretmana uzrokovala su istjecanje proteina i nukleinskih kiselina, s jačim učinkom karvakrola. Zbog izraženog antibakterijskog djelovanja karvakrola, testirana je njegova potencijalna fitotoksičnost na sadnicama masline u plasteniku. Suspenzije karvakrola primijenjene su folijarno u koncentracijama jednakim MIK i 2× MIK. Fitotoksičnost se manifestirala u obliku nekrotičnih lezija na licu mladih listova, koje su bile izraženije pri višim koncentracijama. Utvrđena je i antibakterijska aktivnost biljne vode masline i fenola hidroksitirozola kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Biljne vode su podijeljene u dvije frakcije temeljem pH vrijednosti, čime se postigla razlika tretmana u ukupnom sadržaju fenola. U plasteniku je utvrđena virulentnost pet izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* za pet različitih sorti masline. Utvrđeno je da izolat i sorta masline utječu na intenzitet bolesti, pri čemu površina tumora odražava razlike u virulentnosti bakterijskih izolata. Najveća razina virulentnosti utvrđena je inokulacijom izolata I7 L, a najniža izolata B45 C-PR. Sorta Rosinjola pokazala je najveću osjetljivost na rak masline, dok je Istarska bjelica klasificirana kao tolerantna.

Ključne riječi: bakteriozni rak masline, biljna voda masline, bioaktivni spojevi, eterična ulja, fenoli, karvakrol, maslina (*Olea europaea* L.), autohtoni sortiment, virulentnost

SUSCEPTIBILITY OF CROATIAN AUTOCHTHONOUS OLIVE VARIETIES TO *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* AND POSSIBILITIES OF CONTROL USING BIOACTIVE COMPOUNDS

Among plant diseases, phytopathogenic bacteria are of great importance. Their control is limited by the availability of registered plant protection products that could be used against them in crops. Often, the control of phytopathogenic bacteria relies on the use of copper-based products, while the use of antibiotics in agriculture is banned in most agricultural regions. Although copper-based products are effective, frequent use can lead to bacterial resistance. Moreover, if these products are used excessively, they pose a hazard due to soil contamination. Olive (*Olea europaea* L.) orchards are threatened by numerous diseases that can cause significant damage to trees and reduce fruit yield. One of the well-known and persistent bacterial disease affecting olives is olive knot disease, caused by infection with the Gram-negative bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Olive knot is considered as an chronic disease, and it has been observed that climatic conditions, orchard location, agronomic practices and olive variety significantly influence the severity of infection and damage. The infection mechanism of *P. savastanoi* pv. *savastanoi* involves the synthesis of two growth hormones—auxins and cytokinins—which cause hyperplasia, leading to the formation of hypertrophied tissue or uncontrolled cell division in various parts of the olive tree. Although olive knot disease is present in most olive-growing regions, including Croatia, data on its presence and characterization based on biochemical properties of bacterial isolates from Croatia remain limited. This research confirmed *P. savastanoi* pv. *savastanoi* as the causal agent of olive knot disease in Istrian (Croatia) olive orchards. The bacterium was identified using the molecular diagnostic method of real-time PCR. Colonies of the isolates were morphologically and biochemically characterized according to tests described in the LOPAT scheme for distinguishing *Pseudomonas* species. The presence of *P. savastanoi* pv. *savastanoi* was confirmed in 31.4% of samples isolated from symptomatic plant material collected from 45 olive orchards in Istria. The most prevalent olive varieties were Leccino, Pendolino, Frantoio and Istarska bjelica. The bacterium was most frequently identified in the most abundant varieties, except for Istarska bjelica. Disease severity varied depending on the variety and orchard location. However, the absence of olive knot disease symptoms was noted in some varieties cultivated alongside those showing symptoms of infection. Isolates of *P. savastanoi* pv. *savastanoi* were characterized according to the LOPAT scheme, with more than 70% of isolates displaying a typical profile for this bacterium. However, it was found that most strains did not produce fluorescent pigment *in vitro*, which is atypical for this bacterium. We hypothesize that these atypical reactions are due to adaptation to specific micro-location conditions in Istria. Many researchers have investigated the effectiveness and mechanisms of action of potential antimicrobial compounds derived from plants or by-products of fruit processing. It has been found that plant essential oils, plant extracts and processing waste exhibit antimicrobial activity. This study investigated the *in vitro* antibacterial effects of six commercially available essential oils (from mentha, thymus, organum, marjoram, sage and clary sage) and their most concentrated chemical constituents (DL-menthol, thymol, carvacrol, (–)-terpinen-4-ol, linalyl acetate, and α,β -thujone). Antibacterial potential was determined using both qualitative (disc diffusion) and quantitative (broth microdilution) methods. Furthermore, the antibacterial properties of olive mill wastewater, obtained from the processing of olive fruits of varieties Istarska bjelica, Leccino, Rosinjola, Buža, and Buža puntoža, were evaluated using the same methodologies. The highest antibacterial potential was observed with essential oils from peppermint (*Mentha × piperita*), thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum compactum*), along with their most concentrated compounds—DL-menthol, thymol and carvacrol. Among all treatments, carvacrol showed the greatest potential for further evaluation due to its low minimum inhibitory concentration (MIC) value of 1.25 mg/mL. Compared with reference agents, such as antibiotics and copper, these treatments showed an approximately equal or even greater effect against *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Additionally, all treatments exhibited bactericidal rather than bacteriostatic activity against *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Further testing included time–kill assays of the most effective treatments, where

carvacrol, thymol and DL-menthol showed rapid action against the bacterium. The essential oil compounds thymol and carvacrol inhibited bacterial growth at all tested concentrations, maintaining a bactericidal effect throughout the 24-hour test period. However, for essential oils, bacterial regrowth was observed within the 24-hour period, depending on the treatment. Due to the high effectiveness of *O. compactum* essential oil and carvacrol, these treatments were further tested to determine their mechanism of action, focusing on bacterial metabolite leakage. Both treatments caused the leakage of proteins and nucleic acids, with carvacrol exhibiting a stronger effect. Encouraged by carvacrol's significant antibacterial potential, its potential phytotoxicity on olive plants was tested in a greenhouse. Carvacrol suspensions were applied foliarly on olive plants at concentrations equal to MIC and 2× MIC, as determined in antibacterial testing, to examine whether the phytotoxicity of carvacrol is dose-dependent and to assess symptoms on olive plants. Phytotoxic damage manifested as necrotic lesions, which were more severe at higher concentrations. The necrotic lesions appeared on the upper side of young leaves within one day after treatment in the greenhouse experiment. In addition, we assessed the antimicrobial activity of olive mill wastewater samples, obtained from two-phase processing of olive fruits from five different olive varieties, against *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Olive mill wastewater is known for its high phenolic content, which may have antibacterial properties. Hydroxytyrosol, a phenolic compound frequently linked to the antibacterial potential of wastewater, was also tested against the causal agent of olive knot disease. The wastewater treatments were grouped based on pH adjustment, resulting in differentiation based on total phenolic content. When the susceptibility of *P. savastanoi* pv. *savastanoi* strains was tested using wastewaters and hydroxytyrosol, only hydroxytyrosol showed some antibacterial potential. However, further microdilution analysis with wastewater treatments, covering a wider range of phenol concentrations, indicated low or absent antibacterial potential in most cases. We hypothesize that the lack of antibacterial activity is due to low initial phenolic content and possibly high concentrations of sugars, carbohydrates, and nutrients in the wastewater, which may promote bacterial growth by serving them as a source of energy. The minor antibacterial potential observed at the highest concentration with adjusted pH suggests that pH might have delayed bacterial growth. In greenhouse experiments, we tested the virulence of five *P. savastanoi* pv. *savastanoi* strains on five different olive varieties. Results indicated that both factors, strain and olive variety, influenced disease severity, with knot size reflecting differences in virulence. The highest virulence was observed in strain I7 L, while the lowest was in strain B45 C-PR. The olive variety Rosinjola showed the highest susceptibility to olive knot disease, while Istarska bjelica exhibited the lowest susceptibility. These findings support the hypothesis that polyphenols and genotype specifications play an important role in host plant defense, with the tolerance of the Istarska bjelica variety aligning with field observations of olive knot disease susceptibility.

Keywords: olive knot disease, olive mill wastewater, bioactive compounds, essential oils, phenols, carvacrol, olive (*Olea europaea* L.), autochthonous olive genotype, virulence

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Hipoteze i ciljevi rada	6
2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	7
2.1. Bolesti biljaka uzrokovane bakterijama	7
2.2. Bakteriozni rak masline (uzročnik: <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>).....	10
2.3. Patogeneza uzročnika raka masline <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	12
2.4. Mjere suzbijanja bakterijskog raka masline uzrokovanog <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	14
2.4.1. Varijabilnost osjetljivosti sorti masline na uzročnika bakterijskog raka.....	14
2.4.2. Konvencionalna sredstva za zaštitu bilja	16
2.4.3. Biolška sredstva za zaštitu bilja	18
2.5. Bioaktivni spojevi	20
2.5.1 Terepeni i terpenoidi	21
2.5.2 Fenolni spojevi	21
2.5.3 Alkaloidi	22
2.6. Eterična ulja (EtU) i njihove komponente.....	23
2.6.1. Antibakterijski potencijal eteričnih ulja (EtU) i njihovih komponenti	25
2.7. Antibakterijski potencijal biljnih ekstrakata.....	31
2.8. Mehanizam djelovanja bioaktivnih tvari	36
2.9. Uloga bioaktivnih tvari u održivoj zaštiti bilja.....	38
3. MATERIJAL I METODE RADA.....	40
3.1. Prikupljanje zaraženog biljnog materijala i izolacija uzročnika raka masline	40
3.2. Molekularna identifikacija uzročnika raka masline	44
3.3. Biokemijska karakterizacija uzročnika raka masline u Istri	46
3.4. Test patogenosti bakterijskih izolata <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> i test osjetljivosti sorti masline na rak masline.....	48
3.5. Antimikrobno djelovanje bioaktivnih tvari.....	51
3.5.1. Priprema inokuluma <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	51
3.5.2. Utvrđivanje osjetljivosti bakterijskih izolata <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> metodom difuzije aktivne tvari kroz kruti hranjivi medij pomoću diskova (Kirby–Bauer metoda)	51
3.6. Eterična ulja i njihove komponente (Kirby–Bauer metoda)	53
3.7. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija bioaktivnih tvari.....	56
3.7.1. Eterična ulja i njihove komponente (CLSI, 1999 metoda)	56
3.8. Određivanje bakterijskog i bakteriostatskog djelovanja eteričnih ulja i njihovih komponenti	57

3.9.	Krivulja <i>time–kill</i>	57
3.10.	Mehanizam antibakterijskog djelovanja eteričnog ulja mravinca (<i>Origanum compactum</i>) i komponente karvakrol kod <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	58
3.11.	Fitotoksičnost karvakrola za sadnice masline.....	59
3.12.	Biljna voda masline i hidroksitirozol (Kirby–Bauer metoda)	60
3.13.	Određivanje ukupnog sadržaja fenola u uzorcima biljnih voda masline	62
3.14.	Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija biljne vode masline i fenola hidroksitirozola.....	64
3.15.	Analiza podataka	65
3.15.1.	Antibakterijsko djelovanje bioaktivnih tvari.....	65
3.15.2.	Test patogenosti bakterijskih izolata <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> i test osjetljivosti sorti masline na rak masline.....	65
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	67
4.1.	Identifikacija i karakterizacija uzročnika bakterioznog raka masline (<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>) u Istri	67
4.2.	Virulentnost bakterijskih izolata <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> i osjetljivost sorti masline na rak masline	74
4.3.	Analiza osjetljivosti sorti masline na bakteriozni rak masline	78
4.4.	Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti	80
4.4.1.	Osjetljivost <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> na eterična ulja i njihove komponente	80
4.4.2.	Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije eteričnih ulja i njihovih komponenti za <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	82
4.4.3.	Usporedba učinka MIK tretmana eteričnih ulja i njihovih komponenti s antibiotikom i komercijalnim sredstvom na bazi bakra	85
4.4.4.	Krivulja <i>time - kill</i> (Test <i>time – kill</i>)	86
4.4.5.	Mehanizam djelovanja eteričnog ulja mravinca i komponente karvakrol kod <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	88
4.5.	Fitotoksičnost karvakrola za sadnice masline.....	89
4.6.	Antibakterijsko djelovanje biljne vode biljne vode masline i fenola hidroksitirozola	91
4.6.1.	Osjetljivost izolata <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> na biljne vode biljne vode masline i fenol hidroksitirozol	91
4.6.2.	Minimalne inhibitorne koncentracije biljne vode masline i fenola hidroksitirozola kod <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	92
5.	RASPRAVA.....	96
5.1.	Sortiment masline i prisutnost bakterioznog raka masline u Istri	96
5.2.	Biokemijska karakterizacija molekularno identificiranih izolata <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> iz zaraženih maslinika u Istri.....	101
5.3.	Osjetljivost hrvatskih autohtonih sorti masline na bakteriozni rak masline	104

5.4.	Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti kod <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	107
5.5.	Antibakterijski učinak biljne vode masline i fenola hidroksitirozola kod <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	111
6.	ZAKLJUČCI.....	114
7.	POPIS LITERATURE	115
8.	Životopis autora.....	135

Popis kratica

ANOVA analiza varijance (eng. *Analysis of Variance*)

br broj (eng. *number*)

DNK deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*, DNA)

F Forward – uzvodna (početnica)

R Reverse – nizvodna (početnica)

HSD (eng. *Honest Significant Difference*)

real-time PCR lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu (eng. *real-time Polymerase Chain Reaction*)

CFU broj stanica bakterije (eng. *Colony forming Units*)

rpm okretaj u minuti (eng. *revolutions per minute*)

EtU eterično, esencijalno ulje (eng. *essential oil*)

HTyr hidroksitirozol (eng. *hydroxytyrosol*)

FCR Folin-Ciocalteu Reagens (eng. *Folin-Ciocalteu Reagent*)

QS sustav komunikacije između stanica bakterije (eng. *Quorum sensing*)

KB King's B kruta hranjiva podloga (eng. *King's B solid growth medium*)

KBL King's B tekući hranjivi medij (eng. *King's B liquid growth medium*)

KBC King's B kruta hranjiva podloga s dodatkom antibiotika cikloheksamida (eng. *King's B solid growth medium with addition of antibiotic cycloexamide*)

LOPAT levan, oskidaza, prekoliza, arginin dehidrogenaza, test hipersenzitivne reakcije na listovima duhana (eng. *levan, oxydase, pectolitic acitivity, arginin dehyrolase, test of hypersensitive reaction on tobaco leaves*)

mL mililitar (eng. *milliliter*)

mg miligram (eng. *milligram*)

MIK minimalna inhibitorna koncentracija (eng. *minimal inhibitory concentration*)

MBK minimalna baktericidna koncentracija (eng. *minimal bactericidal concentration*)

nm nanometar (eng. *nanometer*)

OD optička gustoća (eng. *Optical Density*)

SZB sredstva za zaštitu bilja (eng. *plant protection products*)

Popis tablica

Tablica 1. Popis eteričnih ulja (EtU) od različitih biljnih vrsta za koje je testiran antibakterijski potencijal kod fitopatogenih vrsta bakterija. Antibakterijski potencijal je izražen kroz vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), ukoliko nije prikazano drugačije.

Tablica 2. Popis nusproizvoda i otpada biljne proizvodnje za koje je testiran antibakterijski potencijal kod fitopatogenih vrsta bakterija. Antibakterijski potencijal je izražen kroz utvrđene vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), ukoliko nije drugačije označeno.

Tablica 3. Podatci o prikupljenim uzorcima zaraženog tkiva masline i agronomskoj praksi maslinara na četiri uzgojna područja u Istri.

Tablica 4. Popis bioaktivnih tvari i koncentracija tretmana za testiranje osjetljivosti *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Tablica 5. Kromatografski profil od proizvođača komercijalnih eteričnih ulja od vrsta paprena metvica (*Mentha × piperita*), timijan (*Thymus vulgaris*), mravinac (*Origanum compactum*), mažuran (*Origanum majorana*) i muškatna kadulja (*Salvia sclarea*) (PRANARÔM International, Belgija), te ulje od kadulje (*Salvia officinalis*) (Fagron, Hrvatska). Podebljane su vrijednosti komponenti koje određuju kemotip testiranih ulja.

Tablica 6. Popis tretmana za koje je utvrđena osjetljivost izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Tablica 7. Popis tretmana i koncentracija tretmana za koje je utvrđen antibakterijski potencijal kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Tablica 8 Udio i zaraženost sortimenta masline bakterioznom rakom masline u istraživanim maslinicima u 2021. i 2022. godini u Istri.

Tablica 9. Popis molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* s pripadajućim nazivima simptomatičnih sorti masline i koordinatama maslinika u kojima su prikupljeni uzorci biljnog materijala.

Tablica 10. Karakterizacija i opis simptoma i kolonija molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* prikupljenih 2021. i 2022. godine prilikom terenskih istraživanja u maslinicima u Istri.

Tablica 11. Biokemijski profil molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* iz maslinika u Istri prema LOPAT shemi.

Tablica 12. Ocjena osjetljivosti sortimenta masline temeljem promjera tumorastih izraslina nakon zaraze s pet izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost 60 mjerenja $\pm$ standardna devijacija.

Tablica 13. Površina tumorastih izraslina nakon inokulacije pet sorti masline s pet izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost 60 mjerenja $\pm$ standardna devijacija.

Tablica 14. Inhibicija rasta *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (mm) pri tri različite koncentracije tretmana metodom difuzije aktivne tvari pomoću diskova (srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška). Testiran je učinak koncentracije nerazrijeđenog eteričnog ulja ili komponente ulja ili razrijeđene krute tvari - K1; razrijeđenje ulja timijana (*Thymus vulgaris*) i mravinca (*Origanum compactum*) od 20 mg/mL, ostala EtU 40 mg/mL i komponente ulja od 5,0 mg/mL - K2; razrijeđenja ulja i komponenti od 50 mg/mL – K3.

Tablica 15. Masa (g) listova sa sadnica sorte Leccino tretiranih s otopinom karvakrola u uvjetima plastenika (n=160).

Tablica 16. Osjetljivost dva bakterijska izolata (CFBP 5075 i I7 L) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* na tretirane i netretirane biljne vode masline, fenol hidroksitirozol (HTyr) i referentne antibakterijske tvari temeljem zone inhibicije rasta oko diskova s tretmanima izražene u mm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost devet mjerenja/diskova $\pm$ standardna devijacija.

Popis slika

Slika 1. Hipertrofirano biljno tkivo kao simptom infekcije bakterijom *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, uzročnik raka masline na maslini (*Olea europaea* L.). Simptomi bolesti raka masline na A) skeletnoj grani, B i C) grančicama i D) na mjestu reza višegodišnje grane.

Slika 2. Uzorkovanje simptomatičnog biljnog materijala u maslinicima u Istri. A) Lokacije uzorkovanja na području Istre; B) prikaz jednog od maslinika obuhvaćenog istraživanjem; (C). uzimanje simptomatičnog tkiva masline zaražene s uzročnikom bakterioznog raka masline.

Slika 3. Izolacija uzročnika raka masline iz tumorastih izraslina na simptomatičnom biljnom materijalu. A) simptomatični biljni materijal; B) usitnjavanje tumorastih izraslina; C) potapanje komadića tumora u sterilnu destiliranu vodu; D) suspenzije bakterija; E) čiste kulture izolata.

Slika 4. Priprema izolata bakterije za izolaciju DNK i identifikaciju uzročnika raka masline metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (*real-time* PCR). A) čista kultura bakterije. B) priprema uzoraka za izolaciju DNK i identifikaciju metodom PCR; C) uređaj za izolaciju DNK; D) uređaj za *real-time* PCR.

Slika 5. Karakterizacija molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izoliranih iz simptomatičnog biljnog materijala masline u istraživanim maslinicima u Istri prema testovima sheme LOPAT i sposobnosti proizvodnje fluorescentnog pigmenta. A) proizvodnja levana; B) prisutnost oksidaze; C) pektolitička aktivnost; D) prisutnost arginin dehidrogenaze; E) test hipersenzitivne reakcije na listovima duhana; F) fluorescencija na hranjivoj podlozi KB.

Slika 6. Shematski prikaz dizajna pokusa osjetljivosti autohtonih i introduciranih sorti masline na uzročnika raka masline i test virulentnosti izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u plasteniku prema slučajnom bloknom rasporedu. F–Frantoio; L–Leccino; R–Rosinjola; IB–Istarska bjelica; B–Buža.

Slika 7. Priprema inokuluma bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* za testiranje virulentnosti izolata i osjetljivosti sorti masline na rak masline.

Slika 8. Postupak zaraze sadnica masline izolatima *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* u plasteniku. A) rane na kori sadnica masline urezane u obliku slova V; B) Inokulirane rane omotane parafilmom M; C) formirani kalus na ranama nakon 10–15 dana nakon inokulacije; D) formirane tumoraste izrasline šest mjeseci nakon inokulacije.

Slika 9. Određivanje osjetljivosti izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* na bioaktivne tvari prema Kirby–Bauer metodi.

Slika 10. Priprema tretmana biljne vode masline za ispitivanje antibakterijskog učinka. A) prikupljeni uzorci biljne vode masline nakon prerade ploda masline u uljari; B) filtrat netretirane biljne vode; C) centrifugiranje filtrata netretirane biljne vode; D) biljna voda masline (tretman). (Foto: S. Godena i E. Petrović)

Slika 11. Skala prema kojoj je utvrđena osjetljivost sorti masline na zarazu bakterijom *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Brojevi na slici predstavljaju ocjene temeljene na vrijednostima dimenzija tumora za određivanje osjetljivosti sorti masline na rak masline: 0: bez simptoma; 1: 1–5,5 mm; 2: 5,6–10,5 mm; 3: 10,6–15,5 mm; 4: 15,6–20,5 mm; i 5: >20,5 mm.

Slika 12 Prikaz kolonija referentnog izolata i nekoliko molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izoliranih iz biljnog materijala iz istraživanih maslinika u Istri. Kolonije čiste kulture uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi King's B (KB) snimljene su mikroskopom pri povećanju 4×.

Slika 13. Nektorične lezije kao simptom fitotoksičnosti na sadnicama masline sorte Leccino nakon folijarne primjene otopine karvakrola: MIK) odsustvo ili slabo oštećenje lista tretiranog karvakrolom u koncentraciji 1,25 mg/mL; 2× MIK) oštećenje listova na izbojcima sadnica masline tretiranih otopinom karvakrola u koncentraciji 2,50 mg/mL.

Popis grafikona

Grafikon 1. Virulentnost pet izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni soj CFBP 5075 iz Italije, slovenski izolat A1-1, hrvatski izolati I7 L, P15 N i B45 C-PR), temeljen na broju tumora/opažanja unutar svake skupine ocjene u odnosu na ukupan broj opažanja (60 tumorastih izraslina) po izolatu $\times$ sorti. Razvijeni simptomi su svrstani u ocjene/kategorije od 0 do 5 (legenda) prema prilagođenoj verziji skale autora Ambuasha i sur. (2023): 0: bez simptoma; 1: 1–5,5 mm; 2: 5,6–10,5 mm; 3: 10,6–15,5 mm; 4: 15,6–20,5 mm; 5: >20,5 mm.

Grafikon 2. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije eteričnih ulja kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Stupci u histogramima predstavljaju vrijednosti OD₆₀₀ tretmana, dok su OD₆₀₀ tretmana bez bakterije (kontrola) prikazane kao linije u histogramima; n.d. – nije determinirano. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije pri 600 nm, a os x vrijednosti serijskih razrjeđenja tretmana. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajnu razliku između koncentracija i kontrole s bakterijom unutar pojedinog tretmana pri $p < 0,05$.

Grafikon 3. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije komponenti eteričnih ulja kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Stupci u histogramima predstavljaju vrijednosti OD₆₀₀ tretmana, dok su OD₆₀₀ tretmana bez bakterije (kontrola) prikazane kao linije u histogramima; n.d. – nije determinirano. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije pri 600 nm, a os x vrijednosti serijskih razrjeđenja tretmana. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajnu razliku između koncentracija i kontrole s bakterijom unutar pojedinog tretmana pri $p < 0,05$.

Grafikon 4. Inhibicija rasta *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* *in vitro* pri vrijednostima MIK eteričnih ulja (A) i komponenti eteričnih ulja (B), u usporedbi s inhibicijom rasta na tretmanu antibiotikom tetraciklinom i komercijalnim sredstvom na bazi bakra (Nordox 75 WG). Usporedba tretmana utvrđena je Dunnett testom pri $p^* \leq 0,05$, $** \leq 0,01$, $*** \leq 0,001$, ns–nije signifikantno. Razlike u djelovanju u usporedbi s antibiotikom su označene na lijevoj strani kose crte, dok vrijednosti s desne strane predstavljaju razlike inhibicije testiranih tvari u usporedbi sa sredstvom Nordox 75 WG.

Grafikon 5. Preživljavanje *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tijekom izlaganja eteričnim uljima i komponentama eteričnih ulja u trajanju od 24 sata pri koncentracijama jednakim vrijednostima MIK, 2 $\times$ MIK, 4 $\times$ MIK i K (kontrola bez tretmana).

Grafikon 6. Istjecanje metabolita iz stanica bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tretiranih s MIK, 2 $\times$ MIK i 4 $\times$ MIK eteričnog ulja mravinca (*Origanum compactum*) i njegove komponente karvakrol. K – suspenzija bakterije bez tretmana. Vrijednosti apsorbancije pri 280 nm predstavljaju istjecanje proteina (A), vrijednosti apsorbancije pri 260 nm predstavljaju istjecanje nukleinskih kiselina (B). Tretmani označeni istim slovima se statistički ne razlikuju pri $p \leq 0,05$.

Grafikon 7. Udio izbojaka i listova na sadnicama masline sorte Leccino s utvrđenim fitotoksičnim oštećenjima 14 dana nakon tretiranja suspenzijom karvakrola u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK) i 2 $\times$ MIK. Statistički značajna razlika srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima. Statistički značajne razlike između tretmana utvrđene su analizom varijance (ANOVA) na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

Grafikon 8. Antibakterijski učinak i MIK vrijednosti tretmana biljnih voda masline (tretirane, pH=2) kod dva izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni izolat CFBP 5075, Italija i hrvatski izolat I7 L, Istra, Hrvatska). Vrijednosti apsorbancije tretmana s bakterijom prikazane su stupcima s različitim uzorcima, pri čemu svaki uzorak predstavlja jednu od sedam testiranih koncentracija ($\frac{1}{2}$ (C1) do $\frac{1}{128}$ (C7), s lijeva na desno). Crveni stupci (Negativna K) predstavljaju negativnu kontrolu (bakterija bez tretmana). Brojevi iznad stupaca predstavljaju postotak inhibicije rasta bakterije pri MIK vrijednostima tretmana. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije (OD₆₀₀), dok os x prikazuje testirane koncentracije tretmana definirane u Tablici 7. Zvezdice iznad stupaca predstavljaju razlike rasta bakterije na MIK u usporedbi s negativnom kontrolom, s razinom značajnosti $p \leq 0,01$ (**) i $p \leq 0,001$ (***).

Grafikon 9. Antibakterijski učinak i MIK vrijednosti tretmana biljnih voda masline (netretirane) kod dva izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni izolat CFBP 5075, Italija i

hrvatski izolat I7 L, Istra, Hrvatska). Vrijednosti apsorbancije tretmana s bakterijom prikazane su stupcima s različitim uzorcima, pri čemu svaki uzorak predstavlja jednu od sedam testiranih koncentracija ($\frac{1}{2}$ (C1) do $\frac{1}{128}$ (C7), s lijeva na desno). Crveni stupci (Negativna K) predstavljaju negativnu kontrolu (bakterija bez tretmana). Brojevi iznad stupaca predstavljaju postotak inhibicije rasta bakterija pri MIK vrijednostima tretmana. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije (OD_{600}), dok os x prikazuje testirane koncentracije tretmana definirane u Tablici 7. Zvezdice iznad stupaca predstavljaju razlike rasta bakterije na MIK u usporedbi s negativnom kontrolom, s razinom značajnosti $p \leq 0,01$ (**).

Grafikon 10. Antibakterijski učinak i MIK vrijednosti tretmana hidroksitirozol (HTyr) kod dva izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni izolat CFBP 5075, Italija i hrvatski izolat I7 L, Istra, Hrvatska). Vrijednosti apsorbancije tretmana s bakterijom prikazane su stupcima s različitim uzorcima, pri čemu svaki uzorak predstavlja jednu od sedam testiranih koncentracija ($\frac{1}{2}$ (C1) do $\frac{1}{128}$ (C7), s lijeva na desno). Crveni stupci (Negativna K) predstavljaju negativnu kontrolu (bakterija bez tretmana). Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije (OD_{600}), dok os x prikazuje testirane koncentracije tretmana definirane u Tablici 7.

Popis priloga

Prilog 1. Primjer grafikona umnožavanja dijela genoma omeđenog početnicama za nekoliko izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* korištenjem *real-time* PCR. Os x predstavlja broj ciklusa umnožavanja, a y os omjer intenziteta emitirane fluorescencije probe (VIC) i pasivne referentne boje (ROX). Sterilna destilirana voda je korištena kao negativna kontrola (SDV). Pozitivni izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* su prikazani obojenim krivuljama.

1. UVOD

Suvremena biljna proizvodnja suočava se s nizom izazova koji su direktno povezani s klimatskim promjenama, strogim zakonskim regulativama, potrebom za održivosti agroekosustava te rastućim rizicima povezanim s upotrebom konvencionalnih sredstava za zaštitu bilja (SZB). Obzirom na ubrzane promjene u okolišu i rast potražnje hrane, poljoprivredni proizvođači suočeni su s potrebom za povećanjem prinosa, uz očuvanje okoliša i minimiziranje negativnih utjecaja proizvodnje na ljude i ekosustav (Fenibo i sur., 2021). Smatra se da je zaštita bilja jedan od čimbenika koji nepovoljno utječe na održivost biljne proizvodnje. Tradicionalna upotreba kemijskih SZB postala je predmet ozbiljne zabrinutosti zbog potencijalnih negativnih učinaka na zdravlje ljudi, životinja i okoliša.

Posljednjih desetljeća, sve se više prepoznaje potreba za smanjenjem upotrebe konvencionalnih SZB. Takav pristup poljoprivredi potaknut je i strogim regulativama viših upravljačkih i zakonodavnih tijela, s ciljem smanjenja uporabe SZB za 25–50% do 2030. godine, kao što je predviđeno strategijama „Od polja do stola“ i „Bioraznolikost“, koje su ključni dijelovi „Zelene revolucije“ (Europska komisija, 2021). Ove strategije, implementirane kroz Direktivu 2009/128/EK, imaju za cilj smanjiti ovisnost o kemijskim SZB, povećati održivost poljoprivrednih praksi i smanjiti negativan utjecaj pesticida na životinje, ljude i okoliš.

Kao odgovor na ograničenja povezana s konvencionalnim SZB, znanstvena zajednica intenzivno istražuje alternative koje bi mogle ponuditi održivija rješenja u zaštiti bilja. U tom kontekstu, biljni derivati i bioaktivni spojevi privlače veliku pažnju kao potencijalni kandidati za razvoj biopesticida. Obećavajuće tvari, kao što su ekstrakti biljaka i eterična ulja (EtU), pokazuju različita biološka svojstva, uključujući antimikrobno djelovanje, i potencijalno mogu zadovoljiti potrebu za visokim prinosima uz održavanje ekološke ravnoteže. Unatoč obećavajućim rezultatima u laboratorijskim uvjetima, razvoj učinkovitih botaničkih SZB suočen je s izazovima kada se primjenjuju u poljskim uvjetima, gdje je njihova djelotvornost slabija u odnosu na konvencionalna SZB (Broniarek-Niemiec i sur., 2023; Ayilara i sur., 2023). Dostupnost i učinkovitost biopesticida ograničene su i nedostatkom standardiziranih protokola i registracije tih proizvoda, problemima sa skladištenjem, cijenom i kvalitetom, što dodatno otežava njihovu širu primjenu.

Biljne bolesti, uzrokovane fitopatogenim mikroorganizmima, predstavljaju značajan rizik za globalnu biljnu proizvodnju. Obzirom na sve veću zabrinutost zbog razvoja otpornosti patogena na dostupna SZB i ograničene mogućnosti upotrebe konvencionalnih SZB, alternativa u obliku bioaktivnih spojeva postaje nužnost za osiguranje dugoročne održivosti poljoprivrednih sustava.

Jedan od značajnijih patogena masline (*Olea europaea* L.) je Gram-negativna bakterija *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, koja uzrokuje bolest masline pod nazivom rak masline (ranije nazivana šuga masline). Ova bakterija rasprostranjena je u gotovo svim maslinarskim regijama svijeta, gdje uzrokuje ozbiljne ekonomske gubitke zbog direktnih i indirektnih šteta u nasadima masline (Tegli i sur., 2017). Rak masline jedna je od biljnih bolesti čije je suzbijanje zahtjevno jer bakterija većinom ulazi kroz oštećenja na biljnim organima. Kada bakterija inficira biljno tkivo, dolazi do stvaranja tumorastih izraslina koje postupno narušavaju zdravlje i kondiciju biljke. Kronična priroda bolesti, dodatan je razlog važnosti sprječavanja prijenosa ove bolesti masline, a posebice u maslinarskim regijama Mediterana, koje zbog specifičnih klimatskih uvjeta izrazito pogoduju ne samo uzgoju maslina već i prijenosu bakterije (Cardoni i Mercado-Blanco, 2023; Rahi i sur., 2020). Klimatski uvjeti, poput visoke vlage zraka, oborina i blagih zima, predstavljaju optimalne uvjete za razvoj i prijenos bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, čime se u takvim uvjetima bolest može teže suzbijati (Moretti i sur., 2017; Sanzani i sur., 2012).

Unatoč brojnim istraživanjima usmjerenima ka razvoju učinkovitih metoda suzbijanja uzročnika raka masline, konvencionalne kemijske mjere i dalje su vodeći alat, odnosno vodeća mjera u zaštiti maslina. Obzirom da je upotreba antibiotika u biljnoj proizvodnji većinom zabranjena na području Europe i šire, ali i zbog ograničenog izbora SZB zbog nedostatka selektivnih baktericidnih preparata, suzbijanje bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* oslanja se na upotrebu SZB na bazi bakarnih spojeva. Međutim, upotreba bakarnih preparata također predstavlja ekološki izazov zbog rizika od kontaminacije okoliša i mogućeg razvoja rezistentnih sojeva bakterije prilikom česte primijene ove aktivne tvari koje je utvrđeno među populacijama *P. syringae* pv. *actinidiae* u voćnjacima kivija u Italiji, Japanu i Koreji (Cesari i sur., 2023; Cameron i Sarojini, 2014). Sukladno tome, potrebno je pronaći održive alternative koje uključuju bioaktivne spojeve kao što su biljni ekstrakti i EtU. Primjena biljnih tvari u biološkim (botaničkim) pripravcima, zajedno s održivom poljoprivrednom praksom, može predstavljati ekološki prihvatljivo rješenje za borbu protiv fitopatogenih mikroorganizama u raznim usjevima i nasadima. U literaturi se nerijetko navodi da biljne tvari jesu učinkovite protiv fitopatogenih bakterija, ali da njihov antibakterijski učinak može ovisiti o vrsti ili soju bakterije kod koje se primjenjuju (Schollenberger i sur., 2018; Bozkurt i sur., 2020; Benali i sur., 2020; Muthee-Gakubi i sur., 2016). Obzirom da je u nekoliko istraživanja utvrđena značajna razlika u razini virulentnosti fitopatogenih sojeva bakterija, to predstavlja dodatan ograničavajući čimbenik brze evaluacije i primjene biljnih SZB u stvarnim uvjetima proizvodnje (Scortichini, 2020; Caballo-Ponce i sur., 2018; Moretti i sur., 2017). Primjerice, u istraživanju autora Moretti i sur. (2017) utvrđena je raznolikost u razini virulentnosti između sojeva *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, gdje su talijanski sojevi pokazali jaču virulentnost u usporedbi sa sojevima

izoliranima iz maslinika na istočnom obalnom području južnog Jadrana, a koji obuhvaća dijelove Hrvatske, Bosne i Hercegovine i Crne Gore.

Obzirom na rasprostranjenost biljne bolesti raka masline, sojevi *P. savastanoi* pv. *savastanoi* iz nekih mediteranskih regija, čak i onih sa stoljetnom tradicijom proizvodnje i uzgoja masline, među kojima je i Hrvatska, iznenađujuće su slabo istraženi i opisani prema biokemijskim svojstvima unutar sheme LOPAT i molekularne identifikacije, te je razlika u njihovom biokemijskom profilu i razini virulentnosti, većinom nepoznata. Zahvaljujući razvoju molekularnih dijagnostičkih metoda, patovari vrste *P. savastanoi* tek se odnedavno mogu jasno diferencirati. Ipak, ponekad se izolati identificiraju i na temelju biokemijskih svojstava, za što se koriste testovi definirani unutar sheme LOPAT. U skladu s tom shemom, sojevi *P. savastanoi* koji su izolirani iz simptomatičnog biljnog materijala masline, negativni su na proizvodnju levana (L) i oksidaze (O), pektolitičku aktivnost (P) i proizvodnju arginin dehidrogenaze (A), dok izazivaju hipersenzitivnu reakciju na listovima duhana (T) (Mugnai i sur., 1994; Lelliot i sur., 1966). Novija istraživanja sugeriraju da takva identifikacija i klasifikacija sojeva fitopatogenih bakterija potencijalno nije dovoljno precizna jer za molekularno potvrđene sojeve *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, ponekad dolazi do odstupanja od očekivanih rezultata testova opisanih u shemi LOPAT (Turco i sur., 2022; Tsuji i sur., 2017; Marchi i sur., 2005; Hall i sur., 2004).

Intenzitet simptoma koji nastaju infekcijom stabala s fitopatogenom bakterijom *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, može ovisiti i o fiziološkom stanju biljaka i sortimentu (Abuamsha i sur., 2023; Zucchini i sur., 2023; Licciardello i sur., 2023; Vuletin Selak i sur., 2022., Ramos i sur., 2012; Sisto i sur., 2004; Young, 2004). Stoga se kao jedna od mjera sprječavanja pojave ili prijenosa zaraze, predlaže uzgoj tolerantnih ili otpornih sorti masline. Na obalnom dijelu Hrvatske uzgajaju se mnogobrojne introducirane i autohtone sorte masline, a prisutnost zaraze je primijećena na većini sorata (Vuletin Selak i sur., 2022; Godena i sur., 2012; Žužić, 2008). Ipak, za veliki broj hrvatskih autohtonih sorti masline nisu provedena istraživanja u kojima je utvrđena njihova razina osjetljivosti na rak masline.

Osim sortimenta, za suzbijanje *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, u literaturi se navodi antimikrobni potencijal nusproizvoda i otpada od poljoprivredne proizvodnje, poput biljne i biljne vode masline (Yakhlef i sur., 2018; Ciafardini i Zullo, 2003). Biljna voda masline je tekuća frakcija ostataka koji nastaje tijekom dvofazne ili trofazne ekstrakcije ulja iz ploda masline te čini dio sastava komine masline, a bogata je biljnim metabolitima poput polisaharida, ugljikohidrata topivih u vodi, proteina i lipida koji, zajedno s makro- i mikro hranjivim elementima, mogu stimulirati rast mikroorganizama. Suprotno tome, a temeljem sadržaja izrazito visokih koncentracija hidrofilnih fenolnih spojeva, biljna voda je poznatija po svojstvu

fitotoksičnosti i antimikrobnom potencijalu (Morillo i sur., 2009). Neadekvatno odlaganje komine masline ili aplikacija u usjeve i nasade u „netretiranom“ obliku, predstavljaju ekološki rizik. Naime, u netretiranom obliku može dovesti do zagađenja tla i podzemnih voda kada se odlaže u za to neprikladna i nepredviđena mjesta (Xie i sur., 2021; Obied i sur., 2007).

Kako bi se ublažilo zagađenje okoliša „divljim“ odlaganjem komine, istraživanja su usmjerena na iskorištavanje njezinog potencijala u različitim sektorima, među kojima je i testiranje antimikrobnog potencijala. Utvrđeno je da komina, odnosno biljna voda, obiluje fenolnim spojevima od kojih neki, poput hidroksitirozola (HTyr), imaju izraženo antimikrobno djelovanje (Yakhlef i sur., 2018; Brenes i sur., 2011).

U nekoliko istraživanja je primijećeno da biljne vode dobivene od prerade ploda različitih sorti masline, pokazuju razlike u antimikrobnom učinku protiv fitopatogenih mikroorganizama. Pretpostavka je da su te razlike rezultat specifičnog kemijskog sastava i koncentracija fenolnih spojeva koji čine njihov kemijski profil (Yakhlef i sur., 2018; Obied i sur., 2007; Ciafardini i Zullo, 2003).

Osim potencijala biljne vode masline, jak antibakterijski potencijal utvrđen je i za terpeneske, odnosno fenolne spojeve koji čine kemijski profil EtU i biljnih ekstrakata. U literaturi se u tom smislu ističu EtU od biljnih vrsta svrstanih u porodicu usnača (Lamiaceae), s naglaskom na vrste koje pripadaju rodovima *Mentha*, *Thymus*, *Origanum*, *Salvia*, *Mellisa*, itd. EtU su složene tekuće smjese kompleksnih kemijskih spojeva, koji najvećim udjelom pripadaju skupini terpenoida (Wińska i sur., 2019). Za takve spojeve je svojstvena lipofilnost, što im omogućava lakši prolazak kroz staničnu membranu mikroorganizama, prema kojima mogu imati toksične učinke (Camele i sur., 2021). Stoga, EtU predstavljaju obećavajuće alternativne aktivne tvari koje bi se mogle integrirati u formulacije SZB nove generacije. U mnogobrojnim istraživanjima utvrđena je njihova učinkovitost kod skupine Gram-negativnih vrsta bakterija, kojima pripada i uzročnik raka masline *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Utvrđeno je i da antibakterijski učinak značajno ovisi o koncentraciji specifičnih spojeva koji čine kemijski profil pojedinih EtU, što potencijalno može pojednostaviti identifikaciju sortimenta biljnih vrsta koje u dovoljnim koncentracijama sadrže tvari s antibakterijskim djelovanjem (Sánchez-Hernández i sur., 2023; Bozkurt i sur., 2020; Benali i sur., 2020; Grul'ová i sur., 2020; Hsouna i sur., 2019; Muthee-Gakubi i sur., 2016).

U usporedbi s EtU od sortimenta vrsta roda *Mentha* koje sadrže niže koncentracije mentona, kod sorte *Mentha* × *piperita* 'Chocolate' utvrđena je visoka koncentracija mentona, što je uzrokovalo i jače antibakterijsko djelovanje kod Gram-negativne fitopatogene bakterije *P. syringae* pv. *syringae* (Schollenberger i sur., 2018). Međutim, koncentracija komponenti u kemijskom profilu EtU od iste biljne vrste, može značajno varirati ovisno o klimatskim uvjetima

i tehnologiji uzgoja, genetici, fiziološkom stanju biljaka i rokovima berbe za ekstrakciju EtU (Schollenberger i sur., 2018).

1.1. Hipoteze i ciljevi rada

H1: Temeljem promjera razvijenih tumorastih izraslina na mjestima inokulacije bakterije, autohtone sorte masline bit će manje osjetljive na rak masline u odnosu na introducirane sorte masline.

C1: Izolacija uzročnika bolesti iz proizvodnih nasada te njegova identifikacija i karakterizacija.

C2: Utvrditi osjetljivost autohtonih sorti masline na rak masline.

H2: Odabrana eterična ulja, biljne vode i njihove komponente, imat će antibakterijski učinak na uzročnika raka masline *in vitro*.

C1: Odrediti inhibitorne koncentracije aktivnih tvari na rast bakterije *in vitro*.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Bolesti biljaka uzrokovane bakterijama

Iako više od stotinu vrsta fitopatogenih bakterija čini tek manji dio ukupnog broja svih poznatih bakterija, njihova uloga u biljnoj proizvodnji ima značajan negativan ekonomski i agronomski utjecaj (Muthee Gakuubi i sur., 2016; Schloss i Handelsman, 2004). U fitopatogene vrste bakterija ubrajaju se vrste koje pripadaju Gram-negativnoj skupini bakterija, a uključuju vrste koje pripadaju rodovima: *Xanthomonas*, *Rhizobium* (prije *Agrobacterium*), *Pseudomonas*, *Xylella* i *Erwinia*. Neke od fitopatogenih vrsta bakterija, uzrokovale su devastirajuće posljedice u biljnoj proizvodnji širom svijeta. Navedena skupina fitopatogenih bakterija inficira širok spektar biljaka domaćina, uključujući zeljaste i drvenaste biljne vrste. Posljedice njihove zaraze su od velikog značaja prema ekonomski važnim usjevima i nasadima. Skupina Gram-pozitivnih vrsta fitopatogenih bakterija je slabije zastupljena, ali predstavljaju jednako značajnu prijetnju biljnoj proizvodnji. Te vrste fitopatogenih bakterija najčešće pripadaju rodovima: *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* i *Rhodococcus* (Muthee Gakuubi i sur., 2016).

U literaturi se kao najštetnije vrste fitopatogenih bakterija, navode bakterije koje pripadaju kompleksu vrsta *Pseudomonas syringae*, zatim *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium radiobacter*, kao i sojevi roda *Xanthomonas* te *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Mansfield i sur., 2012). Primjerice, fitopatogene bakterije roda *Xanthomonas* uzrokuju više od 350 bolesti na oko 400 biljnih vrsta domaćina, što dodatno naglašava njihovu rasprostranjenost i potencijal za značajne ekonomske gubitke (Catara i sur., 2021; Timilsina i sur., 2020).

Ono što čini ove bakterije izrazito štetnima i otpornima na obrambene mehanizme biljaka domaćina, jesu njihovi specifični čimbenici virulentnosti. Ključni mehanizmi koji sudjeluju u virulentnosti fitopatogenih bakterija su proizvodnja toksina, sustavi komunikacije između stanica bakterija (eng. *Quorum Sensing*, QS), te signalizacijski sustavi dvokomponentne transdukcije (eng. *Two-Component Signal Transduction system*, TCST), koji bakterijama omogućuju prilagodbu i preživljavanje u različitim uvjetima (Kraepiel i Barny, 2016; Cerboneschi i sur., 2016; Mole i sur., 2007). Navedeni čimbenici omogućavaju bakterijama da nadvladaju prirodne obrambene mehanizme biljaka te sposobnost razgradnje spojeva koje biljke proizvode kako bi se zaštitile od infekcija, što rezultira uspješnom kolonizacijom i širenjem unutar domaćina. Bakterije su ujedno i pokretljiviji mikroorganizmi koji adhezijom ostvaruju infekciju i lakše se šire u biljnom tkivu domaćina (Lovelace i sur., 2023).

Jedan od važnijih čimbenika patogeneze fitopatogenih bakterija je njihova sposobnost manipulacije signalnih putova hormona kod biljaka domaćina. Sintezom fitohormona ili fitohormonima sličnih spojeva, poput citokinina i auksina, vrste poput *R. radiobacter* i *P. savastanoi* pv. *savastanoi* osiguravaju pristup izvorima energije poput ugljika i dušika, koje iskorištavaju za svoj rast i prijenos unutar biljke domaćina. Istovremeno, takve interakcije dovode do razvoja patoloških simptoma poput nekontrolirane diobe stanica, izraslina i tumora na zaraženoj biljci, što narušava fiziološku funkciju biljke (Mole i sur., 2007).

Još jedan primjer manipulacije obrambenih mehanizama je opisan kod vrste *P. syringae*. Ova vrsta fitopatogene bakterije proizvodi fitotoksin koronatin. Koronatin je spoj koji omogućuje bakteriji da uspješno kolonizira biljku tako da oponaša djelovanje hormona jasmonične kiseline. Jasmonična kiselina koju sintetizira biljka, sudjeluje u mehanizmu obrane biljke od napada biljojeda i nekrotrofskih fitopatogena. Međutim, bakterije poput *P. syringae* proizvode koronatin kako bi preusmjerile taj obrambeni odgovor biljke u svoju korist. Naime, proizvodnjom koronatina bakterije inhibiraju sintezu salicilne kiseline u biljkama domaćinima i tako izbjegavaju imunološki odgovor biljke i nesmetano se šire kroz tkivo domaćina. Salicilna kiselina je fitohormon koji je od ključnog značaja za obranu biljke domaćina od zaraze biotrofskim i hemibiotrofskim organizmima (Gupta i sur., 2020; Zheng i sur., 2012). Fitopatogene bakterije uglavnom se svrstavaju u hemibiotrofske organizme, što znači da prolaze kroz dva ključna stadija u svom životnom ciklusu. Prvi stadij podrazumijeva inicijalnu kolonizaciju živog tkiva biljke domaćina, nakon čega mogu nastaviti svoj rast i prijenos u mrtvom biljnom tkivu. Takva strategija bakterijama omogućuje dugotrajnije preživljavanje u raznim uvjetima okoliša. Međutim, postoje iznimke unutar ove klasifikacije. Primjerice, vrsta *R. radiobacter* za uspješnu infekciju i prijenos zahtijeva isključivo živo tkivo biljke domaćina, što znači da nije u mogućnosti preživjeti ili kolonizirati mrtvo biljno tkivo (Kraepiel i Barny, 2016). Kompleksni mehanizmi adaptacije i patogeneze fitopatogenih bakterija, razlog su što standardne metode suzbijanja ponekad ne zadovoljavaju željene učinke u biljnoj proizvodnji.

Sukladno prethodno navedenom, zaštita bilja od zaraze fitopatogenim bakterijama koje uzrokuju ozbiljne gubitke prinosa i kvalitete biljnih proizvoda, jedan je od kompleksnijih izazova u suvremenoj poljoprivredi. Problematika je dodatno naglašena zbog njihove neujednačene pojavnosti, teškoća u provođenju preciznog monitoringa i prognoze pojave bolesti te kronične prirode nekih bakterijskih bolesti. Osim toga, zaraze se ponekad sporo razvijaju, ali su nerijetko njihove posljedice dugotrajne i devastirajuće (Mikiciński i sur., 2012).

Procjena stvarnih gubitaka prinosa nastalih od zaraze fitopatogenim bakterijama je otežana zbog mnogobrojnih varijabli koje mogu utjecati na biljku domaćina i virulentnost sojeva bakterije. Međutim, procjenjuje se da sve biljne bolesti uzrokuju 10–16% gubitka u globalnoj

biljnoj proizvodnji, što na godišnjoj razini predstavlja ekonomske gubitke veće od milijardu eura (Martins i sur., 2018; Muthee Gakuubi i sur., 2016; Strande i Scott, 2004).

Razina štete koju fitopatogene bakterije nanose usjevima i nasadima, ovisi o nizu epidemioloških i bioloških čimbenika. Jedan od čimbenika koji utječe na intenzitet zaraze i sposobnost bakterije da uspješno inficira biljku domaćina je virulentnost. Virulentnost se često definira kao sposobnost patogenog mikroorganizma da nadvlada obrambene mehanizme biljke domaćina. Dodatno, fitopatogene bakterije inficiraju biljku domaćina kao endofiti (bakterije ulaze u biljna tkiva biljke domaćina) ili kao epifiti (bakterije inficiraju biljku s površine biljnih organa). Neovisno o mjestu i načinu infekcije, na zaraženim biljkama mogu uzrokovati širok raspon simptoma, uključujući klorozu, nekrozu, tumore, lezije i mozaičnost listova. Navedeni simptomi mogu značajno inhibirati normalan rast i razvoj biljke domaćina, što dovodi do smanjenja prinosa i kvalitete sirovine. Dodatno, latentne ili asimptomatske infekcije predstavljaju još jedan izazov u zaštiti bilja od fitopatogena. Takve infekcije mogu dugo ostati neprepoznate, što bakterijama omogućuje da se prenose bez vidljivih simptoma i da uzrokuju ozbiljne ekonomske gubitke u kasnijim fazama vegetacije ili starenjem biljke (Chouhan i sur., 2017; Arrebola i sur., 2011; Quesada i sur., 2010; Liu i sur., 2008). Stoga, pravovremeno prepoznavanje i suzbijanje fitopatogenih bakterija zahtijeva integrirani pristup koji uključuje iscrpna znanstvena istraživanja epidemiologije fitopatogena, razvoj novih tehnologija za dijagnostiku, te učinkovitije i ekološki prihvatljive metode suzbijanja. Učinkovito suzbijanje fitopatogenih bakterija dodatno je komplicirano činjenicom da mnoge fitopatogene bakterije posjeduju mehanizme prilagodbe na različite uvjete okoliša, kao i sposobnost brzog razvoja otpornosti na učestalu primjenu aktivnih tvari SZB s istim ili sličnim mehanizmom djelovanja (Lovelace i sur., 2023; Chouhan i sur., 2017). Zbog toga su inovativna rješenja poput biopesticida u sve većem fokusu znanstvenika. Takav pristup može smanjiti primjenu konvencionalnih SZB i pridonijeti održivijoj biljnoj proizvodnji.

2.2. Bakteriozni rak masline (uzročnik: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)

Kompleks vrsta *P. syringae* obuhvaća oko 15 vrsta bakterija i više od 60 patovara, koji čine 13 filogenetskih skupina (Gomila i sur., 2017; Berge i sur., 2014; Ichinose i sur., 2013). Većina sojeva unutar kompleksa *P. syringae* prepoznati su kao fitopatogeni ili su izolirani iz agroekosustava. Iako su neki sojevi izolirani iz staništa koja nisu povezana s poljoprivrednim aktivnostima, najveći interes u istraživanjima imaju oni koji utječu na proizvodnju ekonomski važnih usjeva i nasada (Morris i sur., 2022). Jedna od fitopatogenih vrsta unutar kompleksa je i vrsta *P. savastanoi*, koja broji nekoliko patovara. Najčešće je pojedini patovar bakterije ove vrste patogen prema specifičnoj biljnoj vrsti koja je domaćin, uključujući samonikle i kultivirane biljne vrste (Caballo-Ponce i sur., 2017).

Jedan od patovara koji je svrstan u vrstu *P. savastanoi* je *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, uzročnik raka masline (*Olea europaea* L.). Maslina je globalno rasprostranjena kultura, s posebnim značajem za zemlje koje su obuhvaćene Mediteranom poput Italije, Španjolske, Grčke, Hrvatske, Portugala, Slovenije i ostale zemlje, gdje nasadi masline zauzimaju značajne uzgojne površine. Maslinovo ulje, koje se dobiva preradom ploda, ima iznimnu prehrambenu vrijednost zahvaljujući visokom udjelu polifenola, od kojih neki imaju i antioksidativna svojstva pa su često povezani s pozitivnim učincima na zdravlje (Lanza i Ninfali, 2020). Međutim, kao i druge biljne vrste, maslina je podložna brojnim biotskim i abiotskim stresovima, što može negativno utjecati na prinos i kvalitetu ploda te organoleptičke i biokemijske karakteristike ulja (Godena i sur., 2012).

Rak masline, uzrokovan bakterijom *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, predstavlja ozbiljan izazov za maslinare. Iako je ova bolest poznata već stoljećima – prema zapisima Teofrasta iz 4. stoljeća prije Krista – i dalje je jedna od težih biljnih bolesti za suzbijanje. Rak masline se smatra kroničnom bolesti koja uzrokuje direktne i indirektne štete na maslinama, uključujući oštećenje grana i debla, smanjenje prinosa i kvalitete ploda, otežava održavanje uzgojnog oblika stabala, te čini biljke osjetljivijima na druge fitopatogene (Cardoni i Mercado-Blanco, 2023). Razvoj učinkovitih strategija za suzbijanje bolesti zahtijeva jasno razumijevanje mehanizama kojima *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ostvaruje svoju patogenost, što uključuje niz različitih molekularnih i fizioloških procesa koji bakteriji omogućavaju kolonizaciju biljke domaćina (Añorga i sur., 2020; Moretti i sur., 2019; Moretti i sur., 2017).

Dosadašnja istraživanja patogenosti vrsta *Pseudomonas* usmjerena su na patogenezu prema zeljastim biljnim vrstama, dok su interakcije s drvenastim biljkama domaćinima, poput masline, tek nedavno počele privlačiti veći interes istraživača. Tako je utvrđeno da mehanizmi koji reguliraju patogenost *P. savastanoi* pv. *savastanoi* uključuju sintezu fitohormona, poput

indol-3-octene kiseline (eng. *Indole-3-acetic acid*, IAA) i citokinina, zatim komunikaciju između stanica bakterija, sintezu cikličkog di-guanozin monofosfata (eng. *cyclic di-guanosine monophosphate*) te regulaciju homeostaze kalcija unutar stanica bakterije (Añorga i sur., 2020; Moretti i sur., 2019; Caballo-Ponce i sur., 2017; Castañeda-Ojeda i sur., 2017; Cerboneschi i sur., 2016; Tegli i sur., 2011; Alfano i sur., 2000).

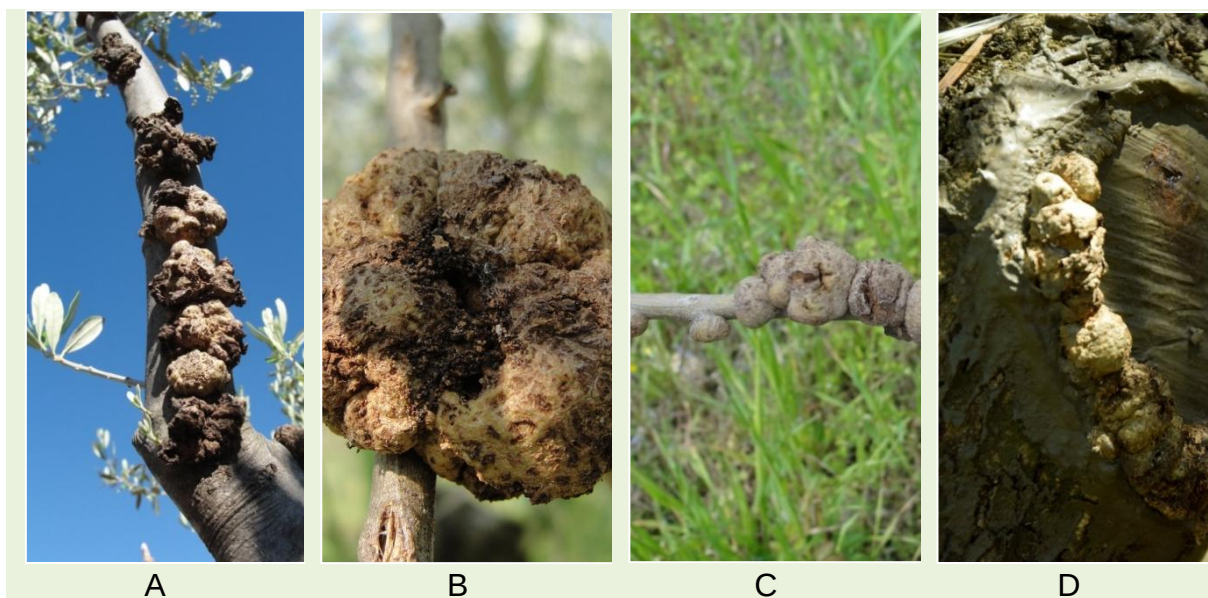
Dugi niz godina identifikacija različitih patovara vrste *P. savastanoi* temeljila se na taksonomskim ključevima i simptomatologiji na specifičnoj biljnoj vrsti. Za razlikovanje vrsta roda *Pseudomonas*, koristila se metodologija u kojoj se izolati bakterije karakteriziraju prema testovima koji su opisani unutar LOPAT sheme. LOPAT shema obuhvaća pet biokemijskih testova koji se primjenjuju za identifikaciju bakterijskih izolata, osobito za vrste roda *Pseudomonas*. Ovom metodom testiraju se izolati bakterije na sposobnost sinteze levana (L), aktivnost oksidaze (O), prisutnost pektolitičkih enzima (P), aktivnost arginin dehidrogenaze (A) te izazivanje hipersenzitivne reakcije na listovima duhana (T) (Lelliot i sur., 1966). Unatoč tome što se i danas koristi u dijagnostici fitopatogenih vrsta, suvremene metode poput PCR-a sve se češće koriste u dijagnostici zbog veće preciznosti u diferencijaciji vrsta i patovara. Primjenom LOPAT sheme, za izolate vrste *P. savastanoi* iz tkiva masline karakteristična je odsutnost sinteze levana, oksidaze, pektolitičkih enzima i arginin dehidrogenaze, dok izazivaju hipersenzitivnu reakciju na duhanu (Lelliot i sur., 1966). Iako je ova metoda dugo vremena smatrana pouzdanim alatom u dijagnostici, istraživanja ukazuju na određena ograničenja. Uočena su odstupanja od tipičnog obrasca LOPAT sheme, što je potaknulo znanstvenu zajednicu na preispitivanje njezine točnosti (Turco i sur., 2022; Tsuji i sur., 2017; Marchi i sur., 2005; Hall i sur., 2004).

Suvremene molekularne metode, poput sekvenciranja gena i PCR-a, značajno su unaprijedile mogućnosti za precizno razlikovanje patovara vrste *P. savastanoi*, kao što su *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *P. savastanoi* pv. *fraxini* i *P. savastanoi* pv. *nerii* (Moreno-Pérez i sur., 2020; Tegli i sur., 2010; Gori i sur., 2012). Molekularne metode omogućile su razlikovanje sojeva na osnovi njihove genetske strukture, što ih čini preciznijim i točnijim dijagnostičkim alatom od testiranja biokemijskih svojstava izolata bakterije LOPAT shemom. Ipak, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjela genetska raznolikost između patovara iste vrste. U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da se sojevi *P. savastanoi* i *P. syringae* s drvenastih biljaka domaćina, genetski razlikuju od sojeva koji inficiraju zeljaste biljke domaćine, a genetska raznolikost tih sojeva može varirati i ovisno o njihovom geografskom podrijetlu (Rahi i sur., 2020; Baltrus i sur., 2017; Lamichhane i sur., 2014).

2.3. Patogeneza uzročnika raka masline *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

P. savastanoi pv. *savastanoi* je epifitska Gram-negativna vrsta bakterije koja kolonizira površinu biljnih organa masline poput listova, grana i izbojaka. Kao epifit preživljava na površini biljke bez uzrokovanja razvoja simptoma kod biljke domaćina. Obzirom da je oportunistički patogen, u endofitsku fazu životnog ciklusa ulazi kada se stvore povoljni uvjeti za zarazu. Bakterija *P. savastanoi* pv. *savastanoi* može inficirati biljku ulaskom u biljno tkivo na mjestima gdje se nalaze prirodni otvori ili rane koje su nastale od otpadanja listova, mehaničkim oštećenjima, mrazom, visokim temperaturama, ali i prisutnosti drugih bolesti poput paunovog oka (Sanzani i sur., 2012). Nakon što bakterija uđe u tkivo biljke domaćina, simptomi zaraze manifestiraju se kao tumoraste izrasline koje se najčešće formiraju na granama i izbojima, iako se mogu pojaviti i na deblu, listovima i plodovima masline (Teviotdale i Krueger, 2004).

Mehanizam kojim *P. savastanoi* pv. *savastanoi* uzrokuje nastanak tumora povezan je s proizvodnjom fitohormona rasta, uključujući auksine i citokinine. Ovi hormoni induciraju hiperplaziju, odnosno nekontroliranu i prekomjernu diobu stanica, što rezultira hipertrofijom, odnosno povećanjem volumena biljnog tkiva (Teviotdale i Krueger, 2004). Razvoj simptoma raka masline dovodi do vidljivih oštećenja na biljkama u obliku izraslina, koje mogu značajno narušavati zdravstveno stanje biljke (Slika 1).



Slika 1. Hipertrofirano biljno tkivo kao simptom infekcije bakterijom *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, uzročnik raka masline na maslini (*Olea europaea* L.). Simptomi bolesti raka masline na A) skeletnoj grani, B i C) grančicama i D) na mjestu reza višegodišnje grane.

Također, navodi se da je moguć prijenos inokuluma aerosolom i do 500 metara udaljenosti tijekom olujnog vremena, što može ugroziti veliki dio maslinika ukoliko je i samo jedno stablo masline zaraženo (Young, 2004). Iako se simptomi najčešće formiraju na mjestima ulaska bakterije u biljno tkivo domaćina, utvrđeno je da se *P. savastanoi* pv. *savastanoi* može prenositi sistemski na kraće udaljenosti od primarnog mjesta zaraze (Rhimini i sur., 2018; Carboneschi i sur., 2016; Marchi i sur., 2009). Zbog toga je važno naglasiti da zaštita od bolesti raka masline započinje već u rasadničarskoj proizvodnji jer se reznice za proizvodnju sadnog materijala moraju uzimati isključivo sa zdravih stabala masline (Katalinić i sur., 2009). U novije vrijeme, a zahvaljujući napretku molekularne biologije, razumijevanje interakcija između bakterija i biljaka domaćina, dodatno je unaprijeđeno. Razumijevanje molekularnih mehanizama kojima bakterije reguliraju svoj prijelaz iz epifitske u endofitsku fazu životnog ciklusa, kao i uloga sinteze fitohormona i signalnih molekula u procesu zaraze, ključni su za razvoj novih i učinkovitijih metoda suzbijanja bolesti (Añorga i sur., 2020).

2.4. Mjere suzbijanja bakterioznog raka masline uzrokovanog *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

2.4.1. Varijabilnost osjetljivosti sorti masline na uzročnika bakterioznog raka

Intenzitet i pojavnost biljnih bolesti značajno ovisi o klimatskim uvjetima, fiziološkom stanju i sortimentu biljaka domaćina (Vuletin Selak i sur., 2022; Godena i sur., 2012; Sisto i sur., 2001). Obzirom na to, uzgoj sortimenta koji je nastao genetskim modificiranjem biljaka predstavlja jedno od obećavajućih mjera za suzbijanje biljnih bolesti. Unatoč tome, uzgoj genetski modificiranih biljaka, podložan je strogom javnom nadzoru zbog zabrinutosti potrošača u vezi s mogućim rizicima i njihovom neprirodnom selekcijom, što ih čini slično kontroverzima kao i upotreba konvencionalnih SZB (Strange i Scott, 2005). Stoga se kao prirodnija alternativa smatra selekcija i uzgoj autohtonog sortimenta masline koje bi mogle sadržavati gene za tolerantnost ili otpornost na uzročnike bolesti masline.

Istraživanjima je utvrđeno da su mnoge talijanske, španjolske, portugalske, grčke i hrvatske sorte masline osjetljive na bakteriozni rak masline. Primjerice, za talijanske sorte Leccino, Pendolino i Frantoio, utvrđeno je da su osjetljive na rak masline, s varijacijama u razini osjetljivosti temeljem intenziteta simptoma (Godena i sur., 2012; Iannotta i sur., 2005). Konkretno, za sortu Frantoio smatra se da je jako osjetljiva, Pendolino srednje osjetljiva, a Leccino tolerantnija sorta na rak masline (Vuletin Selak i sur., 2022; Bjeliš, 2005; Mijušković, 1999). Osim talijanske sorte Leccino, hrvatske autohtone sorte masline također posjeduju određenu tolerantnost na rak masline. Tako je Istarska bjelica, kao jedna od autohtonih sorti iz Istre, pokazala visoku tolerantnost na bakteriozni rak u Istri (Žužić, 2008; Bjeliš, 2005; Mijušković, 1999). Osim primijećene tolerantnosti u nasadima, istraživanje Pasković i sur. (2020) ukazuje na to da Istarska bjelica, osim visokog proizvodnog potencijala, ima i visok sadržaj ukupnih fenola u biljnom tkivu, uključujući fenolne spojeve za koje je utvrđeno antibakterijsko djelovanje *in vitro*. Navedeno naglašava mogućnost korištenja takvih sorti u održivom maslinarstvu, uz smanjenje ovisnosti o konvencionalnim SZB. Stoga, testiranje otpornosti sortimenta masline na bakteriozni rak, osobito autohtonih sorti, ima važan ekonomski i ekološki značaj. Autori Vuletin Selak i sur. (2022) navode da su introducirane sorte poput sorte Coratina, Favarol i Leccino najtolerantnije na ovu bolest, dok je hrvatska sorta Lastovka grupirana zajedno sa najosjetljivijima sortama poput sorte Frantoio, Santa Catarina i Chemlali. Nadalje, hrvatska sorta Drobница kategorizirana je kao srednje osjetljiva sorta zajedno s introduciranim sortama Pendolino, Picholine marocaine i Taggiasca. Sukladno slabijoj osjetljivosti nekih hrvatskih autohtonih sorti masline na rak masline, nužno je provesti

daljnja istraživanja osjetljivosti autohtonog sortimenta, jer pronalazak otpornih sorti može imati važnu ulogu u budućim programima oplemenjivanja.

2.4.2. Konvencionalna sredstva za zaštitu bilja

Obzirom da je zaštita višegodišnjih nasada od zaraze fitopatogenim bakterijama vrlo ograničena na konvencionalna SZB, nedvojbeno je da se ovom problemu treba pronaći primjereno i učinkovito rješenje. Naime, za njihovo suzbijanje se više od 100 godina koriste preparati na bazi bakarnih spojeva. Iako se bakar kao aktivna tvar u voćarstvu često koristi kao SZB, ono osigurava samo preventivnu zaštitu. Osim toga, preparati na bazi bakra mogu biti fitotoksični prema kulturi, što se ponekad primjećuje u nasadima jabuke (Mikiciński i sur., 2012). Upotreba antibiotika smatra se učinkovitim načinom suzbijanja fitopatogenih bakterija, ali je njihova primjena u biljnoj proizvodnji uglavnom strogo ograničena ili potpuno zabranjena. U proizvodnim nasadima gdje je njihova upotreba dozvoljena, raste zabrinutost zbog pojave rezistentnosti sojeva bakterija horizontalnim prijenosom gena (Verhaegen i sur., 2023). Tek se ponegdje za suzbijanje fitopatogenih bakterija primjenjuju SZB na bazi aktivne tvari AI-fosetil (Mikiciński i sur., 2012).

Na tržištu Republike Hrvatske, trenutno su registrirana tri SZB koja imaju dozvolu za primjenu u nasadima masline kod bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, i to dva sredstva na bazi bakarnih spojeva (bakarni hidroksid i bakarni oksiklorid) i jedan koji sadržava antagonističku bakteriju *Bacillus amyloliquefaciens* (prije *subtilis*) soj QST 713 (fis.mps.hr). Proizvodi na bazi bakra mogu se koristiti i učinkoviti su kod fitopatogenih bakterija koje nisu razvile otpornost na bakar, međutim, učestala primjena bakra može imati negativne učinke na korisne populacije mikroorganizama i biljke domaćine, a u posljednjih nekoliko godina u voćnjacima je potvrđena i prisutnost rezistentnih populacija fitopatogenih bakterija roda *Pseudomonas* na bakarna SZB (Cesari i sur., 2023; Cameron i sur., 2014).

U strategije zaštite bilja, važno je uzeti u obzir da populacije fitopatogenih vrsta bakterija koloniziraju biljno tkivo zajedno s korisnim vrstama bakterija. Prisutnost korisnih mikroorganizama na biljkama može utjecati na razinu virulentnosti i intenzitet simptoma zaraze fitopatogenih vrsta, kao i na osjetljivost biljke domaćina na zarazu. Smatra se da je interakcija između fitopatogenih i korisnih bakterija važan čimbenik koji utječe na fiziološko stanje biljaka domaćina. Međutim, povezanost biljnog mikrobioma i zdravlja biljaka još uvijek nisu potpuno razjašnjene (Mina i sur., 2020; Buonauro i sur., 2015). Stoga će daljnja istraživanja ovih kompleksnih interakcija omogućiti razvoj ekološki prihvatljivije strategije u zaštiti bilja. Obzirom na suživot korisnih i fitopatogenih mikroorganizama, nužan je razvoj i primjena ekološki prihvatljivih i prema korisnim organizmima, selektivnih SZB.

Nedostatci i rizici povezani s upotrebom konvencionalnih SZB i odsutnost selektivnosti sredstava prema korisnim mikroorganizmima, ubrzali su evaluaciju potencijala i učinkovitosti aktivnih tvari biljnog porijekla za razvoj biopesticida i biostimulatora obrambenih mehanizama

biljaka domaćina, s neizravnim ciljem poboljšanja održivosti agroekosustava. U literaturi je za mnoge biljne spojeve utvrđen antimikrobni potencijal kod gospodarski i ekonomski značajnih fitopatogenih gljiva i bakterija (El-Abbassi i sur., 2017; Medina i sur., 2011).

2.4.3. Biološka sredstva za zaštitu bilja

Kako bi se odgovorilo na zahtjeve suvremenog društva i kako bi se smanjili negativni učinci koji se dovode u vezu s korištenjem konvencionalnih SZB, razvoj SZB na bazi alternativnih aktivnih tvari, poput onih biljnog porijekla, smatraju se važnim čimbenikom u biljnoj proizvodnji (Fenibo i sur., 2021).

Sredstva koja se smatraju alternativom konvencionalnim SZB, nazivaju se biološka SZB. Biološka SZB su proizvodi koji sadrže aktivne tvari poput mikroorganizama i/ili fitokemikalija, a ovisno o formulaciji mogu se podijeliti na mikrobiološke i biokemijske biopesticide (Kumar i sur., 2021; Fenibo i sur., 2021). Ova sredstva se koriste u zaštiti bilja protiv štetnika i bolesti. Prema literaturi, biološka SZB se na globalnom tržištu pesticida nalaze u udjelu oko 5%. Najveći udio biopesticida čine formulacije na bazi mikroorganizmima, iako se smatra da bi biokemijski biopesticidi mogli prevladati na tržištu zbog karakterističnog šireg spektra i mehanizama djelovanja te potencijalno veće stabilnosti formulacija pri skladištenju u usporedbi s mikroorganizmima. Osim toga, učinkovitost dostupnih pripravaka na bazi mikroorganizama, često ne zadovoljava željeni učinak kod suzbijanja bolesti u nasadima za komercijalnu proizvodnju (Broniarek-Niemiec i sur., 2023; Martins i sur., 2018).

Biokemijski, odnosno botanički biopesticidi sredstva su čije se formulacije najčešće sastoje od tvari biljnog porijekla, poput EtU, biljnih ekstrakata i sekundarnih biljnih metabolita (Fenibo i sur., 2021). Iako biljke koriste urođene mehanizme obrane protiv zaraze fitopatogenima, fenolne komponente kao sekundarni metaboliti biljaka, imaju važnu ulogu u obrani biljaka od fitopatogena. Fenoli su spojevi u formi sastavnica staničnih stijenki biljaka, a djeluju poput barijere kojom se sprječava ulazak fitopatogena u stanice biljnog tkiva i napad biljojeda (Cerboneschi i sur., 2016). Osim toga, utvrđeno je da fenolni spojevi mogu biti toksični prema bakterijama te im je svojstven mehanizam djelovanja kojim narušavaju stabilnost stanične membrane kod bakterija (Wińska i sur., 2019). Osim fenolnih spojeva, nedavno su, među ostalim ekološki prihvatljivim spojevima, borna kiselina i njezin derivat fenilboronska kiselina testirani kod nekoliko fitopatogena (bakterija i gljiva) *in vitro* i *in vivo* (Martinko i sur., 2022a; 2022b; 2022c). Spojevi na bazi bora bogati su biološkim aktivnostima. Ovi tragovi elemenata, kao i spojevi na bazi bora, prirodno su prisutni u mnogim biljkama, uključujući gotovo sve voćarske biljne vrste. Folijarna primjena *in vivo* dovela je do uspješnog inhibiranja rasta bakterije *P. syringae* pv. *tomato*. Zanimljivo je da je ovaj učinak postignut bez oštećenja na tretiranim biljkama rajčice u rasponu doza od 0,5 do 1,0 mg/mL.

Prema Wińska i sur. (2019), mnogobrojnim EtU od raznih biljnih vrsta koje pripadaju rodovima *Salvia*, *Lavandula*, *Thymus*, *Cinnamomum*, *Mentha*, itd., svojstveno je antibakterijsko djelovanje. Osim EtU, u literaturi je utvrđen antibakterijski potencijal, otpadnih

biljnih proizvoda, odnosno nusproizvoda koji se nakupljaju u izrazito velikim količinama u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji. Zbog visokog udjela fenolnih spojeva u otpadnim proizvodima i nusproizvodima, smatraju se bazenom bioaktivnih spojeva s antimikrobnim djelovanjem. U tom smislu se ističu ostatci i nusproizvodi prerade ploda maslina i grožđa, te kore, kože i lupine ploda voća i povrća (Gonçalves i sur., 2021).

2.5. Bioaktivni spojevi

Svako živo biće, od bakterije do biljke, sintetizira kemijske spojeve kako bi osigurale svoj rast, razvoj i opstanak. U širem smislu, kemijski spojevi biljaka su bioaktivni spojevi svrstani u dvije glavne skupine, a to su primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti su spojevi koje biljke proizvode za svoj rast i razvoj, a obuhvaćaju ugljikohidrate, aminokiseline, proteine i lipide. Sekundarne biljne metabolite čine raznolike skupine spojeva za koje se smatra da imaju važnu ulogu u interakciji biljke s okolišem i drugim organizmima. Jedna od uloga sekundarnih metabolita je stimulacija otpornosti biljaka prema stresovima, čime osiguravaju njihovu prilagodbu ili preživljavanje u nepovoljnim uvjetima okoliša (Azmir i sur., 2013). Dodatno, sekundarni biljni metaboliti štite biljku od štetnih utjecaja UV zraka, od zaraze fitopatogenima, djeluju repelentno i toksično prema štetnicima, te im je svojstven alelopatski utjecaj prema kompetitivnoj flori. Osim toga, sekundarni metaboliti pridonose mirisu, boji i okusu biljaka i biljnih proizvoda. Jedan od značajnijih izvora sekundarnih biljnih metabolita je organski otpad, zbog čega se može iskorištavati u proizvodnji boja/pigmenata, bistimulatora i biognojiva, suplemenata za ishranu životinja, biogoriva, itd. (Kumar i Goel, 2019).

Sekundarni metaboliti se u biljkama sintetiziraju neovisno o fenološkoj fazi rasta, stoga se smatra da nemaju direktnu funkciju u rastu biljaka. Sekundarni metaboliti biljaka su mnogobrojni te kemijski i strukturno raznoliki, a u širem smislu se mogu podijeliti na terpene i terpenoide ($\approx 25\,000$), alkaloida ($\approx 12\,000$) i fenolne spojeve ($\approx 8\,000$) (Azmir i sur., 2013). Ovi brojevi označavaju procijenjeni broj do sada identificiranih spojeva unutar svake od navedenih skupina. Temeljem strukture molekula u spoju, bioaktivni spojevi se mogu dodatno podijeliti na monoterpene, seskviterpene, triterpene, saponine, steroide, flavonoide i poliketide.

2.5.1 Terepeni i terpenoidi

Jedna od skupina sekundarnih biljnih metabolita ili bioaktivnih spojeva su terpeni, odnosno terpenoidi. Terpeni su spojevi koji pripadaju skupini nezasićenih ugljikovodika. Terpenoidi su terpeni koji tijekom enzimatskih procesa gube metilnu skupinu koja se zamjenjuje s molekulama kisika. Visok sadržaj terpenskih spojeva je karakterističan za EtU. Tako se EtU uglavnom sastoji od lipofilnih, vrlo hlapljivih i slabo topivih spojeva u vodi. Formula kojom se izražava kemijska struktura terpenskih spojeva je $(C_5H_8)_n$, a najjednostavniji terpeni spojevi su monoterpeni, koji nastaju spajanjem dvije skupine izoprena. Glavni terpenoidi koji čine kemijski sastav EtU su mono- ($C_{10}H_{16}$) i seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$), a u nekima su prisutni i diterpeni ($C_{20}H_{32}$). Sinteza terpenoida se odvija u citoplazmi i plastidima biljnih stanica i to metil-D-eritritol-4-fosfatnim putem, mevalonskom kiselinom i shikimik kiselinskim putem. Aromatski spojevi u EtU su rjeđe prisutni od terpena, iako čine veliki udio u kemijskom sastavu ulja. Tako je komponenta eugenol, visoko koncentrirana u EtU od klinčića (*Syzygium aromaticum*), dok je trans-cimet aldehid glavni sastojak EtU od cimeta (*Cinnamomum verum*). Zanimljivo je da komponente ulja poput timola mogu djelovati toksično na biljke. Tako se u literaturi navodi da tretiranje biljaka timolom može poremetiti stanje vode u biljkama, što je utvrđeno temeljem povećanog sadržaja hormona stresa ABA (apscizinska kiselina). Ovaj poremećaj uzrokovan je zatvaranjem puči i nakupljanjem topline u listovima, što posljedično dovodi do slabijeg intenziteta fotosinteze i u konačnici do smrti biljnih stanica (Verdeguer i sur., 2020).

2.5.2 Fenolni spojevi

Fenolni spojevi biljaka mogu se podijeliti na jednostavne fenole, fenolne kiseline, flavonoide, kumarine, stilbene, hidrolizabilne i kondenzirane tanine, lignane i lignine. Fenoli se uglavnom proizvode shikimik kiselinskim putem iz L-fenilalanina i L-tirozina, a sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na aromatski prsten. Zbog prisutnosti vodikovog atoma fenolne hidroksilne skupine, biljni fenoli su slabe kiseline, iako jesu slični alkoholima s alifatskom strukturom. Za fenolne spojeve je utvrđeno da imaju nekoliko važnih funkcija u biološkim procesima biljaka, uključujući i mehanizme obrane, dok u manjim koncentracijama u kojima se prirodno nalaze u hrani, pokazuju blagotvorne učinke na zdravlje ljudi (Kumar i Goel, 2019). Fenolni spojevi se odlikuju raznolikim bioaktivnim svojstvima, te u visokim koncentracijama mogu biti toksični prema različitim organizmima tako što uzrokuju oštećenja staničnih membrana. Sukladno tome, u literaturi se ističe potencijalna primjena EtU i fenolima bogatih biljnih ekstrakata za primjenu u zaštiti bilja (Kumar i sur., 2021).

2.5.3 Alkaloidi

Alkaloidi predstavljaju raznoliku skupinu prirodnih organskih spojeva, pretežno biljnog podrijetla. Strukturno, alkaloidi sadrže barem jedan dušikov atom u heterocikličkom prstenu. Mnogi alkaloidi posjeduju snažno farmakološko djelovanje na ljudski organizam, a njihove funkcije u biljkama su raznolike. Primjerice, alkaloidi mogu služiti kao obrambeni mehanizmi protiv napada biljojeda i zaraze fitopatogena ili kao regulatori rasta. Neki od najpoznatijih alkaloida su kofein, nikotin, kinin i atropin, koji se koriste u različite svrhe, od analgetika i stimulansa do lijekova za srčane bolesti i antimalarika (Facchini, 2001). Zbog svoje biološke aktivnosti, alkaloidi su često toksični u većim koncentracijama, ali u kontroliranim dozama predstavljaju izvor lijekova i spojeva za biološka istraživanja (Ziegler i Facchini, 2008). Mnogi alkaloidi posjeduju antimikrobna svojstva, što ukazuje na njihov potencijal za primjenu u zaštiti bilja (Elshafie i sur., 2023).

2.6. Eterična ulja (EtU) i njihove komponente

Ispunjavanje zahtjeva za visokim prinosima, osiguravanje održivosti biljne proizvodnje, smanjenje primjene konvencionalnih SZB i sprječavanje pojave rezistentnosti na često korištene aktivne tvari, predstavlja značajne izazove u biljnoj proizvodnji (Fenibo i sur., 2021). Kao obećavajuće zamjene ili dodatci konvencionalnim SZB, smatraju se EtU i komponente koji čine kemijski profil EtU, a za koje je utvrđeno da posjeduju određenu razinu toksičnosti prema fitopatogenim mikroorganizmima (Wińska i sur., 2019).

U literaturi se EtU definiraju kao sekundarni biljni metaboliti koji biljkama daju miris i okus, a mogu se ekstrahirati iz više od 17 500 biljnih vrsta, dok se tek oko 300 biljnih vrsta koristi za komercijalnu proizvodnju EtU. EtU se iz biljaka mogu ekstrahirati na nekoliko načina, a najčešće se koriste metode hidrodestilacije, destilacije vodenom parom, suhe destilacije ili hladno prešanje biljaka (Wińska i sur., 2019). EtU čine kompleksni kemijski spojevi poput terpenoida, alkohola, fenola, aldehida, ketona, estera, kiselina i mnogih drugih organskih spojeva. Ovi spojevi se u biljkama sintetiziraju u citoplazmi stanice i plastidima putem malonske kiseline, mevalonske kiseline i metil-D-eritrol-4-fosfata. Kemijski profil EtU najčešće sadrži dvije do tri komponente u najvećem udjelu (20–70%), zajedno s mnogobrojnim komponentama koje su prisutne u značajno manjem udjelu. Komponenta ili komponente koje čine najveći udio u smjesi, određuju kemotip EtU (Verdeguer i sur., 2020; Schollenberger i sur., 2018).

Od mnogobrojnih spojeva u EtU, terpenoidi su prepoznati kao molekule od najvećeg interesa za testiranje antimikrobnog djelovanja (Verdeguer i sur., 2020; Wińska i sur., 2019). Međutim, udio komponenti u EtU može biti varijabilan već kod iste biljne vrste, što ovisi o tehnologiji uzgoja, klimatskim čimbenicima, genetici i fiziološkom stanju biljaka tijekom uzgoja (Schollenberger i sur., 2018).

Za EtU dobivena od biljnih vrsta koje pripadaju porodici usnača (Lamiaceae) i rodova *Mentha*, *Melissa*, *Salvia*, *Thymus* i *Origanum*, utvrđen je jak *in vitro* učinak kod brojnih ekonomski važnih fitopatogenih vrsta bakterija (Badawy i Adbelgaleil, 2014; Vasinauskiene i sur., 2006), ipak, Wińska i sur. (2019) navode da EtU od vrsta *Mentha* i *Salvia* slabije djeluju u odnosu na EtU od vrsta roda *Thymus*. Međutim, utvrđeno je da antibakterijski učinak EtU ovisi i o kultivaru od kojega je dobiveno ulje pa je tako u nekim istraživanjima zabilježen jednak ili jači antibakterijski učinak EtU dobivenog od specifičnog kultivara vrste, u usporedbi s djelovanjem antibiotika, iako većina EtU od drugih sorti iste vrste nije bila djelotvorna. U literaturi se navodi da učinak EtU može značajno varirati ovisno i o patovaru iste vrste bakterije, te da se potencijal biljnih tvari može razlikovati ovisno o metodi koja se koristi za određivanje

antibakterijskog djelovanje *in vitro* (Bozkurt i sur., 2020; Schollenberger i sur., 2018; Balouiri i sur., 2016; Gormez i sur., 2015).

Svojstvo lipofilnosti i hidrofobnosti, omogućuje prodiranje molekula EtU kroz staničnu membranu mikroorganizama, što može dovesti do lize stanica i inhibicije sinteze proteina, koagulacije citoplazme, povećanja propusnosti stanične membrane i promjena pH reakcije u stanicama bakterije (Camele i sur., 2021; Kröl i sur., 2013). Međutim, antimikrobna aktivnost biljnih tvari nerijetko je učinkovitija kod Gram–pozitivnih vrsta bakterija, a pretpostavka je da je to posljedica prisutnosti dodatne polisaharidne vanjske membrane kod Gram–negativnih bakterija koja vjerojatno ograničava ulazak molekula u stanicu (Wińska i sur., 2019; Nazzaro i sur., 2013; Hyldgaard i sur., 2012).

Antimikrobni potencijal EtU testiran je kod mnogobrojnih mikroorganizama, uključujući gljive i bakterije koje uzrokuju bolesti kod ljudi, životinja i biljaka, a osim toga svrhu nalaze u industriji hrane gdje se mogu koristiti kao konzervansi za očuvanje svježine plodova (Najmi i sur., 2023; de Almeida i sur., 2023; D'Agostino i sur., 2019). Smatra se da EtU predstavljaju alternativu SZB kao tvari koje bi mogle biti lako prihvaćene za primjenu od strane javnosti. Razlog tome je tradicionalna upotreba ljekovitih i aromatičnih biljaka u alternativnoj medicini diljem svijeta (Benali i sur., 2020).

2.6.1. Antibakterijski potencijal eteričnih ulja (EtU) i njihovih komponenti

Antimikrobni potencijal EtU definiran je sadržajem različitih organskih spojeva, a posebice terpenoida, od kojih se ističu komponente eukaliptol, limonen, linalool, menton, mentol, pulegon, linalil acetat i karvon D. Obzirom na širok spektar bioloških aktivnosti i potencijal kao alternativa konvencionalnim SZB, EtU predstavljaju bazen bioaktivnih tvari koja bi se potencijalno mogla koristiti protiv fitopatogenih mikroorganizama (de Sousa Barros i sur., 2015).

Uloga terpenskih spojeva u djelotvornosti EtU povezana je s njihovim koncentracijama u uljima. Primjerice, utvrđeno je da ulja s većim sadržajem mentona i mentola imaju izraženo antibakterijsko djelovanje. Da je koncentracija ovih komponenti u EtU ključna za njihovo antibakterijsko djelovanje, odnosno postizanje toksičnih učinaka kod bakterija, sugeriraju i autori Wińska i sur. (2019) i Schollenberger i sur. (2018). Iako biljka može biti iste vrste, kemotip označava specifičnu vrstu koja se odlikuje dominantnim spojevima, odnosno komponentama koje čine njezin kemijski profil, odnosno kemotip označava specifičnu "varijantu" vrste/podvrste koje imaju iste morfološke karakteristike (koje se odnose na oblik i strukturu), ali proizvodi različite količine kemijskih sastojaka u svojim EtU (Clarke, 2008).

Antibakterijsko djelovanje često je utvrđeno primjenom EtU od vrsta roda *Thymus* i *Origanum* (kemotipovi timol i/ili karvakrol). Ta ulja najčešće čine izomerni spojevi, timol i karvakrol, za koje je svojstven jak antibakterijski potencijal (Camele i sur., 2019). Iako ulja od vrsta roda *Mentha* pokazuju slabiji antibakterijski potencijal u usporedbi s uljima bogatima timolom i karvakrolom, određena istraživanja pokazuju da ulje od paprene metvice (*Mentha × piperita*) može biti jednako ili učinkovitije od antibiotika kod fitopatogenih vrsta bakterija. Tako su primjerice, Gormez i sur. (2015) i Schollenberger i sur. (2018), utvrdili da tretiranje bakterija s EtU od paprene metvice (kemotip menton), uzrokuje jaku inhibiciju rasta vrste *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *R. radiobacter* i *P. syringae* pv. *syringae*. EtU od paprene metvice jedno je od često istraživanih EtU, a zbog bogatstva kultivara koji pripadaju rodu *Mentha*, ovu skupinu bilja čini izuzetno zanimljivom za daljnja istraživanja, koja bi bila usmjerena pronalasku specifičnih kemotipova kako bi se iskoristio njihov puni biopesticidni potencijal.

Iako su pojedinačne komponente koje čine kemijski profil EtU od velikog značaja, literatura ukazuje na to da je antibakterijski potencijal EtU često ovisan o sinergijskom djelovanju s drugim komponentama u ulju (Caparrotta i sur., 2019; Sauer i sur., 2015). Tome u prilog ide istraživanje u kojemu je utvrđeno da EtU od vrsta *Mentha* u kombinaciji s uljima od drugih biljaka, mogu pojačati osjetljivosti mikroorganizama na antibiotike (Rathod i sur., 2017). Smatra se da je povećanje osjetljivosti bakterija prema primjeni antibiotika rezultat oštećenja staničnih membrana i poremećaja u stanicama bakterija do kojih dolazi kada se stanice

bakterije izlažu komponentama poput mentola, karvakrola i timola (Camele i sur., 2021; Bakkali i sur., 2008; Schelz i sur., 2006). Navedene komponente čine sastav EtU od vrsta *Mentha*, timijana (*Thymus vulgaris*), grčke kadulje (*Salvia fruticosa*), origana (*Origanum vulgare*), matičnjaka (*Melissa officinalis*) i mnoge druge vrste (Mikiciński i sur., 2012; Kokoskova i sur., 2011; Saad i sur., 2008; Vasinauskiene i sur., 2006).

Obzirom da EtU najvećim udjelom čine raznoliki terpenoidi, osim navedenih, antibakterijski potencijal je utvrđen primjenom geraniola, eugenola, β -felandrena, limonena, d-limonena, β -tujona, kamfora i karvona (Shaaban i sur., 2012). Ove komponente čine kemijski profil mnogih biljnih vrsta čija se ulja koriste u testiranju antimikrobnog potencijala, uključujući limun (*Citrus limon*), geranij (*Geranium* sp.), lavandu (*Lavandula* sp.), limunsku travu (*Cymbopogon citratus*) i dr. (Bakkali i sur., 2008). Za EtU od vrsta roda *Lavandula* utvrđeno je da, slično EtU od vrsta *Mentha*, imaju sposobnost smanjenja otpornosti bakterija na antibiotike (Tardugno i sur., 2019). Nadalje, jak antibakterijski potencijal utvrđen je kombiniranom primjenom ulja od vrsta roda *Thymus* i *Origanum* u nerazrijeđenom obliku (Vasinauskiene i sur., 2006). U istom istraživanju utvrđena je jača osjetljivost sojeva *Xanthomonas* u usporedbi sa sojevima roda *Pseudomonas* i *Erwinia*. Bakterije roda *Pseudomonas* često pokazuju otpornost prema antimikrobnim tvarima, uključujući antibiotike, što ih čini jednim od težih skupina bakterija za suzbijanje. Otpornost vrsta *Pseudomonas* na kemijske tvari poput antibiotika, djelomično se može pripisati kompleksnim mehanizmima adaptacije i horizontalnom prijenosu gena. Stoga je u nekim istraživanjima stavljen naglasak na razumijevanje mehanizama kojim različite koncentracije specifičnih komponenti mogu utjecati na antibakterijsku učinkovitost EtU prema otpornim sojevima bakterija (Papadopoulos i sur., 2006; Bouhdid i sur., 2008).

Potencijal korištenja EtU dodatno je naglašen zbog njihove djelotvornosti već pri vrlo niskim koncentracijama (Tablica 1), a niska minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) EtU od vrsta *Thymus* i *Origanum*, dodatno potvrđuje njihov snažan antibakterijski potencijal (Patel i sur., 2023; György i sur., 2023; Tarakanov i Dzhalilov, 2022; Grul'ová i sur., 2020; Bozkurt i sur., 2020; Brentini Santiago i sur., 2018; Vasinauskiene i sur., 2006).

Tablica 1. Popis eteričnih ulja (EtU) od različitih biljnih vrsta za koje je testiran antibakterijski potencijal kod fitopatogenih vrsta bakterija. Antibakterijski potencijal je izražen kroz vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), ukoliko nije prikazano drugačije.

Rod biljne vrste	Vrsta bakterije	MIK	Literatura
<i>Cinnamomum</i> , <i>Thymus</i> , <i>Origanum</i> , <i>Mentha</i> , <i>Syzygium</i> , <i>Lavandula</i> , <i>Achillea</i> , <i>Allium</i> , <i>Citrus</i> , <i>Elettaria</i> , <i>Citrus</i> , <i>Pimpinella</i> , <i>Foeniculum</i> , <i>Salvia</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> , <i>Curtobacterium</i> <i>flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	0,200–3200 µg/mL	Tarakanov i Dzhalilov, 2022.
<i>Thymus</i> , <i>Rosmarinus</i> , <i>Mentha</i> , <i>Laurus</i> , <i>Origanum</i> , <i>Ocimum</i> , <i>Salvia</i> , <i>Thymbra</i> , <i>Lavandula</i> , <i>Foeniculum</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>P.</i> <i>savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> , <i>P.</i> <i>savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>	nerazrijeđeno	Bozkurt i sur., 2020.
<i>Mentha</i>	<i>R. radiobacter</i>	10–12,500 µg/mL	Hsouna i sur., 2019.
<i>Tagetes</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseolicola</i> , <i>X.</i> <i>axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> , <i>P.</i> <i>savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	12,000–48,000 µg/mL	Muthee-Gakuubi i sur., 2016.
<i>Mentha</i> , <i>Cistus</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	190–780 µg/mL	Benali i sur., 2020.
<i>Ambrosia</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , <i>E.</i> <i>amylovora</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	4,00–1,500,000 µg/mL	Janačković i sur., 2022.
<i>Pteridium</i>	<i>E. amylovora</i> , <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	0,625–5,00 µg/mL	Bouchehouk i sur., 2019.
<i>Origanum</i>	<i>C. michiganensis</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> , <i>P. savastanoi</i> , <i>X.</i> <i>campestris</i>	100–10,000 µL/mL	Gruľová i sur., 2020.
<i>Boswellia</i> , <i>Canarium</i> , <i>Bursera</i> , <i>Commiphora</i> , <i>Hymenaea</i>	<i>R. radiobacter</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	0,20% (V/V)	Caparrotta i sur., 2019.
<i>Pogostemon</i> , <i>Amyris</i> , <i>Cinnamomum</i> , <i>Cedrus</i> , <i>Commiphora</i> , <i>Cupressus</i> , <i>Citrus</i> , <i>Boswellia</i> , <i>Citrus</i> , <i>Salvia</i> , <i>Thymus</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Zingiber</i> , <i>Abies</i> , <i>Melaleuca</i>	<i>Xyllela fastidiosa</i>	125–1000 µg/mL	Brentini Santiago i sur., 2018.
<i>Origanum</i> , <i>Acorus</i> , <i>Achillea</i> , <i>Carum</i> , <i>Mentha</i>	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>X.</i> <i>vesicatoria</i> , <i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Bacillus</i> sp.	nerazrijeđeno	Vasinauskiene i sur., 2006.
<i>Calamintha</i> , <i>Satureja</i>	<i>R. radiobacter</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>C.</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>Enterobacter</i> <i>intermedius</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>E.</i> <i>chrysanthemi</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P.</i> <i>corrugate</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P.</i> <i>syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>P.</i> <i>syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , <i>X. vesicatoria</i>	7,81–31,25 µg/mL	Gormez i sur., 2015.
<i>Carum</i> , <i>Ziziphora</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	nerazrijeđeno	Feizi i sur., 2023.
<i>Laurus</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	nerazrijeđeno i 1,25% (V/V)	Mamoucha i sur., 2023.
<i>Nepeta</i> , <i>Origanum</i>	<i>P. cichorii</i> , <i>P. syringae</i> , <i>X. perforans</i>	2,50–5,00% (V/V)	Patel i sur., 2023.
<i>Illicium</i> , <i>Juniperus</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Lavandula</i> , <i>Citrus</i> , <i>Cymbopogon</i> , <i>Mentha</i> , <i>Origanum</i> , <i>Pinus</i> , <i>Rosmarinus</i> , <i>Salvia</i> , <i>Abies</i> , <i>Gaultheria</i>	<i>P. tolaasii</i> , <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	0,02–>32 µg/mL zraka	Todorović i sur., 2016.
<i>Artemisia</i> , <i>Callistemon</i> , <i>Citrus</i> , <i>Cupressus</i> , <i>Myrtus</i> , <i>Origanum</i> , <i>Pelargonium</i> , <i>Rosmarinus</i> , <i>Syzygium</i> , <i>Schinus</i> , <i>Thuja</i> , <i>Vitex</i>	<i>R. radiobacter</i> , <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	350>1000 µg/mL	Badawy i Abdelgaleil, 2014.
<i>Citrus</i> , <i>Cymbopogon</i> , <i>Foeniculum</i> , <i>Pinus</i> , <i>Ocimum</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	0,12–7,81 µL/mL	Sauer i sur., 2015.

U prilog važnosti pojedinačnih komponenti u EtU, ide istraživanje Todorović i sur. (2016), gdje je jako antibakterijsko djelovanje utvrđeno na tretmanu EtU origana (kemotip karvakrol). Na navedenom tretmanu inhibicija rasta sojeva *Pseudomonas*, *Xanthomonas* i *Clavibacter*, postignuta je već pri koncentracijama od 0,02 i 0,32 µg/mL, dok je na tretmanima EtU *Lavandula*, *Citrus* i *Salvia* utvrđen slabiji antibakterijski učinak (MIK >0,32 µg/mL). Visok udio karvakrola (79%) u EtU vrtnog čubara (*Satureja hortensis*) i cis-piperiton epoksida (48,66%) u EtU od rahlocvjetne gorske metvice (*Calamintha nepeta*), ukazuju na visok antibakterijski potencijal navedenih EtU (Gormez i sur., 2015).

U usporedbi s fitopatogenim bakterijama koje pripadaju rodovima *Erwinia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter* i *Rhizobium*, nerijetko su MIK vrijednosti tretmana EtU veće kada se primjenjuju kod vrsta roda *Pseudomonas* (Patel i sur., 2023; Todorović i sur., 2016; Gormez i sur., 2015; Vasinauskiene i sur., 2006). Međutim, kao najaktivnije komponente EtU kod vrsta *Pseudomonas* ističu se EtU od vrsta roda *Thymus* i *Origanum*. Tako je u istraživanju Bozkurt i sur. (2020) utvrđeno da EtU od vrsta *Thymus* i *Origanum*, kemotipovi timol i karvakrol, dovode do značajne inhibicije rasta vrsta *Pseudomonas*, ali i drugih fitopatogenih bakterija *in vitro*. U istom istraživanju utvrđeno je da se antibakterijski učinak EtU razlikuje ovisno o patovaru. Autori utvrđuju da je djelovanje EtU *Thymus* i *Origanum* bilo izraženije kod patovara *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u usporedbi s učinkom kod *P. savastanoi* pv. *nerii*. To ukazuje na kompleksnost korištenja biljnih tvari u suzbijanju uzročnika bolesti i potrebu za istraživanjima koja bi bila usmjerena prema shvaćanju specifičnih bioloških mehanizama koji potencijalno uvjetuju razlike u osjetljivosti između sojeva bakterija na biljne spojeve.

Slično tome, u istraživanju Caparrotta i sur. (2019), utvrđen je slabiji antibakterijski učinak biljnih spojeva kod različitih vrsta fitopatogenih bakterija. U istom istraživanju je utvrđeno da ista koncentracija EtU različito djeluje kada se primjenjuje kod *P. savastanoi* u odnosu na učinak kod vrste *R. radiobacter*. Slično se navodi i u istraživanjima autora Brentini Santiago i sur. (2018) i Nazzaro i sur. (2013), gdje je primjena EtU od bosiljka, kadulje, ružmarina i mažurana, dovela do slabije inhibicije rasta testiranih sojeva koji pripadaju skupini Gram–negativnih vrsta bakterija, a uključuju vrste roda *Pseudomonas* i *Xylella*. Tako je primjenom EtU od muškatne kadulje (*Salvia sclarea*) utvrđeno da je EtU pokazalo antibakterijsko djelovanje, ali pri relativno visokoj koncentraciji od 500 µg/mL, kada je testirano kod vrste *X. fastidiosa*. Sukladno tome, ulje kadulje su autori kategorizirali kao sredstvo sa blagim antimikrobnim djelovanjem (Brentini Santiago i sur., 2018). Slično tome, u istraživanju Mikiciński i sur. (2012), primjenom EtU od kadulje, timijana i klinčića utvrđena je značajna inhibicija rasta fitopatogenih vrsta poput *R. radiobacter*, *E. amylovora*, *X. arboricola* pv. *corylina* i *X. arboricola* pv. *juglandis*, dok je slabiji učinak utvrđen kada su EtU testirana kod *P. syringae* pv. *syringae*.

Nadalje, primjenom EtU od kadife (*Tagetes minuta*), utvrđeno je jako djelovanje kod Gram-negativnih sojeva bakterija *Xanthomonas* i *Pseudomonas* (Muthee-Gakuubi i sur., 2016). U istraživanju je utvrđena visoka osjetljivost sojeva *Pseudomonas* na primjenu nerazrijeđenog EtU od kadife, čiji sastav karakteriziraju visoke koncentracije monoterpenskih i seskviterpenskih spojeva. Zanimljivo je da je dugotrajno djelovanje ovog ulja pokazalo povećanje inhibicije rasta bakterija i nakon 48 sati trajanja inkubacije. Slično je primijećeno i primjenom EtU od lovora (*Laurus nobilis*), koje je bilo selektivno prema Gram-pozitivnoj bakteriji *Bacillus subtilis*, s jačim antibakterijskim djelovanjem kod *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Mamoucha i sur., 2023). Navedena istraživanja sugeriraju da EtU od kadife i lovora posjeduju snažna antibakterijska svojstva kod problematičnih sojeva roda *Pseudomonas*, što je posebno zanimljivo obzirom da se jači antibakterijski učinci biljnih spojeva obično primjećuju kod Gram-pozitivnih vrsta bakterija.

Antibakterijski potencijal utvrđen je i za EtU od kineskog cimeta (*Cinnamomum cassia*) i origana, kod *P. savastanoi* pv. *glycinea* i *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, s vrijednostima MIK od 200 i 1600 µg/mL (Tarakanov i Dzhililov, 2022). Folijarna primjena ili tretiranje zaraženog sjemena soje s navedenim EtU, dovelo je do inhibicije zaraze više od 50%, bez primijećene fitotoksičnosti. Pretpostavka je da je djelovanje EtU rezultat toksičnosti komponenti cinamaldehyd i karvakrol. Nadalje, u istraživanju Bouchekouk i sur. (2019), antibakterijsko djelovanje kod tri ekonomski značajne fitopatogene bakterije, uključujući dvije vrste roda *Pseudomonas* (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* i *P. savastanoi* pv. *savastanoi*) utvrđeno je primjenom EtU od orlovske paprati (*Pteridium aquilinum*), kemotip linalool, u koncentracijama od 0,625 do 5,00 µL/mL, ovisno o vrsti bakterije.

Osim ljekovitih i aromatičnih biljaka, antibakterijski potencijal kod nekoliko sojeva Gram-negativnih fitopatogenih bakterija zabilježen je primjenom ulja od alergene korovne vrste, pelinolisnog limundžika (*Ambrosia artemisiifolia*) (Janačković i sur., 2022). Navedeno istraživanje sugerira mogućnost iskorištavanja prirodnih resursa, uključujući korovne vrste, a potencijalno i invazivne biljne vrste, kao izvor bioaktivnih spojeva koja bi se mogla koristiti u zaštiti bilja. EtU od masline, badema i neema također su pokazala antibakterijski potencijal, što ih čini potencijalnim kandidatima za daljnja testiranja kod fitopatogenih vrsta bakterija (Upadhyay i sur., 2010).

Iako se antibakterijski potencijal često pripisuje sinergiji mnogobrojnih i raznolikih komponenti unutar kemijskog profila ulja, istraživanje Sauer i sur. (2015) pokazalo je da EtU s jednostavnim kemijskim sastavom mogu imati izraženo antibakterijsko djelovanje, što ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima u kojima bi se utvrdilo koje komponente u EtU djeluju u sinergiji, ali i koje su potencijalni antagonisti. Važnost utvrđivanja odnosa komponenti, kao i

definiranja doza u potencijalnim formulacijama biopesticida, važno je zbog varijabilnosti kemijskog profila EtU. Naime, sastav EtU i koncentracije pojedinačnih komponenti u smjesi, značajno ovise o genotipu, klimatskim uvjetima, tehnologiji uzgoja i rokovima berbe (Schollenberger i sur., 2018). Osim toga, primjena EtU u nasadima i u godinama kada je inokulum bakterije u prirodi visok, dovodi u pitanje potencijalnu učinkovitost EtU protiv fitopatogena (Mikiciński i sur., 2012). Sukladno tome, naglašena je potreba za optimizacijom uzgoja i identifikacijom perspektivnih kultivara. Takva optimizacija mogla bi unaprijediti učinkovitost EtU te omogućiti njihovu kombiniranu primjenu s reduciranim dozama konvencionalnih SZB ili antibiotika, što bi moglo dovesti do učinkovitog suzbijanja uzročnika biljnih bolesti u nasadima. Standardizacija doza djelotvornih komponenti i formulacija koje uključuju kombinacije komponenti, mogla bi značajno ubrzati njihovu primjenu u poljoprivredi.

2.7. Antibakterijski potencijal biljnih ekstrakata

Zbog rizika od onečišćenja tla i vodnih resursa, nagomilavanje nusproizvoda u biljnoj proizvodnji i prehrambenoj industriji predstavlja ekološku opasnost. Iako su rizici povezani s neadekvatnim odlaganjem takvog otpada vrlo važni, njihovo održivo upravljanje kroz kružnu ekonomiju nije dovoljno implementirano. Ipak, određeni nusproizvodi poljoprivredne proizvodnje, poput stajnjaka i otpada biljnog podrijetla, iskorištavaju se za dobivanje biomase za proizvodnju bioenergije, kompostiranje i slično. Međutim, količina otpada koja se vremenom generira, zahtjeva proširenje njihove primjene i u drugim sektorima kako bi se minimizirao negativan utjecaj na okoliš (Nath i sur., 2023; Bouaziz i sur., 2005).

Komina masline predstavlja jedan od značajnijih nusproizvoda poljoprivredne i prehrambene proizvodnje. Komina nastaje kao nusproizvod prerade ploda masline tijekom ekstrakcije maslinovog ulja, a smatra se izrazito toksičnim biljnim nusproizvodom zbog visokih koncentracija fenolnih spojeva koji čine njezin kemijski sastav. Procjenjuje se da se u mediteranskim zemljama godišnje generira oko 6-7 milijuna tona nusproizvoda ekstrakcije maslinovog ulja (Feki i sur., 2006). Zabrinutost oko nusproizvoda ekstrakcije ulja, uključujući kominu, je dodatno naglašena njihovim neadekvatnim zbrinjavanjem zbog nedostatka odgovarajućih odlagališta. Stoga je naglašena potreba za njihovim održivim načinima gospodarenja, što podrazumijeva adekvatno zbrinjavanje i/ili potencijalnu prenamjenu ove sirovine. Sukladno tome, potencijalna primjena tretirane komine i sastavnih dijelova komine pronašla je svoje mjesto u zaštiti bilja, s naglaskom na potencijal suzbijanja fitopatogenih mikroorganizama (Yakhlef i sur., 2018).

Biljna voda masline prepoznata je kao nusproizvod s visokim sadržajem fenolnih spojeva kojima je svojstvena biološka aktivnost, a neki od spojeva su: hidroksitirozol (HTyr) glukozid, tirozol, kafeinska kiselina, verabaskozid, oleuropein, luteolin, kvercetin, apigenin, rutin i dr. (Yakhlef i sur., 2018; Obied i sur., 2007; Obied i sur., 2005). Međutim, velike količine ovih nusproizvoda predstavlja izazov vezan uz njihovo zbrinjavanje u maslinarskim regijama, gdje dovode do onečišćenja tla i vode kao posljedica toksičnosti visoko koncentriranih organskih spojeva, odnosno fenola (Yakhlef i sur., 2018). Korištenje komine u „netretiranom“ obliku se ne preporučuje upravo zbog visokog rizika od toksičnosti prema ljudima, životinjama i okolišu (Obied i sur., 2007).

Obzirom da količina fenolnih spojeva u biljnoj vodi može značajno varirati ovisno o uvjetima i trajanju skladištenja, potrebno je optimizirati njihovo skladištenje i rukovanje kako bi se očuvao sastav fenolnih spojeva kao i drugih korisnih svojstava. Sukladno tome, u istraživanju Feki i sur. (2006), utvrđeno je da skladištenje biljne vode masline, generirane nakon trofazne ekstrakcije maslinovog ulja, na 25 °C u mraku u trajanju od pet mjeseci, dovodi

do smanjenja koncentracije brojnih fenolnih spojeva, dok se količina spoja HTyr tijekom skladištenja povećava. Rezultati tog istraživanja sugeriraju i nameću potrebu za daljnjom optimizacijom skladištenja, s ciljem očuvanja željenog fenolnog sastava i bioaktivnog potencijala biljne vode masline.

Unatoč potencijalnim rizicima koji se dovode u vezu s zbrinjavanjem nusproizvoda ekstrakcije ulja, u nekoliko istraživanja utvrđeno je da posjeduje antimikrobna svojstva. Analizama kemijskog profila ekstrakata od različitih biljnih vrsta, utvrđena je prisutnost mnogobrojnih metabolita, a nerijetko visok sadržaj fenola s antimikrobnim djelovanjem (Amensour i sur., 2010; Russo i sur., 2022). U literaturi se navodi da koncentrirani bioaktivni spojevi u ekstraktima nusproizvoda ekstrakcije maslinovog ulja, mogu inhibirati rast bakterija *in vitro*, koji se može usporediti s antibakterijskim učinkom sredstava na bazi bakarnih spojeva (Yakhlef i sur., 2018; Krid i sur., 2011). Tako je u istraživanju Capasso i sur. (1995), utvrđen baktericidni učinak biljne vode kod fitopatogenih bakterija *P. savastanoi* pv. *savastanoi* i *Curtobacterium michiganensis* (Tablica 2).

U istraživanju Ciafardini i Zullo (2003), također je utvrđeno antibakterijsko djelovanje biljne vode masline. U navedenom istraživanju je za tretman od prerade ploda masline sorte Leccino, utvrđen antibakterijski potencijal kod *X. campestris*, bez primijećenih fitotoksičnih učinaka na biljku domaćina. Obzirom da je *X. campestris* bakterija koja se može prenositi sjemenom usjeva, nameće se potreba za identifikacijom tvari koje učinkovito djeluju protiv fitopatogena, a da istodobno ne utječu negativno na klijavost sjemena. Minimalna koncentracija koja je inhibirala rast bakterije *X. campestris* bila je 2500 µg/mL, a pretpostavka je da je antibakterijski učinak rezultat interakcije fenola s proteinima u stanicama bakterije, što je posljedično dovelo do njihove denaturacije.

Istraživanjem antibakterijskog djelovanja nusproizvoda ekstrakcije maslinovog ulja kod različitih sojeva fitopatogenih bakterija rodova *Erwinia*, *Pseudomonas* i *Clavibacter*, utvrđeno je da je antibakterijski učinak vjerojatno rezultat sinergije nekoliko sastojaka prisutnih u nusproizvodima, a potencijalno je učinak ekstrakata uvjetovan otapalom koje se koristi za dobivanje ekstrakata (Medina i sur., 2011). Primjerice, etil-acetatni ekstrakt biljne vode masline doveo je do jake inhibicije rasta *P. savastanoi* i *E. amylovora* kada je primijenjen u koncentraciji od 5 do 20%, dok je primjenom „netretirane“ biljne vode, utvrđeno da su minimalne koncentracije potrebne za inhibiciju rasta bakterije, od 10 do 20%, a ovisno o vrsti bakterije.

U literaturi se navodi da primjena biljne vode masline s visokim koncentracijama ukupnih fenola i sekundarnih metabolita poput oleuropeina, HTyr i Hy-4-O-glukozida može inhibirati rast bakterija, uključujući *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *Xanthomonas campestris* i *Bacillus subtilis* (Yakhlef i sur., 2018; Obied

i sur., 2007; Ciafardini i Zullo, 2003). Međutim, utvrđeno je da spoj oleuropein koji se često nalazi u ekstraktima masline, može inhibirati rast Gram–pozitivnih bakterija poput *Bacillus subtilis*, što sugerira da određeni fenolni spojevi, ovisno o koncentraciji, mogu biti toksični prema korisnim mikroorganizmima u ili na biljkama domaćinima. Sukladno tome, potrebno je uzeti u obzir selekciju pojedinačnih komponenti, koje bi se mogle koristiti kao baktericidi, a s ciljem očuvanja korisnih mikroorganizma (Ciafardini i Zullo, 2003).

Nadalje, antimikrobni učinak biljne vode masline djelomično je ovisan i o sorti masline od koje je ekstrahirano ulje, što može biti posljedica razlika kemijskog sastava i koncentracija fenolnih i drugih spojeva u ekstraktima, što je uvjetovano genotipom (Yakhlef i sur., 2018; Obied i sur., 2007; Ciafardini i Zullo, 2003). Obzirom da fenolni spojevi imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima biljaka i predstavljaju strukturne komponente staničnih stijenki za obranu biljaka protiv patogena (Obied i sur., 2007), pretpostavka je da genotipske razlike potencijalno utječu i na razinu osjetljivosti sortimenta masline na biljne bolesti.

Istraživanja ukazuju na to da ekstrakti nusproizvoda od prerade ploda masline sorti Frantoio, Mission, Taggiasca i Picual imaju izražena antimikrobna svojstva (Caballero-Guerrero i sur., 2022; Russo i sur., 2022). U istraživanju autora Krid i sur. (2011), primjenom biljne vode masline s visokim sadržajem fenolnih spojeva poput HTyr, tirozola, katehola, para-kumarinske i kafeinske kiseline, utvrđena je njihova učinkovitost kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi* na zaraženim sadnicama masline. U istom istraživanju utvrđena je jaka inhibicija razvoja simptoma bakterioznog raka masline na sadnicama masline sorte Chemlali, pri čemu je antimikrobni učinak biljne vode bio jači od tretmana bakrovim sulfatom u koncentraciji od 0,5%. Naime, dok je masa tumorastih izraslina bila smanjena za oko 50% na tretmanu bakarnim sulfatom, primjena biljne vode rezultirala je inhibicijom mase tumorastih izraslina većom od 50%. Autori istraživanja sugeriraju da je antimikrobni učinak biljne vode povezan s visokom koncentracijom HTyr u uzorku biljne vode masline. Prisutnost HTyr u nusproizvodima masline čine ih važnim obnovljivim alternativnim sredstvom za biološko suzbijanje uzročnika biljnih bolesti (Brenes i sur., 2011).

HTyr je fenolni spoj koji je prisutan u komini, odnosno u biljnoj vodi masline, maslinovom ulju i listovima masline, a za kojega je utvrđen varijabilan antimikrobni potencijal. Autori Pannucci i sur. (2019) su utvrdili da HTyr može djelovati inhibitorno na rast fitopatogenih bakterija poput vrsta *R. radiobacter* i *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Međutim, u istom istraživanju je HTyr rezultirao slabijim učinkom kada je primijenjen samostalno u najvećoj testiranoj koncentraciji (32,83 mg/g). Kombiniranom primjenom HTyr (30,4 mg/mL) s biljnom vodom masline, inhibicija bakterija je bila jača. Navedeno sugerira na potencijalnu sinergiju fenolnih spojeva u biljnoj vodi koja pojačavaju antibakterijski potencijal HTyr. Slabija

učinkovitost HTyr kod *P. savastanoi*, utvrđena je u istraživanju Medina i sur. (2011). Unatoč ekološkoj prihvatljivosti koja HTyr čini privlačnim za razvoj bioloških SZB, visoki troškovi proizvodnje većih količina HTyr, predstavljaju ograničavajući čimbenik testiranja učinaka u nasadima ili komercijalne primjene u poljoprivredi.

Razvoj održivih strategija korištenja biljne vode masline u biljnoj proizvodnji može smanjiti negativan utjecaj na okoliš. Osim toga, jasnim definiranjem koncentracija HTyr i drugih komponenti te određivanjem optimalnih omjera komponenata u ekstraktima, može dovesti do formuliranja alternativnih i ekološki prihvatljivijih SZB.

Osim biljne vode masline, različita istraživanja obuhvaćaju testiranje antimikrobnog potencijala ekstrakata od različitih biljnih resursa i poljoprivrednih nusproizvoda (Tablica 2). Primjerice, u istraživanju Ditsawanon i sur. (2022) utvrđeno je da ekstrakti nusproizvoda ratarske proizvodnje poput slame, kukuruzovine, ostataka soje i riže, uz ostatke iz proizvodnje kokosovog mlijeka i ljuske kikirikija, predstavljaju izvor mnogobrojnih antibakterijskih tvari. Testiranjem osjetljivosti fitopatogenih bakterija iz rodova *Xanthomonas*, *Pectobacterium* i *Rhizobium* na primjenu ekstrakata od navedenih nusproizvoda, utvrđena je inhibicija njihovog rasta, s naglaskom na *in vitro* selektivnost ekstrakta od slame koji nije djelovao toksično kod vrsta *B. subtilis* i *P. fluorescens*. Osim toga, Sánchez-Hernández i sur. (2023) utvrdili su izražen antibakterijski učinak ekstrakta od ginka (*Ginkgo biloba*) kod *P. syringae* pv. *pisi*, kada je tretman primijenjen u koncentraciji od 1500 µL/mL. Primjena ekstrakta ginka, potpuno je inhibirala zarazu biljaka graška i rajčice bakterijom *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, bez štetnih učinaka na klijanje i početni rast biljaka, što ukazuje na sigurnost i potencijal upotrebe biljnih ekstrakata u zaštiti bilja.

Tablica 2. Popis nusproizvoda i otpada biljne proizvodnje za koje je testiran antibakterijski potencijal kod fitopatogenih vrsta bakterija. Antibakterijski potencijal je izražen kroz utvrđene vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK), ukoliko nije drugačije označeno.

Skupina	Tretman	Rod biljne vrste	Vrsta bakterije	MIK	Literatura
Nusproizvodi i otpad od biljne proizvodnje	Nusproizvodi prerade ploda masline	<i>Olea</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	2500 µg/mL	Ciafardini i Zullo, 2003.
			<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> , <i>Clavibacter michiganensis</i>	5 × 10 ⁻⁴ mol/L	Capasso i sur., 1995.
			<i>Erwinia uredovora</i> , <i>E. toletana</i> , <i>E. amylovora</i> , <i>P. savastanoi</i> , <i>P. syringae</i> , <i>C. michiganensis</i>	10–20% (V/V)	Medina i sur., 2011.
			<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i>	100–500 µg/mL	Pannucci i sur., 2019.
	Ekstrakti biljnih nusproizvoda i otpada	<i>Abutilon</i> , <i>Achillea</i> , <i>Allium</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Beta</i> , <i>Camelina</i> , <i>Castanea</i> , <i>Cicer</i> , <i>Cichorium</i> , <i>Cucurbita</i> , <i>Cupressus</i> , <i>Echinochloa</i> , <i>Erigeron</i> , <i>Helianthus</i> , <i>Laurus</i> , <i>Lavandula</i> , <i>Melissa</i> , <i>Origanum</i> , <i>Phaseolus</i> , <i>Prunus</i> , <i>Rosa</i> , <i>Solanum</i> , <i>Sorghum</i> , <i>Thymus</i> , <i>Triticum</i> , <i>Vitis</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskense</i>	125->1000 µg/mL	Chiocchio i sur., 2023.
Biljni ekstrakti	Otpad od biljne i prehrambene proizvodnje	<i>Oryza</i> , <i>Zea</i> , <i>Saccharum</i> , <i>Glycine</i> , <i>Arachis</i> , <i>Cocos</i> , <i>Coffea</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>X. citri</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>R. rhizogenes</i>	***	Ditsawanon i sur., 2022.
	Vodeni i alkoholni ekstrakti	<i>Bergenia</i> , <i>Melissa</i> , <i>Capsicum</i> , <i>Sambucus</i> , <i>Phytolacca</i> , <i>Galega</i> , <i>Phellodendron</i> , <i>Rosa</i> , <i>Chelidonium</i> , <i>Morus</i> , <i>Spiraea</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	1000–10 000 µg/mL	Tarakanov i Dzhililov, 2022.
	Netretirani ekstrakt	<i>Annona</i>	<i>R. radiobacter</i>	15,6–31,3 µg/mL	Al-Baharwee i sur., 2023.
	Alkoholni ekstrakti	<i>Mentha</i> , <i>Cistus</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	190–780 µg/mL	Benali i sur., 2020.
	Hidroalkoholni ekstrakt	<i>Larrea</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>X. campestris</i>	3120–8000 µg/mL	Morales-Ubaldo i sur., 2021.
		<i>Ginko</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>X. vesicatoria</i>	500–1000 µL/mL	Sánchez-Hernández i sur., 2023.

2.8. Mehanizam djelovanja bioaktivnih tvari

Biljke se samostalno brane od zaraze fitopatogena kroz različite mehanizme, a koji uključujući i sintezu fitohormona kao što su salicilna kiselina, jasmonična kiselina, etilen, proteini i fenolni spojevi. Fenoli, kao glavne sastavnice staničnih stijenki, predstavljaju fizičku barijeru koja može sprječavati ulazak fitopatogena u stanice biljke domaćina (Mole i sur., 2007). Sekundarni biljni metaboliti pokazuju citotoksični učinak koji narušava funkcije stanične membrane ciljanih mikroorganizama, štetnika i biljaka. To podrazumijevaju sposobnost lize stanica, koagulacije citoplazme, istjecanje metabolita, poremećaje u sintezi ATP-a i enzima ATP-aze. Sekundarni metaboliti također mogu djelovati inhibitorno na mehanizme komunikacije između stanica bakterija (QS), čime mogu spriječiti stvaranje biofilma i smanjiti proteolitičku aktivnost bakterija, koja je neophodna za virulentnost fitopatogena (Bozkurt i sur., 2020; Grul'ová i sur., 2020).

EtU i njihove komponente, učinkoviti su kod bakterija zbog interakcije s enzimima u stanicama mikroorganizama, dok u većim koncentracijama mogu dovesti do denaturacije proteina. Ipak, antibakterijska učinkovitost EtU ovisi o koncentraciji i kemijskom sastavu ulja, a što je pod utjecajem genotipa, okolišnih uvjeta, tehnologije uzgoja i rokova berbe (György i sur., 2023). Hidrofobni spojevi ulja ponekad su slabije učinkoviti kada se koriste kod vrsta koje pripadaju skupini Gram–negativnih bakterija. Razlog tome je kompleksnija građa vanjske stanične membrane, koja može ograničiti ulazak kemijskih spojeva, iako nije potpuno nepropusna. Suprotno tome, vrste iz skupine Gram–pozitivnih bakterija, građene su od propusnije stanične membrane, a iste pokazuju veću osjetljivost na toksične učinke hidrofobnih spojeva EtU (Bozkurt i sur., 2020).

Osim što antibakterijski potencijal EtU ovisi o građi bakterija kod kojih se koristi, mehanizmi antimikrobnog djelovanja EtU mogu biti varijabilni i zbog položaja funkcionalnih skupina u molekulama spojeva. Stoga, učinkovitost EtU može biti različita prema različitim fitopatogenim mikroorganizmima. Osim navedenoga, učinak može biti varijabilan i na razini soja bakterije. Primjerice, primjenom EtU od paprene metvice (kemosip mentol), autori Hsouna i sur. (2019) utvrdili su razlike u vrijednostima MIK (od 0,01 do 12,5 mg/mL) kod različitih sojeva vrste *R. radiobacter*. U istom istraživanju je primjena EtU dovela do oštećenja stanične membrane bakterije već pri koncentraciji jednako $\frac{1}{2}$ MIK, dok je primjena tretmana *in vivo*, rezultirala potpunom inhibicijom zaraze biljaka rajčice s *R. radiobacter*.

Iako mnogi terpenški spojevi EtU, poput p-cimena, γ -terpinena i limonena, pokazuju slab antimikrobni učinak, utvrđeno je da p-cimen može pojačati antibakterijski učinak drugih komponenti u uljima, poput karvakrola, i to oštećivanjem stanične membrane bakterija i

inhibicijom pokretljivosti stanica bakterija, čime omogućuju lakši prodor toksičnih spojeva u stanice bakterija (Nazzaro i sur., 2013). Fenilpropani, uključujući eugenol, vanilin i cinamaldehyd, pokazuju značajan antibakterijski potencijal kod Gram–negativnih bakterija, a eugenol i izoeugenol se ističu kao komponente s izraženim antimikrobnim potencijalom (Hylgaard i sur., 2012). U kombinacijama, komponente koje dovode do oštećenja stanične membrane bakterija, mogu olakšati prodor drugim komponentama, čime se direktno može proširiti spektar djelovanja potencijalnih SZB na različite fitopatogene (Patel i sur., 2023).

2.9. Uloga bioaktivnih tvari u održivoj zaštiti bilja

U biljnoj proizvodnji je nagomilavanje nusproizvoda i otpada od prerade plodova neizbježno, a njihovo neadekvatno odlaganje predstavlja izvor onečišćenja tla te površinskih i podzemnih voda. Unatoč tome što odlaganje otpada predstavlja globalni problem, primjena praksi u skladu s održivom i kružnom ekonomijom upravljanja poljoprivrednim otpadom je relativno nedostatna i nedovoljno istraжена i potencirana. Upotreba ovih proizvoda iz perspektive zaštite okoliša i bilja, nedavno su postala jedna od važnijih tema istraživanja. Nusproizvodi i otpad uglavnom potječu iz glavnih poljoprivrednih sektora. Potencijalna primjena biljnih nusproizvoda i otpada, zahtjeva istraživanja koja bi, uz ublažavanje zagađenja, mogla otkriti raznolike mogućnosti njihove primjene u različitim disciplinama i poslovnim sektorima (Nath i sur., 2023; Bouaziz i sur., 2005). U literaturi se otpadni biljni proizvodi navode kao značajan izvor bioaktivnih tvari s antimikrobnim djelovanjem protiv patogena. U tom smislu su do sada istraženi nusproizvodi prerade ploda maslina i grožđa, te kože i lupine, koji su ostatci raznog voća i povrća u kućanstvima ili u prehrambenoj industriji (Nath i sur., 2023).

Iz perspektive zaštite i upravljanja okolišem, organski otpadni materijali bi se mogli koristiti za proizvodnju bioenergije, organskih gnojiva, poboljšivača tla i bioremedijatora, što bi bilo u skladu s načelima kružne ekonomije (Nath i sur., 2023). Osim toga, svoje mjesto nalaze i u zaštiti bilja jer često obiluju bioaktivnim spojevima koji predstavljaju izvor novih aktivnih tvari koje bi se mogle koristiti u formulacijama biopesticida (Chiocchio i sur., 2023; Ditsawanon i sur., 2022).

Na svjetskom tržištu, a pretežito u SAD-u, prisutno je nekoliko komercijalnih bioherbicidnih pripravaka na bazi EtU i njihovih sastojaka, a neki od njih su na bazi ulja klinčića (*Syzygium aromaticum*), čubara (*Satureja hortensis*), cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), crvene majčine dušice (*Thymus zygis*), limunske trave (*Cymbopogon citratus*) i *d*-limonena iz ulja citrusa, poput naranče (*Citrus sinensis*), limuna (*C. limon*) ili mandarine (*C. reticulata*). Također se u te svrhe koristi eugenol, koncentrirani spoj u ulju klinčića. Komercijalni pripravci dostupni su na tržištu pod nazivom: GreenMatch (55% *d*-limonen), Matratec (50% ulje klinčića), WeedZap (45% ulje klinčića + 45% ulje cimeta), GreenMatch EX (50% ulje limunske trave), Avenger Weed Killer (70% *d*-limonen) i Weed Slayer (6% eugenol) (Verdeguer i sur., 2020).

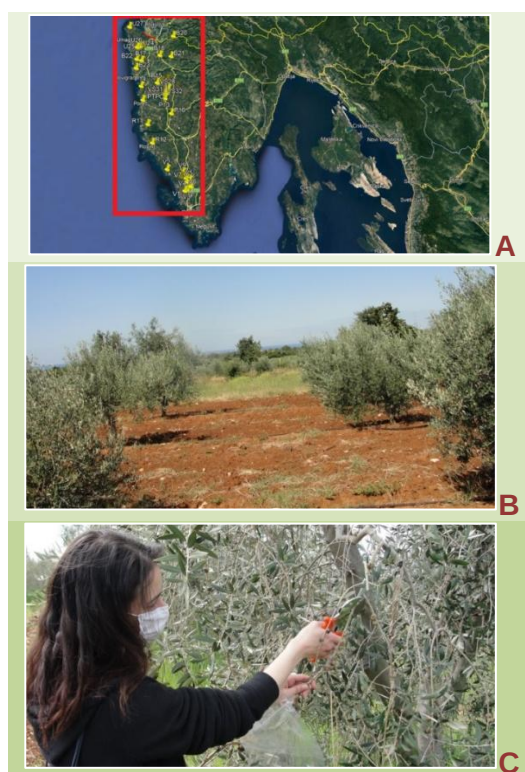
Iako su djelotvorni *in vitro* kod mnogobrojnih fitopatogena, važno je napomenuti da EtU i njihove komponente, kao i biljni ekstrakti, mogu biti fitotoksični, što značajno ovisi o njihovoj koncentraciji u otopini (Verdeguer i sur., 2020; Grul'ová i sur., 2020). Stoga je potrebno provoditi istraživanja u kojima bi se procijenili fitotoksični učinci potencijalnih antibakterijskih tvari, kako bi se izbjegla oštećenja biljaka u komercijalnoj proizvodnji. Zbog utvrđenih

kompleksnih interakcija biljnih vrsta, fitopatogena i bioaktivnih spojeva, potrebno je istražiti učinkovitost primjene kombinacije EtU i njihovih komponenti, kako bi se proširio spektar i mehanizam djelovanja biokemijskih pesticida.

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Prikupljanje zaraženog biljnog materijala i izolacija uzročnika raka masline

Uzorci simptomatičnog biljnog materijala prikupljeni su na području istarskog poluotoka tijekom 2021. i 2022. godine u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) UIP-2020-02-7413 Prirodni bioaktivni spojevi kao izvor potencijalnih antimikrobnih tvari u suzbijanju bakterijskih i drugih gljivičnih patogena masline (akronim „Anti-Mikrobi-OL“). U dvogodišnjem terenskom istraživanju uzorci su prikupljeni s različitih sorti masline koje se uzgajaju u hrvatskom dijelu Istre (Slika 2) iz ukupno 45 maslinika unutar različitih maslinarsko-uzgojnih područja (Tablica 3). Uzorkovanje zaraženog biljnog materijala obavljeno je od proljeća 2021. do proljeća 2022. godine. Ukupno je prikupljeno 102 nasumična uzorka s 22 različite sorte simptomatskih stabala masline. Svaki uzorak je označen s podacima o lokaciji, sorti masline i datumu prikupljanja. Odmah nakon prikupljanja uzorci (dijelovi grana/izbojaka s tumorastim izraslinama) su stavljeni u prijenosni hladnjak. Nakon povratka s terena, uzorci su pohranjeni u hladnjak na +4 °C do izolacije bakterije.



Slika 2. Uzorkovanje simptomatičnog biljnog materijala u maslinicima u Istri. A) Lokacije uzorkovanja na području Istre; B) prikaz jednog od maslinika obuhvaćenog istraživanjem; (C). uzimanje simptomatičnog tkiva masline zaražene s uzročnikom bakterioznog raka masline.

Terensko istraživanje provedeno je u ukupno 45 različitih maslinika na području Istre, koji su obuhvatili površinu veću od 600 hektara. Cilj terenskog istraživanja bio je utvrditi prisutnost bakterioznog raka masline (*P. savastanoi* pv. *savastanoi*). Tijekom obilaska maslinika, bilježila se prisutnost pojedinih sorti masline te prisutnost simptoma bakterioznog raka masline na svakoj sorti. Za svaku sortu, zabilježeno je u koliko je ukupno posjećenih maslinika ta sorta prisutna, te u koliko od tih maslinika ista sorta pokazuje simptome bolesti. Na temelju tih podataka, izračunati su pokazatelji frekvencije pojavljivanja sorti u višesortnim nasadima i njihove zaraženosti u poljskim uvjetima, kao što je prikazano u Tablici 3. Formula za izračun udjela sortimenta je:

$$\text{Udio sortimenta (\%)} = (\text{Broj maslinika u kojima je prisutna određena sorta} / \text{Ukupan broj istraživanih maslinika}) \times 100$$

, a formula za izračun zaraženosti sortimenta je:

$$\text{Zaraženost sortimenta (\%)} = (\text{Broj maslinika s prisutnom sortom i simptomima raka} / \text{Ukupan broj maslinika u kojima je sorta prisutna}) \times 100$$

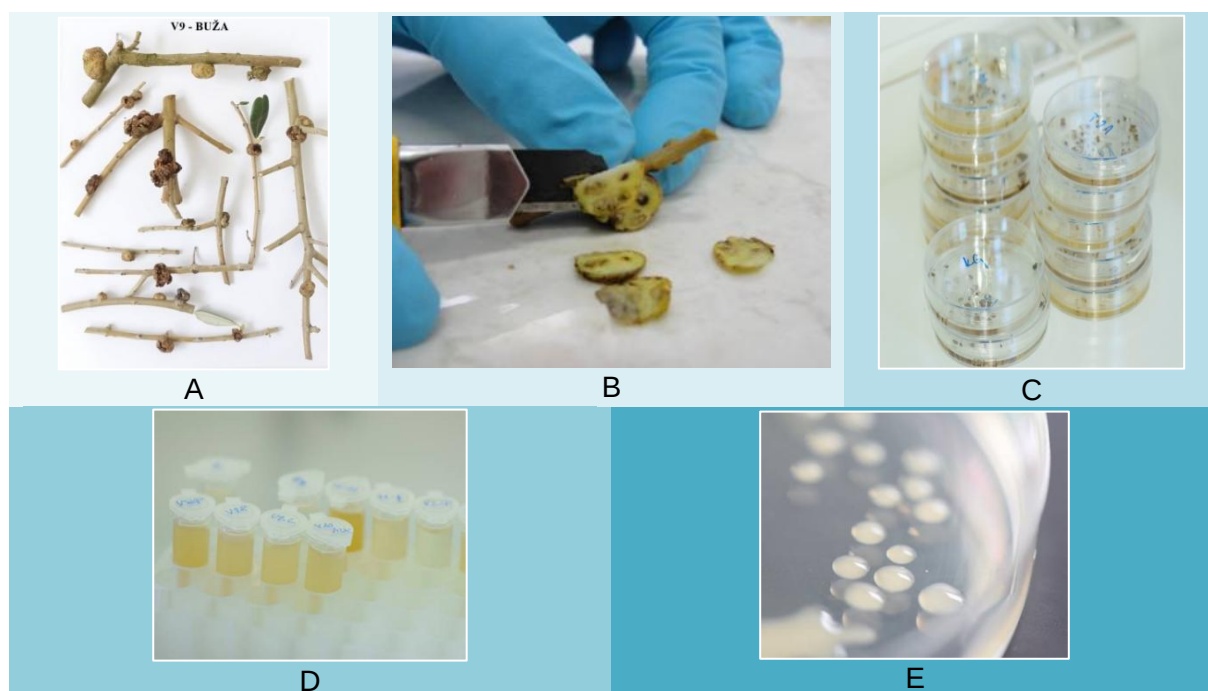
Temeljem maslinarsko – uzgojnih područja u Istri, najveći broj maslinika obuhvaćenih istraživanjem bio je na porečko–vrsarskom području (17), zatim bujsko–umaškom (13), vodnjansko–pulskom (12), a najmanji broj na rovinjskom području (3).

Tablica 3. Podatci o prikupljenim uzorcima zaraženog tkiva masline i agronomskoj praksi maslinara na četiri uzgojna područja u Istri.

Sortiment	Porečko– vrsarsko [§] (17/246,02 ha*)	Bujsko–umaško (13/173,09 ha)	Vodnjansko– pulsko (12/157,9 ha)	Rovinjsko (3/26 ha)	Ukupan br. maslinika	Br. maslinika sa simptomatičnim stabalima	Br. uzoraka po sorti
Frantoio	10	12	1	1	24	19	19
Leccino	17	11	6	3	37	20	21
Pendolino (Pendolino piangente**)	13	8	7	3	32	15	16
Buža (Buža momjanska**)	7	6	8	3	24	8	8
Moraiolo	2	2	0	0	4	2	2
Istarska Bjelica (Bianchera, Bjelica, Bianchera di Udine**)	14	9	6	2	31	10	10
Kabonera	0	1	0	0	1	1	1
Nepoznata	3	1	4	0	8	7	7
Maurino	5	1	1	0	7	5	5
Porečka rosulja	2	1	0	0	3	1	1
Picholine	4	0	0	0	4	1	1
Nocciara	1	0	0	0	1	1	1
Rosinjola (Talijska rosinjola - Rosciola**)	2	0	4	0	6	2	2
Arbequina	1	0	0	0	1	1	1
Cipressino	1	0	0	0	1	1	1
Leccio del Corno	2	0	2	0	4	1	1
Karbonaca	1	0	6	0	7	5	5
Starost maslinika (godina)	1–45	5–100	12–150	9–18			
Sanitarne mjere u maslinicima	Preventivno tretiranje bakarnim preparatima; zimsko tretiranje; dezinfekcija alata; premazivanje rana	Preventivno tretiranje bakarnim preparatima; zimsko tretiranje; dezinfekcija alata; premazivanje rana	Preventivno tretiranje bakarnim preparatima; zimsko tretiranje; dezinfekcija alata; premazivanje rana	Preventivno tretiranje bakarnim preparatima; zimsko tretiranje; dezinfekcija alata; premazivanje rana			
Način berbe	Ručni tresaći	Ručni tresaći	Ručni tresaći	Ručni tresaći			

[§]podjela uzgojnih regija masline u Istri prema Strikić (2011); *ukupan broj maslinka u istraživanoj uzgojnoj regiji/ukupna površina maslinika u hektarima; **sinonimi sortimenta prema navodima maslinara

Izolacija bakterije iz tumora obavljena je u Laboratoriju za zaštitu bilja na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču. Izolacija je obavljena na način da je biljni materijal ispran pod mlazom vode radi uklanjanja prašine i drugih nečistoća (Slika 3A). Zatim su uzorci površinski dezinficirani sa 70%-tnim etanolom i umotani u papirnati ručnik. Kako bi se osigurali aseptični uvjeti za izolaciju bakterije, dezinficirani i osušeni uzorci su preneseni u laminar (NUVE LN 090, Ankara, Turska). Tumoraste izrasline su usitnjene na komadiće veličine oko 3 mm (Slika 3B) i potopljene u sterilnu destiliranu vodu u Petrijeve zdjelice na 30 minuta (Slika 3C). Potom je vodena frakcija ekstrakta (bez komadića biljnog materijala) prenesena pipetom u sterilne Ependorff tubice volumena 2 mL (Slika 3D). Ekstrakti su zatim serijski razrijeđeni u sterilnoj destiliranoj vodi do 10^{-10} u sterilnim Ependorff tubicama. Volumen od 100 μ L svakog razrjeđenja inokuliran je na poluselektivni kruti hranjivi medij King's B (KB) (King Medium B, Pseudomonas Agar F, Biolife, Milano, Italija) s dodatkom antibiotika cikloheksimida (100 mg/mL) (KBC) prema Tegli i sur. (2017) (Slika 3E).



Slika 3. Izolacija uzročnika raka masline iz tumorastih izraslina na simptomatičnom biljnom materijalu. A) simptomatični biljni materijal; B) usitnjavanje tumorastih izraslina; C) potapanje komadića tumora u sterilnu destiliranu vodu; D) suspenzije bakterija; E) čiste kulture izolata.

3.2. Molekularna identifikacija uzročnika raka masline

Za identifikaciju uzročnika raka masline, kulture bakterije uzgojene na hranjivim podlogama KB i PVF-1, koje su prethodno inkubirane na 26 °C u trajanju od 24–48 sati (Tegli i sur., 2017) (Slika 4A). Identifikacija bakterije odrađena je u Laboratoriju za zaštitu bilja i u Genetičkom laboratoriju Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Identifikacija patovara *P. savastanoi* pv. *savastanoi* utvrđena je lančanom reakcijom polimerazom u realnom vremenu (*real-time* PCR) korištenjem TaqMan® probe prema modificiranoj metodi Tegli i sur. (2010) (Slika 4B).

Nakon pripreme uzoraka, deoksiribonukleinska kiselina (DNK) bakterije izolirana je pomoću uređaja za izolaciju nukleinskih kiselina Maxwell® RSC (Promega, Madison, WI, SAD) (Slika 4C). Uzorci su pripremljeni za izolaciju DNK prema uputama proizvođača kompleta Maxwell® RSC Cultured Cells DNA (Promega, Madison, WI, SAD). Sekvence početnica i probe koje su korištene za identifikaciju patovara *P. savastanoi* pv. *savastanoi* bile su:

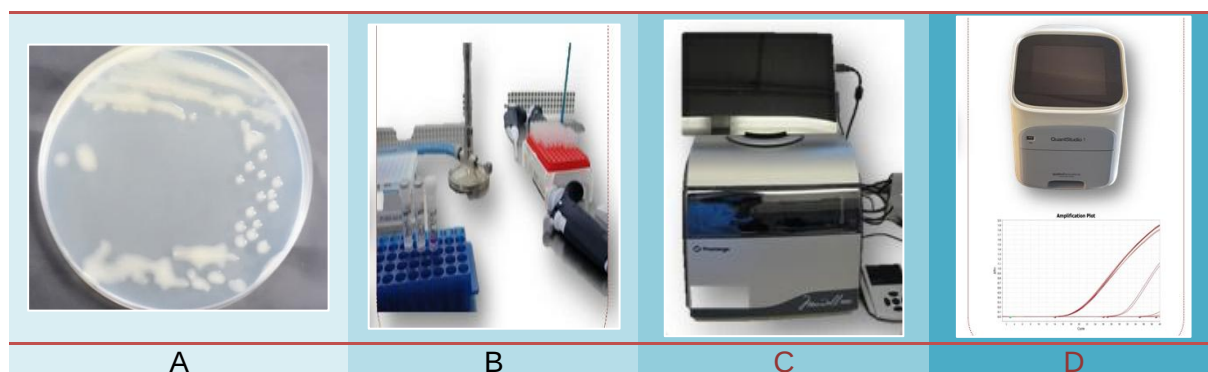
- *PsvRT-F* (početnica Forward) '5-CGGATTTGGTTTGC GGGGTA–3',
- *PsvRT-R* (početnica Reverse) '5-AATGGGGTGACACTAAAAATTGTGAA–3',
- *PsvRT-P* (proba) '5 VIC-CTCGTGCGATCTAAACAGCCGTAGC-QSY 3'.

Molekularno su identificirani uzorci iz zaraženog biljnog materijala prikupljenog u istraživanim maslinicima u Istri u 2021. i 2022. godini te referentni izolat *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Referentni izolat CFBP 5075 (Italija) nabavljen je od Nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (INRA, Pariz, Francuska). Kao negativna kontrola korištena sterilna destilirana voda. Uzorci za PCR pripremljeni su u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (MicroAmp® Optical 96-well Applied Biosystems®, Waltham, MA, SAD). Volumen smjese za reakciju bio je 50 µL s koncentracijama reagensa kako slijedi:

- 1× TaqMan® Univerzalni PCR Master Mix,
- 300 nM početnice (*PsvRT-F* i *PsvRT-R*),
- 100 nM probe (*PsvRT-P*)
- 3 µL DNK.

Program umnožavanja DNK pomoću PCR metode uključivao je jedan ciklus na 95 °C (10 min), 40 ciklusa na 95 °C (15 sekundi) i 40 ciklusa na 60 °C (1 min) u uređaju Quant Studio 1 Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) (Slika 4D). Kao negativna kontrola u testovima korištena je puferska otopina bez DNA, odnosno sa sterilnom destiliranom vodom. Pozitivnom Ct vrijednošću (eng. *Cycle threshold*), koja je

ukazivala na prisutnost patogena, smatrala se vrijednost 27 (Tegli i sur. 2010). Rezultati su obrađeni u software-u Quant Studio™ Design & Analysis Software verzija 1.5.1.



Slika 4. Priprema izolata bakterije za izolaciju DNK i identifikaciju uzročnika raka masline metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (*real-time* PCR). A) čista kultura bakterije. B) priprema uzoraka za izolaciju DNK i identifikaciju metodom PCR; C) uređaj za izolaciju DNK; D) uređaj za *real-time* PCR.

3.3. Biokemijska karakterizacija uzročnika raka masline u Istri

Biokemijska karakterizacija uzročnika bakterioznog raka masline odrađena je u Laboratoriju za zaštitu bilja Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču. Morfologija kolonija molekularno identificiranih izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, opisana je promatranjem razvijenih kolonija na poluselektivnoj hranjivoj podlozi KBC, pomoću trinokularnog mikroskopa BOE 2200.520 (BOECO, Hamburg, Njemačka) pri povećanju od 4×

Karakterizacija biokemijskih svojstava utvrđena je prema ključevima determinacije unutar LOPAT sheme (Lelliot i sur., 1966; Braun-Kiewnick i Sands, 2001; Shaad i sur., 2001) (Slika 5). U tu svrhu su karakterizirane čiste kulture bakterije stare 24–48 sati. Za biokemijske testove korišten je inokulum od 10^8 stanica bakterije (eng. *Colony Forming Units*, CFU)/mL.

Za utvrđivanje proizvodnje polisaharida levana, čiste kulture bakterije inokulirane su na hranjivi agar koji u sastavu sadrži saharozu u udjelu od 5% (eng. *Sucrose Nutrient Agar*, SNA). Izolati su potom inkubirani na 3–5 dana kako bi se utvrdio razvoj bijelih sluzavih kolonija kod potencijalno pozitivnih izolata na proizvodnju levana (Slika 5A).

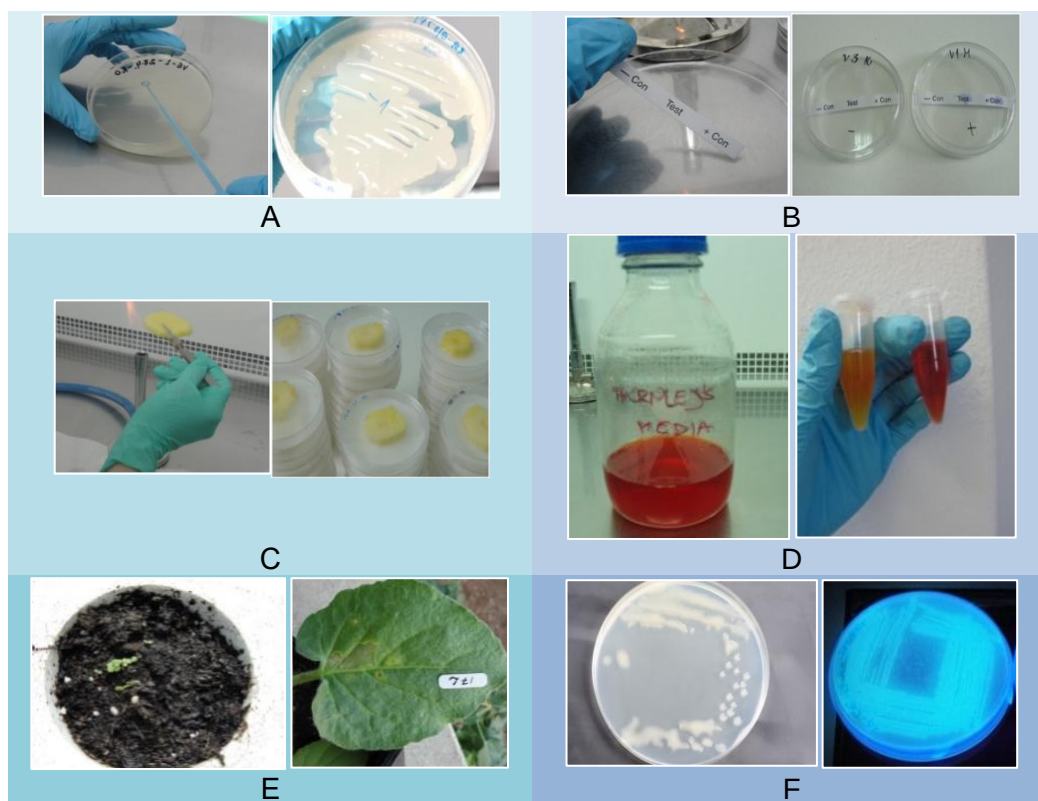
Za određivanje prisutnosti oksidaze korištene su komercijalne MAST ID™ trakice (Mast House, UK) prema uputama proizvođača (Slika 5B). Čista kultura bakterije (inkubirana 24 sata na krutom hranjivom mediju), nanescena je sterilnom plastičnom ezom izravno na MAST ID™ trakicu. Trakica je promatrana unutar jedne minute od nanošenja bakterije. Promjena boje trakice u tamnoplavu ili ljubičastu unutar 10 sekundi smatrana je pozitivnom reakcijom, promjene boje nakon 60 sekundi smatrao se odgođeno pozitivnim rezultatom, dok je izostanak promjene boje trakice smatran kao negativan rezultat na aktivnost oksidaze.

Aktivnost pektolize utvrđena je inokulacijom bakterije na dezinficirane kolutiće krumpira koji su prethodno sterilizirani na plameniku i postavljeni u Petrijeve posudice s filter papirom. U Petrijeve zdjelice je prije postavljanja filter papira dodano 5 mL sterilne destilirane vode, kako bi se održala vlažnost tijekom inkubacije (Slika 5C).

Prisutnost arginin dehidrogenaze je određena pomoću otopine Thornley 2A. Ukupni volumen otopine bio je 5 mL. Promjena boje otopine iz ružičaste u crvenu unutar četiri dana inkubacije bakterije, smatrana je pozitivnom reakcijom na aktivnost dehidrogenaze (Slika 5D).

Hipersenzitivna reakcija na listovima duhana utvrđena je na biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Inokulacija suspenzija bakterije u epidermalno tkivo lista duhana, obavljena je pomoću medicinske injekcije volumena 2 mL bez igle. Promjene boje i razvoj nekroze na mjestu inokulacije utvrđene su 24 sata nakon inokulacije (Slika 5E).

Sposobnost izolata za proizvodnju fluorescentnog pigmenta utvrđena je vizualnom procjenom nakon inkubacije u trajanju od 24 sata na King B podlozi (KB). Procjena je provedena pod UV svjetlom valne duljine 366 nm (Slika 5F).



Slika 5. Karakterizacija molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izoliranih iz simptomatičnog biljnog materijala masline u istraživanim maslinicima u Istri prema testovima sheme LOPAT i sposobnosti proizvodnje fluorescentnog pigmenta. A) proizvodnja levana; B) prisutnost oksidaze; C) pektolitička aktivnost; D) prisutnost arginin dehidrogenaze; E) test hipersenzitivne reakcije na listovima duhana; F) fluorescencija na hranjivoj podlozi KB.

3.4. Test patogenosti bakterijskih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* i test osjetljivosti sorti masline na rak masline

Osjetljivost različitih sorti masline na rak masline i razina virulentnosti izolata testirana je za pet izolata bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi*: CFBP 5075 (referentni izolat, Italija), A1-1 (Slovenija; 45°53'31.55"N;13°61'75.14"E), I7 L (Poreč, Hrvatska; 45°22'34"N;13°60'25"E), P15N (Dvori, Hrvatska; 45°17'12"N;13°39'56"E) i B45C-PR (Buje, Hrvatska; 45°24'42.50"N;13°30'10.22"E). Izolati I7 L i B45 C-PR te slovenski izolat A1-1 izolirani su sa sorti masline Leccino, Porečka rosulja i Arbequina, a odabrani su zbog odstupanja u biokemijskim testovima temeljenim na aktivnosti oksidaze te stupnju zaraženosti biljaka. Izolat P15 N odabran je kao hrvatski izolat s tipičnim rezultatima testova definiranih LOPAT shemom. Izolati su također odabrani temeljem njihovog različitog stupnja patogenosti u poljskim uvjetima, procijenjenog temeljem dimenzija tumorastih izraslina zabilježenih na zaraženim biljkama u maslinicima. Na primjer, izolat A1-1 odabran je zbog izazivanja značajnih dimenzija tumora, dok je B45 C-PR predstavljao izolat povezan s minimalnim dimenzijama tumora.

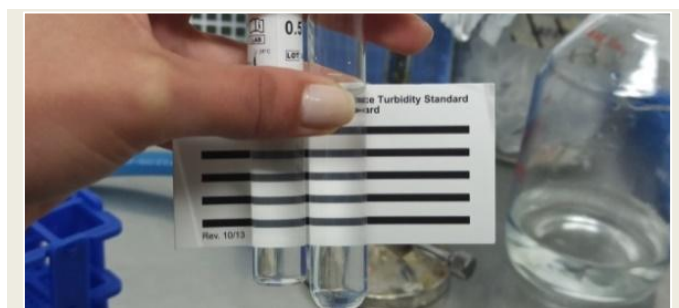
Hrvatske sorte masline čija je osjetljivost testirana na zarazu uzročnikom raka masline su Rosinjola (R), Buža (B) i Istarska bjelica (IB). Kao referentne sorte korištene su dvije talijanske sorte: tolerantna sorta Leccino (L) i osjetljiva sorta Frantoio (F). Dizajn pokusa postavljen je prema slučajnom bloknom rasporedu te je svaka sorta masline bila podvrgnuta šest vrsta tretmana, uključujući infekciju s pet različitih izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* i negativnu kontrolu (sterilna destilirana voda, SDV) (Slika 6). U istraživanje je bilo uključeno ukupno 360 sadnica, po 60 sadnica svake od pet sorti masline. Za svaku kombinaciju (sorta masline × tretman) korišteno je 12 sadnica.



Sorte masline	F	L	R		IB	B	L	R	IB		B	F	B	L	R		F	L
	IB	B		L	F	R	B	F		R	L	IB	F	IB		R	B	IB
Oznake izolata <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	CFBP 5075			A1-1			I7 L			SDV			P15 N			B45 C-PR		

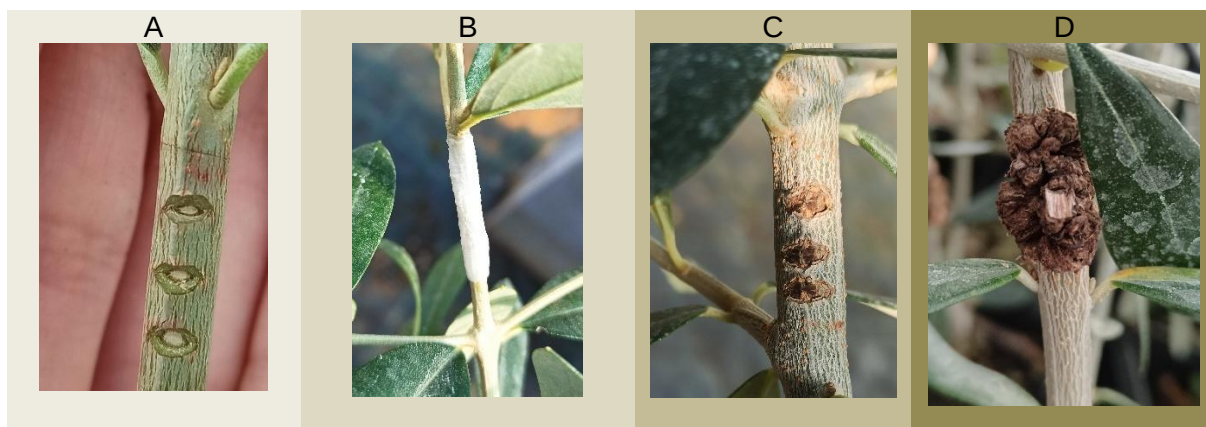
Slika 6. Shematski prikaz dizajna pokusa osjetljivosti autohtonih i introduciranih sorti masline na uzročnika raka masline i test virulentnosti izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* u plasteniku prema slučajnom bloknom rasporedu. F–Frantoio; L–Leccino; R–Rosinjola; IB–Istarska bjelica; B–Buža.

Inokulum za zarazu sadnica masline sadržavao je približno 10^8 CFU/mL bakterije, što je određeno pomoću 0,5 McFarland standarda zamućenja (Remel, UK) (Slika 7). Suspenzija bakterija inokulirana je mikropipetom u rane na kori izbojaka masline, pri čemu je korišten volumen inokuluma od 5 μ L. Istraživanje je započelo u ožujku 2023. godine u plasteniku Instituta za poljoprivredu i turizam, Poreč, Hrvatska (45°13'17"N; 13°36'9"E). Sadnice masline su navodnjavane sustavom kap po kap kako bi se osigurala ujednačena opskrba svih biljaka vodom. Raspored navodnjavanja bio je prilagođen kako bi se održala optimalna vlažnost supstrata, čime se izbjegavao potencijalni učinak vodnog stresa na odgovor biljaka na zarazu bakterijom, a istovremeno je spriječen kapljični prijenos inokuluma na kontrolne sadnice masline. Monitoring biljaka provoden je redovito kako bi se pravovremeno uočili i uklonili znakovi stresa.



Slika 7. Priprema inokuluma bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* za testiranje virulentnosti izolata i osjetljivosti sorti masline na rak masline.

Prema metodologiji Sisto i sur. (2004) (Slika 8), na pet različitih mjesta na sadnicama masline (pet ponavljanja), na svakoj biljci, skalpelom su urezane tri rane (Slika 8A), što je rezultiralo razvojem odvojenih tumora (Slika 8C) ili jednom tumorastom izraslinom (Slika 8D) po ponavljanju. Jedan tumor po ponavljanju predstavljao je jedno opažanje. Ako je na jednom ponavljanju nastalo više od jednog tumora, izračunata je njihova prosječna vrijednost koja je smatrana jednim opažanjem. Nakon inokulacije bakterije, rane su zatvorene parafilmom M (Slika 8B). Parafilm je uklonjen 10–15 dana (Slika 8C), nakon što je na kontrolnim biljkama primijećen razvoj kalusa. Mjerenje dimenzija izraslina provedeno je šest mjeseci nakon zaraze (Slika 8D).



Slika 8. Postupak zaraze sadnica masline izolatima *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* u plasteniku. A) rane na kori sadnica masline urezane u obliku slova V; B) Inokulirane rane omotane parafilmom M; C) formirani kalus na ranama nakon 10–15 dana nakon inokulacije; D) formirane tumoraste izrasline šest mjeseci nakon inokulacije.

3.5. Antimikrobno djelovanje bioaktivnih tvari

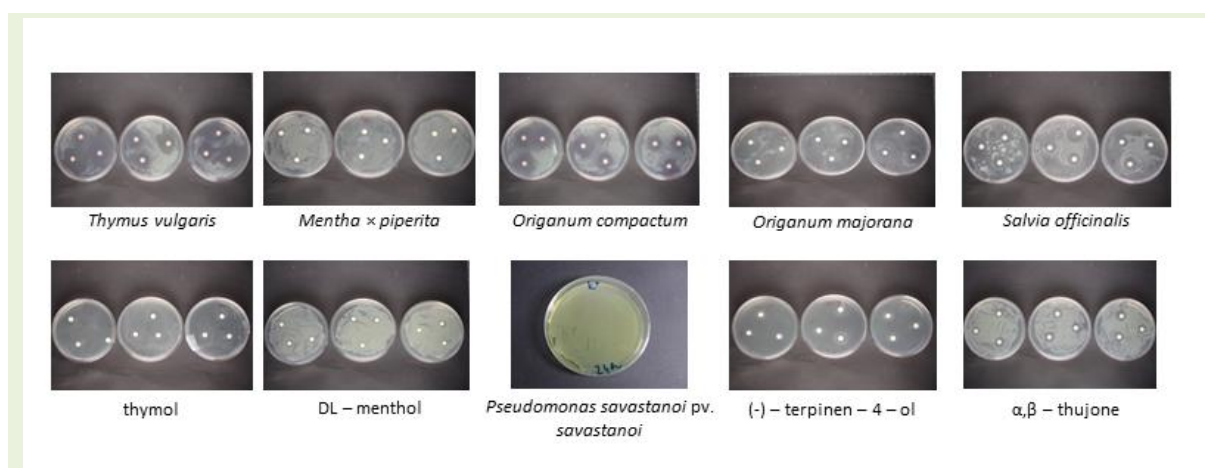
3.5.1. Priprema inokuluma *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Antibakterijski potencijal EtU od paprene metvice (*Menta × piperita*), timijana (*Thymus vulgaris*), mravinca (*Origanum compactum*), mažurana (*Origanum majorana*), kadulje (*Salvia officinalis*), muškatne kadulje (*Salvia sclarea*) i šest komponenti EtU: DL-mentol, timol, karvakrol, (-)-terpinen-4-ol, linalil acetat i α,β -tujon, utvrđen je kod referentnog izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*—CFBP 5075 (Italija). Antibakterijski potencijal od ukupno pet biljnih voda masline sorti Istarska bjelica (IB), Leccino (L), Rosinjola (R), Buža (B), Buža puntoža (BP) i fenola HTyr, testiran je kod dva izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, a to su: CFBP 5075 (Italija) i I7 L (Hrvatska; 45°22'34"N; 13°60'25"E). U slučaju biljne vode masline, uključena su dva različita izolata zbog izostanka djelotvornosti na referentnom izolatu. Kako bi se potvrdila neučinkovitost biljne vode masline i uklonila sumnja na potencijalnu rezistentnost referentnog izolata na tretmane, testiran je još jedan izolat.

Odabrani izolati su prethodno opisani prema LOPAT shemi i molekularno identificirani kao vrsta *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Izolati bakterije revitalizirani su na način da su skladišteni izolati bakterije (kulture bakterije u 20%-oj otopini glicerola skladištene/čuvane na -80 °C), inokulirani na hranjivu podlogu KB. Nakon inokulacije, Petrijeve zdjelice su postavljene na inkubaciju na 27 °C u trajanju 24–48 sati.

3.5.2. Utvrđivanje osjetljivosti bakterijskih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* metodom difuzije aktivne tvari kroz kruti hranjivi medij pomoću diskova (Kirby–Bauer metoda)

Osjetljivost izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* na bioaktivne tvari, utvrđena je metodom difuzije aktivne tvari kroz kruti hranjivi medij pomoću diskova, prema metodi Kirby–Bauer (Hudzicki, 2009). Prema tom protokolu na krutu hranjivu podlogu KB inokulirano je 100 μL 10^8 CFU/mL suspenzije bakterije, čija je brojnost određena pomoću 0,5 McFarland standarda zamućenja. Sterilni diskovi ($\varnothing$ 6 mm; Whatman AA Discs, PLC, Cytiva, Kina), postavljeni su sterilnom metalnom pincetom na hranjivu podlogu u aseptičnim uvjetima u laminaru (Slika 10). Prije pipetiranja na diskove, otopine tretmana su snažno homogenizirane pomoću vorteks uređaja i pipete.



Slika 9. Određivanje osjetljivosti izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* na bioaktivne tvari prema Kirby–Bauer metodi.

3.6. Eterična ulja i njihove komponente (Kirby–Bauer metoda)

U ovom pokusu testiran je antimikrobni potencijal od ukupno šest komercijalno dostupnih EtU (Pranarom, Ath, Belgija) čiji je sastav prikazan u Tablici 5, te njihovih komponenti (koncentriranih spojeva): karvakrol, linalil acetat, DL–mentol, (-)-terpinen-4-ol (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD), timol (VWR International, Leuven, Belgija) i α,β -tujon (Sigma Aldrich, Burlington, MA, SAD). Na svaki disk je pipetirano 15 μ L tretmana u koncentracijama prikazanima u Tablici 4.

Kao negativna kontrola korištena je sterilna destilirana voda. Kao pozitivne kontrole korišteni su tretmani antibiotikom tetraciklinom (Fisher Scientific, Hampton, NH, SAD) i komercijalno sredstvo na bazi bakra Nordox 75 WG (Syngenta, Basel, Švicarska). Kao pozitivne kontrole za inhibiciju rasta *P. savastanoi* pv. *savastanoi* korišteni su tetraciklin (u koncentraciji od 0,5 mg/mL) i komercijalno sredstvo Nordox 75 WG na bazi bakarnog spoja bakarni (I) oksid (u koncentraciji od 2,0 mg/mL). Ove su tvari korištene u standardnim, preporučenim koncentracijama relevantnim za antimikrobno testiranje/primjenu u zaštiti bilja, stoga nisu bile predmet serijskih razrjeđenja kao što su testirani bioaktivni spojevi K2 i K3, za koje je bilo potrebno procijeniti učinkovitost u različitim koncentracijama. Kako bi se odvijala difuzija tretmana kroz hranjivu podlogu, Petrijeve zdjelice su prije inkubacije postavljene u hladnjak na +4 °C (dva sata). Nakon difuzije tretmana, Petrijeve zdjelice su postavljene na inkubaciju na 27 °C u inkubator FOC 215i (VELP Scientifica®, Usmate Velate, MB, Italija). Nakon 24 sata inkubacije, promjer zone inhibicije oko diskova izmjeren je digitalnim pomičnim mjerilom.

Tablica 4. Popis bioaktivnih tvari i koncentracija tretmana za testiranje osjetljivosti *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Skupina	Tretman	Koncentracija (mg/mL)		
		K1*	K2	K3
Eterična ulja	paprena metvica (<i>Mentha × piperita</i>)	+	40	50
	timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	+	20	50
	mravinac (<i>Origanum compactum</i>)	+	20	50
	mažuran (<i>Origanum majorana</i>)	+	40	50
	kadulja (<i>Salvia officinalis</i>)	+	40	50
	muškatna kadulja (<i>Salvia sclarea</i>)	+	40	50
Komponente eteričnih ulja	DL–mentol	10	5,0	50
	timol	10	5,0	50
	karvakrol	+	5,0	50
	linalil acetat	+	5,0	50
	(-)-terpinen-4-ol	+	5,0	50
	α,β–tujon	+	5,0	50
Antibiotik	tetraciklin	0,5	-	-
Komercijalno sredstvo na bazi bakra	Nordox 75 WG	2,0	-	-
Negativna kontrola	sterilna destilirana voda	-	-	-

* - nerazrijeđeni oblik tretmana

Tablica 5. Kromatografski profil od proizvođača komercijalnih eteričnih ulja od vrsta paprena metvica (*Mentha × piperita*), timijan (*Thymus vulgaris*), mravinac (*Origanum compactum*), mažuran (*Origanum majorana*) i muškatna kadulja (*Salvia sclarea*) (PRANARÖM International, Belgija), te ulje od kadulje (*Salvia officinalis*) (Fagron, Hrvatska). Podebljane su vrijednosti komponenti koje određuju kemotip testiranih ulja.

Komponenta ulja	Udio (%)					
	paprena metvica	timijan	mrvinac	mažuran	kadulja	muškatna kadulja
α-pinen	0,91	1,16	0,56	0,72	-	0,11
β-pinen	1,08	0,25	0,12	-	-	0,13
sabinen	0,46	0,01	-	5,26	-	0,03
limonen	2,47	0,37	0,22	1,76	-	0,62
1,8 – cineol	5,51	0,05	0,09	0,19	12,9	0,02
menton	24,08	-	-	-	-	-
mentofuran	2,07	-	-	-	-	-
izomenton	3,64	-	-	-	-	-
mentil acetat	5,48	-	-	-	-	-
neomentol	2,91	-	-	-	-	-
β-kariofilen	3,05	2,09	1,72	-	-	1,46
neoizomentol	0,61	-	-	-	-	-
mentol	36,37	-	-	-	-	-
pulegon	1,21	-	-	-	-	-
α-terpineol	0,55	0,31	0,20	2,90	-	2,0
germakren D	1,08	-	-	-	-	3,34
piperiton	1,04	-	-	-	-	-
α-tujen	0,06	1,22	0,90	0,70	-	-
kamfen	0,03	1,15	0,09	0,04	-	0,02
β-mircen	0,23	1,52	1,60	1,80	-	0,84
α-terpinen	0,18	1,23	1,64	9,50	-	0,01
γ-terpinen	0,35	10,05	14,12	15,14	-	0,02
p-cimen	0,18	17,03	7,84	1,45	-	0,02
kamfor	-	0,66	0,09	-	19,0	-
linalool	0,17	4,52	1,38	1,87	-	-
linalol	-	-	-	-	-	18,19
terpinen-4-ol	0,64	1,55	0,42	22,54	-	0,02
borneol	-	2,07	0,17	-	2,8	0,05
timol	0,03	45,73	8,21	0,02	-	-
karvakrol	-	4,10	57,58	0,04	-	-
β-felandren	-	0,23	0,19	1,88	-	-
terpinolen	0,10	0,12	0,08	3,42	-	0,14
trans-tujanol	0,24	0,20	0,19	5,32	-	-
E-solanon	-	-	-	1,64	-	-
cis-tujanol	0,04	0,10	-	9,01	-	-
linalil acetat	-	-	-	3,75	-	62,94
trans-p-ment-2-en-1-ol	0,03	0,03	0,02	1,02	-	-
β-kariofilen	-	-	-	2,87	-	1,46
cis-p-ment-2-en-1-ol	-	0,03	0,02	0,82	-	-
biciklogermakren	-	-	-	1,50	-	0,47
cis-piperitol	-	-	-	0,55	-	-
α- i β-tujon	-	-	-	-	33,8	-
bornil acetat	-	0,07	-	0,06	1,9	0,50

3.7. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija bioaktivnih tvari

3.7.1. Eterična ulja i njihove komponente (CLSI, 1999 metoda)

Vrijednosti MIK na tretmanima EtU i komponentama EtU, utvrđene su metodom razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju u staklenim epruvetama (ukupnog volumena 4 mL). Tretmani su pripremljeni u 2 mL medija KBL u kojega je dodano 2 mL suspenzije bakterije stare 24 sata. Koncentracija tretmana izračunata je za ukupni volumen tretmana od 4 mL. Gustoća suspenzije bakterije od 10^6 CFU/mL određena je pomoću spektrofotometra ($OD_{600} \approx 0,15$). Koncentracije potencijalnih antibakterijskih tvari pripremljene su serijom razrjeđenja u rasponu 20–0,31 mg/mL za EtU *Thymus vulgaris* i *Origanum compactum*, te 40–0,63 mg/mL za EtU *Mentha × piperita*, *Origanum majorana*, *Salvia officinalis* i *Salvia sclarea*, dok su koncentracije pojedinačnih sastojaka ulja testirane u rasponu koncentracija 5,0–0,08 mg/mL. Navedene početne koncentracije odabrane su kao najveće koncentracije koje se mogu koristiti, a da se izbjegne prekomjerna zasićenost otopina koja bi mogla interferirati sa spektrofotometrijskim očitavanjima, što je bilo približno jednako jednoj kapi, koja se ujedno prema proizvođačima preporučuje kao sigurna doza za vanjsku primjenu.

Vrijednosti MIK su određene vizualnom procjenom prisutnosti bakterija u staklenim epruvetama, što je interpretirano kao odsustvo vidljivog rasta bakterija nakon inkubacije tretmana u trajanju od 24 sata. Otopine MIK su mikrobiološkom ezom inokulirane na hranjivu podlogu KB, zajedno s kontrolnim tretmanom (bez aktivne tvari) kako bi se potvrdila odsutnost ili inhibicija razvoja bakterije na utvrđenoj MIK. Radi usporedbe antibakterijskog učinka testiranih bioaktivnih tvari s antibiotikom i komercijalnim sredstvom na bazi bakra, postotak inhibicije rasta bakterije pri MIK vrijednostima izračunat je temeljem spektrofotometrijskih vrijednosti apsorbancije tretmana pri valnoj duljini od 600 nm (OD). Inhibicija rasta bakterije je izračunata formulom:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(A_{600} - B_{600})/A_{600}] \times 100$$

gdje A_{600} predstavlja apsorbanciju kontrolnog tretmana (bez antimikrobnih tvari), dok B_{600} predstavlja apsorbanciju suspenzije bakterije s tretmanom pri određenoj koncentraciji. Apsorbancija je očitana pomoću spektrofotometrijskog uređaja TECAN Infinite 200 PRO (Männedorf, Švicarska). KBL je korišten kao slijepa kontrola (eng. *blank*).

3.8. Određivanje baktericidnog i bakteriostatskog djelovanja eteričnih ulja i njihovih komponenti

Nakon utvrđenih MIK vrijednosti tretmana, testirana je njihova baktericidna i bakteriostatska aktivnost ponavljanjem pokusa razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju. Testirane doze bile su jednake vrijednostima MIK, 2× MIK i 4× MIK aktivnih tvari.

Baktericidna aktivnost utvrđena je izračunavanjem omjera minimalne baktericidne koncentracije (MBK) u odnosu na MIK. MBK je definirana kao koncentracija pri kojoj je utvrđeno 99,9% inhibicije rasta bakterije na krutom hranjivom mediju nakon izlaganja bakterije tretmanu u trajanju od 24 sata. Bakteriostatska aktivnost utvrđena je ukoliko je omjer koncentracija MBK/MIK bio >4 , dok je vrijednost ≤ 4 ukazivala na baktericidno djelovanje tretmana (Morales-Ubaldo i sur., 2021).

3.9. Krivulja *time–kill*

Za određivanje vremena smrti bakterija unutar 24 sata izloženosti tretmanu EtU i njihovih komponenti, korišten je protokol CLSI (CLSI, 1999). MIK vrijednosti EtU i komponenti EtU testirane su metodom razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju, a korištene su za utvrđivanje vremena smrti zajedno s koncentracijama 2× MIK i 4× MIK.

Nakon inkubacije tretmana, 100 μL tretmana s bakterijom razrijeđeno je u sterilnoj fiziološkoj otopini (1:9 V/V), nakon čega je 10 μL razrjeđenja s bakterijom inokulirano na kruti hranjivi medij KB u različitim vremenskim točkama izlaganja bakterije tretmanu (0, 1, 2, 4, 6 i 24 sata). Svaka kombinacija tretman × sat, inokulirana je na kruti hranjivi medij pomoću mikrobiološke eze. Nakon 24 sata inkubacije tretmana na krutom mediju, izbrojane su kolonije bakterije za svaku točku vremena, te je brojnost izražena kao CFU/mL. Vrijednosti CFU/mL transformirane su u logaritamsku skalu kako bi se dizajnirali grafikoni smrti bakterije nakon izlaganja tretmanu. Smanjenje CFU/mL >3 log u točki istraživnog vremena smatralo se baktericidnim djelovanjem tretmana.

3.10. Mehanizam antibakterijskog djelovanja eteričnog ulja mravinca (*Origanum compactum*) i komponente karvakrol kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Mehanizam djelovanja bioaktivnih tvari utvrđen je temeljem propusnosti stanične membrane, odnosno istjecanja staničnih metabolita bakterije prema modificiranim metodama Miksusanti i sur. (2008) te Elcocks i sur. (2019). Pokus je proveden na način da je čista kultura bakterije (10^6 CFU/mL) inokulirana u 10 mL hranjivog medija KBL. Zatim je po 1 mL suspenzije raspoređen u 10 Eppendorf tubica (ukupnog volumena 2,0 mL). Tubice su potom postavljene u uređaj za centrifugiranje. Centrifugiranje je provedeno tri puta za redom pri 4 800 rpm u trajanju od 15 minuta po ciklusu.

Nakon svakog ciklusa centrifuge, pažljivo je izbačen supernatant. Nakon odbacivanja supernatanta, u pelet bakterija je dodan medij KBL. Nakon zadnjeg ciklusa centrifugiranja, 3 mL suspenzije bakterije prebačeno je u staklene epruvete. U suspenziju su zatim dodani tretmani karvakrol i EtU *O. compactum* u koncentracijama jednakim vrijednostima MIK, 2× MIK i 4× MIK. Nakon aplikacije tretmana, epruvete su postavljene u inkubator–tresilicu na 160 rpm u trajanju od 2 sata. Uz tretmane je postavljena i kontrolna varijanta koja je sadržavala bakteriju u mediju KBL (bez tretmana).

Nakon inkubacije od 2 sata, prikupljen je filtrat na način da su suspenzije (kontrola i tretmani) filtrirane kroz sterilne filtre za antibiotike s porama Ø 0,22 µm pomoću medicinske injekcije bez igle. Dobiveni filtrat korišten je za određivanje koncentracije nukleinskih kiselina i proteina.

Koncentracija metabolita u filtratima utvrđena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 nm (nukleinske kiseline) i 280 nm (proteini). Za ova mjerenja korišten je spektrofotometar/fluorometar DeNovix (DeNovix Inc., Wilmington, DE, SAD). Kako bi se utvrdilo dolazi li do istjecanja unutarstaničnih metabolita, izmjerene su vrijednosti apsorbancije pri specifičnim valnim duljinama (260 nm za nukleinske kiseline i 280 nm za proteine) u supernatantima tretiranih uzoraka. Intenzitet djelovanja testiranih spojeva (ulja mravinca i spoja karvakrola) u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane suspenzije bakterije) utvrđen je kvantitativno, temeljem razlike u izmjerenoj apsorbanciji. Značajno veće vrijednosti apsorbancije u tretiranim uzorcima u usporedbi s negativnom kontrolom direktno su ukazivale na povećano istjecanje nukleinskih kiselina i proteina iz oštećenih stanica bakterije.

3.11. Fitotoksičnost karvakrola za sadnice masline

Potencijalna fitotoksičnost folijarne aplikacije fenola karvakrola utvrđena je za sadnice masline (*O. europaea* L.). Karvakrol je odabran za testiranje zbog povoljnih toksikoloških svojstava i izraženog antibakterijskog djelovanja (Andre i sur., 2016). Istraživanje je provedeno prema modificiranoj metodi Obanor i sur. (2008). U istraživanje je uključeno ukupno osam sadnica masline sorte Leccino, starosti 2–3 godine po tretmanu. Pokus je postavljen u lipnju 2023. godine, u plasteniku Instituta za poljoprivredu i turizam u Poreču, Hrvatska (45°13'02"N;13°36'09"E). Sadnice masline bile su navodnjavane sustavom za navodnjavanje.

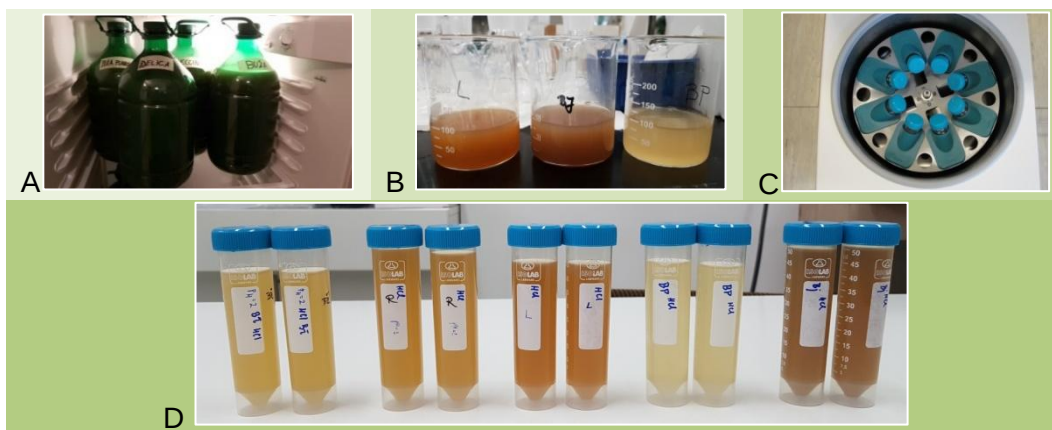
Kako bi se utvrdio intenzitet fitotoksičnosti s primijenjenom dozom, testirane su dvije koncentracije karvakrola, jednake vrijednostima MIK i 2× MIK prema *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u antibakterijskom dijelu istraživanja. Tretiranje biljaka vodom predstavljalo je kontrolnu varijantu tretmana. Tretmani su aplicirani pomoću ručne vrtne prskalice. Sadnice masline su tretirane otopinama u volumenu od 1,0 L po tretmanu, odnosno do postizanja potpunog prekrivanja biljaka tretmanima.

Fitotoksičnost je procijenjena temeljem vidljivih simptoma oštećenja, poput nekrotičnih lezija na listovima. Kako bi se utvrdio intenzitet štete na sadnicama masline, nakon 14 dana od tretiranja, izračunat je udio izbojaka s vidljivim oštećenjima listova u odnosu na ukupan broj izbojaka na sadnicama masline. Dodatno, utvrđen je udio oštećenih listova u odnosu na ukupni broj listova na sadnicama masline.

Osim toga, utvrđen je i utjecaj tretmana na svježiu i suhu masu listova, na način da je sa sadnica prikupljeno 20 oštećenih listova po biljci za svaki tretman, što ukupno čini 160 listova po tretmanu. Svježa masa uzoraka određena je odmah nakon prikupljanja, nakon ispiranja nečistoća i sušenja na sobnoj temperaturi. Suha masa listova određena je nakon 72 sata sušenja na 70 °C u sušioniku (Memmert UF 110, Memmert GmbH, Njemačka).

3.12. Biljna voda masline i hiroksitirozol (Kirby–Bauer metoda)

Uzorci biljne vode masline prikupljeni su 2021. godine u uljari u zapadnoj Istri (Hrvatska) te su prebačeni na Institut za poljoprivredu i turizam (Poreč, Hrvatska) nakon dvofazne ekstrakcije maslinovog ulja. Nakon prikupljanja, uzorci od pet različitih sorti masline (Istarska bjelica, Leccino, Rosinjola, Buža i Buža puntoža) čuvani su devet dana u hladnjaku na temperaturi od +4 °C (Russo i sur., 2022) (Slika 10A). Nakon toga, uzorci su podvrgnuti filtraciji (Slika 10B), nakon čega je tekuća faza, odnosno biljna voda masline, podvrgnuta centrifugiranju pri 4 000 rpm tijekom 10 minuta na +4 °C pomoću centrifuge Hettich 320 R (Hettich, Njemačka) (Slika 10C). Nakon centrifugiranja, tretmani su podijeljeni u dvije frakcije (Slika 10D). Ukupni volumen svake frakcije iznosio je 4,5 L. Kako bi se očuvali fenolni spojevi prisutni u uzorcima biljne vode od oksidacije, jedna je frakcija tretirana otopinom klorovodične kiseline (HCl), s ciljem postizanja konačne vrijednosti pH od 2,0 (Yakhlef i sur., 2018), dok je druga frakcija ostavljena kao netretirana.



Slika 10. Priprema tretmana biljne vode masline za ispitivanje antibakterijskog učinka. A) prikupljeni uzorci biljne vode masline nakon prerade ploda masline u uljari; B) filtrat netretirane biljne vode; C) centrifugiranje filtrata netretirane biljne vode; D) biljna voda masline (tretman). (Foto: S. Godena i E. Petrović)

Uzorci biljnih voda masline podijeljeni su u frakcije kako bi se utvrdilo je li zakiseljavanje kao predtretman značajno za antibakterijski potencijal i sadržaj fenolnih spojeva. Vrijednost pH uzoraka određena je pri sobnoj temperaturi pomoću pH metra (MP220 Basic pH/mV/°C Meter, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Njemačka), nakon kalibracije s referentnim certificiranim pH puferima (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Švicarska). Sukladno tome, uzorci su predstavljaju dvije skupine tretmana temeljem prisutnosti ili odsutnosti HCl-a. Prije analize ukupnog sadržaja fenola i primjene u testiranju antibakterijskog potencijala in vitro, frakcije tretmana čuvane su na -20 °C.

Osjetljivost izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* na tretmane biljne vode masline i HTyr, utvrđena je metodom difuzije aktivne tvari kroz kruti hranjivi medij pomoću diskova, prema

metodi Kirby–Bauer (Hudzicki, 2009). Na svaki disk pipetirano je 15 µL tretmana. Testiran je antibakterijski potencijal od ukupno pet biljnih voda masline (tretirane i netretirane klorovodičnom kiselinom) i fenola HTyr. Kao negativna kontrola korištena je sterilna destilirana voda. Kao pozitivne kontrole korišteni su tretmani antibiotikom tetraciklinom (Fisher Scientific, Hampton, NH, SAD) i komercijalno sredstvo na bazi bakra Nordox 75 WG (Syngenta, Basel, Švicarska) (Tablica 6). Kako bi se odvijala difuzija tretmana kroz hranjivu podlogu, Petrijeve zdjelice su prije inkubacije postavljene u hladnjak na +4 °C (dva sata). Nakon difuzije, Petrijeve su postavljene na inkubaciju na 27 °C u inkubator FOC 215i (VELP Scientifica®, Usmate Velate, MB, Italija). Nakon 24 sata inkubacije, promjer zone inhibicije oko diskova izmjeren je digitalnim pomičnim mjerilom.

Tablica 6. Popis tretmana za koje je utvrđena osjetljivost izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Skupina antimikrobnih tvari	Tretman	pH	Koncentracija tretmana
netretirane biljne vode	IB L R B BP	netretirano	nerazrijeđeno
tretirane biljne vode	IB+ L+ R+ B+ BP+	2,0	nerazrijeđeno
			mg/mL
Fenol	hidroksitirozol (HTyr)		2,50 1,25
Antibiotik	tetraciklin		0,50
Komercijalno sredstvo na bazi bakra	(Nordox 75 WG)		2,00

IB – Istarska bjelica, L – Leccino, R – Rosinjola, B – Buža, BP – Buža puntoža.

3.13. Određivanje ukupnog sadržaja fenola u uzorcima biljnih voda masline

Ukupni sadržaj fenola u uzorcima biljnih voda masline utvrđen je kolorimetrijski. U tu svrhu korišteni su Folin–Ciocalteu reagens (FCR) (Kemika, Hrvatska) i natrijev karbonat (Na_2CO_3) (Kemika, Hrvatska), nakon čega je uslijedilo spektrofotometrijsko očitavanje apsorbancije pri 725 nm (Carry UV/Vis 50, Varian Inc., Harbor City, CA, SAD).

Uzorci su pripremljeni tako da je 1,0 mL uzorka ili razrijeđenog uzorka/standardne otopine/praznog uzorka razrijeđeno s 5,0 mL vode (Elix 3, Millipore, Bedford, MA, SAD), nakon čega je dodano 0,5 mL FCR. Nakon tri minute, u otopinu je dodan 1,0 mL zasićene otopine Na_2CO_3 (20 g/L). Reakcijska smjesa promiješana je i ostavljena da stoji jedan sat prije spektrofotometrijskog očitavanja. Galna kiselina (GA) (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Njemačka) korištena je kao referentni uzorak, a pripremljena je razrjeđivanjem 0,1 g GA u 100 mL vode.

Kalibracijska krivulja izrađena je temeljem 10 standardnih otopina GA, pripremljenih u menzurama od 25 mL dodavanjem otopine GA u rasponu od 0,125 do 2,0 mL, kako bi se postigle koncentracije unutar linearnog raspona očitavanja apsorbancije spektrofotometra ($\text{Apsorbancija} = 0,4401 \times \text{Koncentracija} + 0,1125$; $R^2 = 0,9973$). Rezultati, korigirani za razrjeđenje uzorka u reakciji, izraženi su kao ekvivalenti GA (GAE) u 1,0 mL tretmana (mg GAE/mL). Mjerenja apsorbancije obavljena su u dvije repeticije, a rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost dva mjerenja s pripadajućom standardnom devijacijom (Tablica 7).

Tablica 7. Popis tretmana i koncentracija tretmana za koje je utvrđen antibakterijski potencijal kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Skupina antimikrobnih tvari	Tretman	pH	Početna koncentracija (mg/mL) *	Razrijeđenja						
Netretirane biljne vode	IB L R B BP	netretirano	nerazrijeđeno	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Tretirane biljne vode (pH=2)	IB+ L+ R+ B+ BP+	2,0	nerazrijeđeno	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Fenol	hidroksitirozol (HTyr)	n.d.	5,00	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Antibiotik	tetraciklin	n.d.	0,50							
Komercijalno sredstvo na bazi bakra	Nordox 75 WG	n.d.	2,00							

n.d.—nije determinirano; IB—Istarska bjelica, L—Leccino, R—Rosinjola, B—Buža, BP—Buža puntoža; *-koncentracija tretmana koja je korištena za određivanje osjetljivosti izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* difuzijom aktivne tvari pomoću diskova (Kirby–Bauer metoda)

3.14. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija biljne vode masline i fenola hidroksitirozola

Antibakterijski potencijal biljnih voda masline i fenolnog spoja HTyr, utvrđen je metodom (mikro)razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju (KBL). U tu svrhu korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica. Ukupni volumen svakog tretmana bio je 400 μ L. Tretmani su dvostruko serijski razrijeđeni, s početnom koncentracijom od $\frac{1}{2}$ ukupnog sadržaja fenola HTyr ili biljnih voda (tretirane HCl-om i netretirane).

MIK tretmana određene su nakon inkubacije u trajanju od 24 sata, temeljem razlika u očitavanju OD₆₀₀ suspenzije bakterije s i bez tretmana. Za usporedbu antibakterijskog djelovanja testiranih bioaktivnih tvari u odnosu na netretiranu kontrolu, postotak inhibicije rasta bakterija pri MIK vrijednostima izračunat je formulom:

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(A_{600} - B_{600})/A_{600}] \times 100$$

gdje A₆₀₀ predstavlja apsorbanciju kontrolnog tretmana (bakterija bez antimikrobne tvari), a B₆₀₀ apsorbanciju bakterije s testiranim antimikrobnim sredstvom pri određenom razrjeđenju. Apsorbancija je očitana pomoću spektrofotometrijskog uređaja TECAN Infinite 200 PRO (Männedorf, Švicarska).

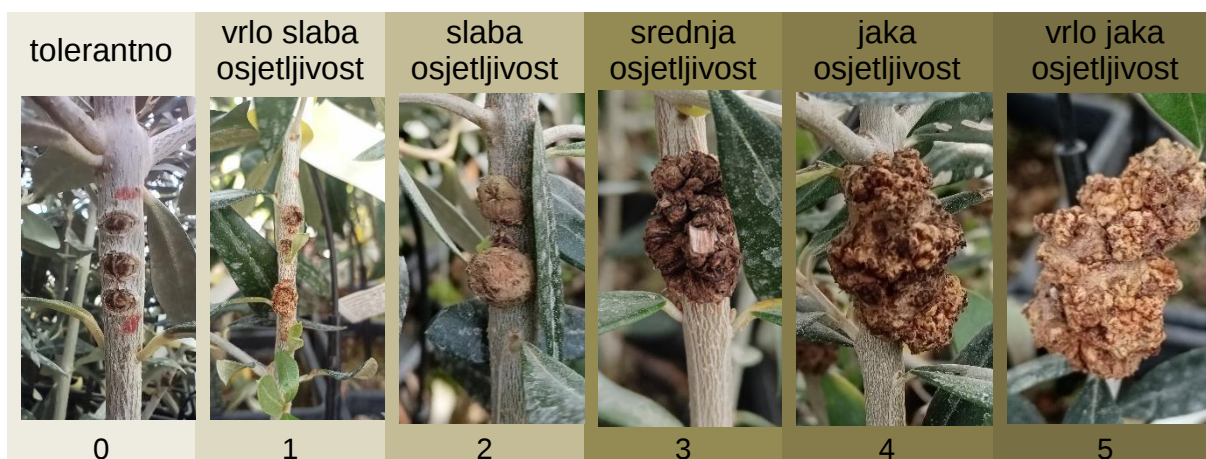
3.15. Analiza podataka

3.15.1. Antibakterijsko djelovanje bioaktivnih tvari

Podaci kvantitativnih testova antibakterijskog djelovanja EtU i njihovih komponenata, kao i istraživanja fitotoksičnosti karvakrola, podvrgnuti su analizi varijance (ANOVA) u računalnom programu R (verzija 4.2.2) (R Core Team, 2021). Podaci su analizirani pomoću funkcije *aov* kako bi se utvrdila značajnost razlika između tretmana. Značajnost razlika određena je pri $p \leq 0,05$. Nakon analize podataka, p -vrijednosti su prilagođene prema Benjamini-Hochbergovoj korekciji kako bi se smanjila mogućnost lažno pozitivnih rezultata. Usporedba srednjih vrijednosti provedena je funkcijom *contrast* iz paketa "multcomp" (Hothorn i sur., 2008). Učinkovitost tretmana u odnosu na antibiotik i sredstva na bazi bakra određena je Dunnett testom pomoću funkcije *DunnettTest* iz paketa "DescTools". Za izradu grafikona smrtnosti bakterije ovisno o vremenu izlaganja tretmanu, vrijednosti CFU/mL pretvorene su u logaritamsku skalu. *In vitro* pokusi provedeni su u najmanje tri ponavljanja. Značajne razlike u postotku inhibicije rasta bakterije pri MIK vrijednostima biljnih voda masline i HTyr, u usporedbi s negativnom kontrolom bez tretmana, utvrđene su t -testovima.

3.15.2. Test patogenosti bakterijskih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* i test osjetljivosti sorti masline na rak masline

Kako bi se procijenila virulentnost svakog testiranog izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, površina tumorastih izraslina (mm^2) po sorti masline uzeta je kao faktor determinacije. Razina osjetljivosti testiranih sorti masline na rak masline određena je temeljem dimenzija, odnosno promjera tumorastih izraslina (mm), za što je korišteno digitalno pomično mjerilo. Kategorizacija sorti masline temeljem dimenzija tumorastih izraslina, određena je prema prilagođenoj skali autora Abuamsha i sur. (2023), koristeći ocjene koje predstavljaju kategorije u rasponu od 0- tolerantno do 5 - vrlo jaka osjetljivost (Slika 11). Za utvrđivanje razlika u virulentnosti izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* i osjetljivosti sorti masline temeljem dimenzija tumorastih izraslina, podaci su analizirani dvofaktorskom analizom varijance u statističkom programu STATISTICA ver. 12.5 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). U analizi su izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* smatrani jednim faktorom, a sorte masline drugim faktorom. Značajne razlike u srednjim vrijednostima utvrđene su *post hoc* Tukey HSD testom pri $p \leq 0,05$.



Slika 11. Skala prema kojoj je utvrđena osjetljivost sorti masline na zarazu bakterijom *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Brojevi na slici predstavljaju ocjene temeljene na vrijednostima dimenzija tumora za određivanje osjetljivosti sorti masline na rak masline: 0: bez simptoma; 1: 1–5,5 mm; 2: 5,6–10,5 mm; 3: 10,6–15,5 mm; 4: 15,6–20,5 mm; i 5: >20,5 mm.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Identifikacija i karakterizacija uzročnika bakterioznog raka masline (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) u Istri

Istraživanjem provedenim na terenu, kojim je obuhvaćeno više od 600 hektara površine unutar 45 različitih maslinika, s ukupno prikupljenih 102 uzorka, utvrđena je prisutnost simptoma bakterioznog raka masline u Istri (Tablica 8). Većina analiziranih sorti pokazala je osjetljivost na ovu bolest, a najzastupljenije sorte u istraživanim maslinicima su Leccino (82,2%), Pendolino (71,1%), Istarska bjelica (68,9%) i Frantoio (53,3%).

Tablica 8 Udio i zaraženost sortimenta masline bakterioznim rakom masline u istraživanim maslinicima u 2021. i 2022. godini u Istri.

Sorta masline (prema navodima proizvođača)	Udio sortimenta (%)*	Zaraženost sortimenta (%)**
Leccino	82,2	54,1
Pendolino	71,1	46,9
Istarska bjelica	68,9	32,3
Frantoio	53,3	79,2
Buža	53,3	33,3
Maurino	15,6	71,4
Picholine	8,89	25,0
Moraiolo	8,90	50,0
Karbonaca	15,6	71,4
Rosinjola	13,3	33,3
Leccio del Corno	8,89	25,0
Porečka rosulja	6,67	33,3
Nocciara	2,22	100
Karbonera	2,22	100
Cipressino	2,22	100
Arbequina	2,22	100

* udio maslinika u kojima je prisutna sorta u odnosu na ukupan broj maslinika obuhvaćenih ovim istraživanjem; ** - Udio maslinika sa simptomima bolesti raka masline u odnosu na ukupan broj maslinika u kojima je prisutna sorta

Sorte Frantoio i Maurino te Karbonaca pokazuju osjetljivost unutar više od 70% maslinika u kojima su prisutne. Sorte Nocciara, Karbonera, Cipressino i Arbequina pokazuju 100% zaraženost, ali je njihov udio u sortimentu vrlo nizak (samo 2,22% maslinika), što znači da su pronađene u vrlo malo maslinika, ali u tim maslinicima su bile uvijek zaražene. Sorte Istarska bjelica, Picholine, Leccio del Corno, Buža i Rosinjola pokazuju osjetljivost na rak masline u 25 - 33,3% maslinika u kojima su prisutne.

Ukupan broj uzoraka za koje je molekularnom dijagnostikom određena prisutnost bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* bio je 32, što je udio od 31,4% od ukupnog broja uzoraka (Prilog 1). Najčešće je bakterija uspješno izolirana iz mladih tumorastih izraslina razvijenih na sorti Leccino, zatim Frantoio, Pendolino, Buža, te Karbonaca, Rosciola, Nocciara i nedeterminirane sorte (Tablica 9), dok je veći broj negativnih rezultata molekularne dijagnostike utvrđen kod izolacije patogena iz starih i suhih tumorastih izraslina.

Tablica 9. Popis molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* s pripadajućim nazivima simptomatičnih sorti masline i koordinatama maslinika u kojima su prikupljeni uzorci biljnog materijala.

Redni broj maslinika	Oznaka izolata	Sorta masline	Lokalitet	Koordinate maslinika (N; E)
1	V4B V4P	Buža Pendolino	Vodnjan	44°56'99"; 13°51'81"
2	V7K	Karbonaca	Vodnjan	45°57'99"; 13°51'81"
3	V9B	Buža	Vodnjan	44°58'58"; 13°49'52"
4	R12L	Leccino	Rovinj	45°06'12"; 13°69'24"
5	P15 TR P15 N	Rosciola Nocciara	Poreč	45°17'12"; 13°39'56"
6	B17L	Leccino	Buje	45°21'40"; 13°23'56"
7	B19 F B19 L B19 P	Frantoio Leccino Pendolino	Buje	45°24'50"; 13°35'14"
8	B21 L B21 F	Leccino Frantoio	Buje	45°22'45"; 13°43'38"
9	B23 F	Frantoio	Buje	45°20'20"; 13°33'31"
10	I6 L I7 L	Leccino	Poreč	45°22'34"; 13°60'25"
11	NIN	nepoznata	Pula	44°89'56"; 13°81'82"
12	U26 F	Frantoio	Umag	45°24'27"; 13°33'24"
13	U27 F	Frantoio	Umag	45°28'43"; 13°30'43"
14	VS28 N	nepoznata	Višnjan	45°15'58"; 13°43'20"
15	VS28 L	Leccino	Višnjan	45°15'58"; 13°43'20"
16	VS29 L	Leccino	Višnjan	45°17'53"; 13°42'50"
17	VS31 L	Leccino	Višnjan	45°14'44"; 13°42'15"
18	R34 F	Frantoio	Rovinj	45°02'53"; 13°44'10"
19	BR37 L	Leccino	Brtonigla	45°22'48"; 13°36'28"
20	N40 M	Maurino	Novigrad	45°21'46"; 13°33'46"
21	N41 F	Frantoio	Novigrad	45°21'34"; 13°35'77"
22	N42 F	Frantoio	Novigrad	45°21'06"; 13°35'01"
23	N43 L N43 P	Leccino Pendolino	Novigrad	45°22'05"; 13°33'40"
24	P44 F	Frantoio	Poreč	45°14'26"; 13°42'17"
25	B45 C- PR	Porečka rosulja	Buje	45°24'42"; 13°30'10"

Utvrđeno je da su simptomi bakterioznog raka masline uglavnom bili prisutni na granama masline, a samo u nekoliko maslinika primijećeno je intenzivno pucanje kore grana, te tumoraste izrasline formirane na deblu masline. Od ukupno prisutnih sorti obuhvaćenih ovim istraživanjem, simptomi bakterioznog raka masline nisu primijećeni na osam sorti, iako se uzgajaju u zahvaćenim maslinicima sa simptomatičnim sortimentom. Tako je odsutnost simptoma utvrđena na sortama: Grignan, Ravecce, Coratina, Verzola, Itrana, Leccione i Žižolera. Tumoraste izrasline na zaraženom biljnom materijalu bile su različitog promjera i mase (Tablica 10). Promjer simptoma bio je u rasponu od 0,7 cm kod sorti Leccino, Buža i Karbonaca do više od 1,0 cm kod sorti Leccino, Pendolino, Frantoio i nedeterminirana sorta. Najveći promjer (1,8 cm) utvrđen je na uzorcima sorte Frantoio prikupljenih u masliniku na sjevernijem lokalitetu u Istri, odnosno na području grada Buje. Masa tumorastih izraslina kretala se od 0,21 g (sorta Karbonaca i Porečka rosulja) do 2,23 g (sorta Pendolino).

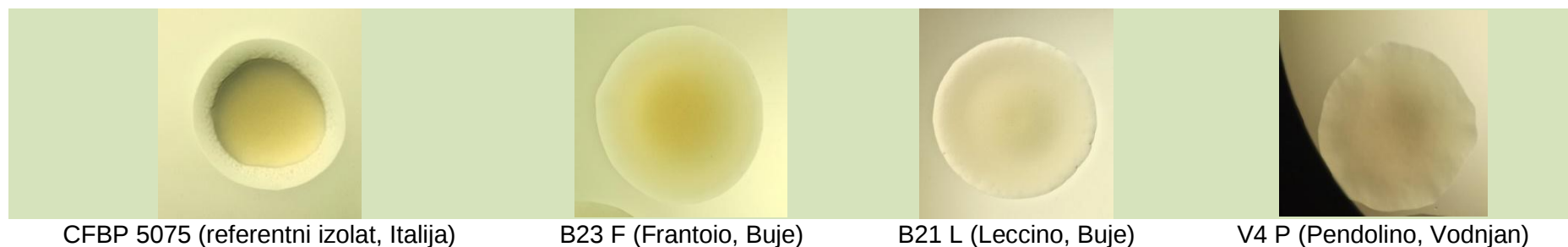
Za izolate uzročnika raka masline *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, utvrđeno je da formiraju okrugle kolonije svijetlo sive do žute pigmentacije s glatkim marginama i pigmentacijom središta. Promjer kolonija na hranjivoj podlozi KB bio je 1,0–3,0 mm (Slika 12). Testiranjem izolata na temelju LOPAT sheme, utvrđeno je da proizvodnja fluorescentnog pigmenta na krutom hranjivom mediju KB nije karakteristična za veći udio izolata. Ostala svojstva su se kod >70% izolata podudarala s očekivanim rezultatima sheme za vrstu *P. savastanoi* (Tablica 11).

Tablica 10. Karakterizacija i opis simptoma i kolonija molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* prikupljenih 2021.i 2022. godine prilikom terenskih istraživanja u maslinicima u Istri.

Oznaka izolata bakterije	Sorta masline	Simptomi zaraze		Kolonije izolata <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>					
		Promjer tumora (cm) (n=10)	Masa tumorastih izraslina (g) (n=10)	Promjer kolonija nakon 24 sata (mm)	Oblik	Pigment	Margine	Pigmentacija središta kolonije	UVF
V4 B	Buža	0,7±0,1	0,51±0,16	2,0	okrugle	s-b, ž	glatke	+	-
V4 P	Pendolino	0,9±0,2	0,75±0,28	2,0-3,0	okrugle i ovalne	s-b	gatke i valovite	+	+
V7 K	Karbonaca	0,7±0,1	0,21±0,08	2,0-3,0	okrugle i ovalne	ž	glatke i valovite	+	-
V9 B	Buža	0,9±0,1	0,54±0,13	2,0-3,0	okrugle	s-b, ž	glatke	+	-
R12 L	Leccino	0,8±0,2	0,28±0,18	2,0-5,0	okrugle i ovalne	f,b	glatke	+	+
P15 TR	Rosciola	0,8±0,2	0,22±0,06	1,0-3,0	okrugle	s-b	glatke	+	+
P15 N	Nocciara	0,8±0,1	0,51±0,15	2,0-3,0	okrugle	s-b,f	glatke	+	+
B17 L	Leccino	1,1±0,2	0,88±0,25	1,0-2,0	okrugle	ž	glatke	+	-
B19 F	Frantoio	1,2±0,4	1,67±0,52	3,0	okrugle	s-b, f	glatke	+	+
B19 L	Leccino	1,3±0,2	1,20±0,34	2,0	okrugle	ž	glatke	+	-
B19 P	Pendolino	1,0±0,2	0,70±0,19	2,0-3,0	okrugle i ovalne	s-b, f	glatke	-	+
B21 F	Frantoio	0,9±0,2	0,44±0,17	1,0-3,0	okrugle i ovalne	s-b, f	glatke	+	+
B21 L	Leccino	1,4±0,2	1,80±0,50	1,0-2,0	okrugle	ž	glatke	-	-
B23 F	Frantoio	1,8±0,3	1,58±0,34	1,0-2,0	okrugle	s-b	glatke	+	-
I6 L	Leccino	1,0±0,1	0,41±0,15	2,0-3,0	okrugle	s-b, f	glatke i naborane	+	+
I7 L	Leccino	0,9±0,1	0,30±0,08	1,0-2,0	okrugle	s-b	glatke	+	-
NIN	Nepoznata	n.p.	n.p.	2,0	okrugle	s-b	glatke	+	-
CFBP 5075 (IT)	-	n.p.	n.p.	1,0-2,0	okrugle i ovalne	f, b	glatke	+	+
U26 F	Frantoio	1,3±0,3	1,39±0,54	2,0	okrugle	ž	glatke	+	-
U27 F	Frantoio	1,2±0,3	0,92±0,24	2,0-3,0	okrugle	ž	glatke	+	-
VŠ28 L	Leccino	0,9±0,1	0,62±0,18	1,0-2,0	okrugle	ž	glatke i naborane	+	-
VŠ 28 N	Nepoznata	1,2±0,2	1,24±0,35	2,0-3,0	okrugle	ž	glatke i valovite	+	-
VŠ29 L	Leccino	0,9±0,3	0,81±0,17	1,0-2,0	okrugle	b	glatke	+	-
VŠ31 L	Leccino	0,9±0,2	0,55±0,18	1,0-2,0	okrugle i ovalne	b	glatke	+	-
R34 F	Frantoio	1,2±0,4	1,04±0,32	2,0-3,0	okrugle i ovalne	b	glatke	-	-

BR37 L	Leccino	0,7±0,1	0,47±0,12	2,0	okrugle	ž	glatke i valovite	-	-
N40 M	Maurino	0,8±0,2	n.p.	2,0-3,0	ovalne i okrugle	bž	glatke	-	-
N41 F	Frantoio	1,4±0,3	0,63±0,27	2,0-3,0	ovalne i okrugle	bž	glatke	+	-
N42 F	Frantoio	1,4±0,3	1,33±0,91	2,0-3,0	ovalne i okrugle	bž	glatke	-	-
N43 L	Leccino	1,3±0,4	0,35±0,22	2,0	okrugle	sb	glatke	+	-
N43 P	Pendolino	1,6±0,3	2,23±1,43	2,0-3,0	okrugle i ovalne	sb	glatke	+	-
P44 F	Frantoio	1,1±0,2	0,47±0,20	2,0-3,0	okrugle	sb	glatke	-	-
B45 C-PR	Porečka rosulja	0,9±0,1	0,21±0,09	2,0-3,0	okrugle	sb	glatke	-	+

+ = pozitivno; - = negativno; n.p. – nije primjenjivo; (b) bijeli pigment, (s-b) sivo-bijeli, (ž) žuti, (bž) blijedo žuti, (f) fluorescentni; UVF – proizvodnja fluorescentnog pigmenta.



Slika 12 Prikaz kolonija referentnog izolata i nekoliko molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izoliranih iz biljnog materijala iz istraživanih maslinika u Istri. Kolonije čiste kulture uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi King's B (KB) snimljene su mikroskopom pri povećanju 4×.

Tablica 11. Biokemijski profil molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* iz maslinika u Istri prema LOPAT shemi.

Redni broj	Oznaka izolata	Sorta masline	L	O	P	A	T
1	V4 B	Buža	-	-	-	-	-
2	V4 P	Pendolino	-	-	-	-	-
3	V7 K	Karbonaca	-	-	-	-	+
4	V9 B	Buža	-	-	-	-	+
5	R12 L	Leccino	-	-	-	-	+
6	P15 TR	Rosciola	-	-	-	-	+
7	P15 N	Nocciara	-	-	-	-	+
8	B17 L	Leccino	-	-	-	-	+
9	B19 F	Frantoio	-	-	-	-	+
10	B19 L	Leccino	-	-	-	-	+
11	B19 P	Pendolino	-	-	-	-	+
12	B21 F	Frantoio	-	-	-	-	+
13	B21 L	Leccino	-	-	-	-	+
14	B23 F	Frantoio	-	-	-	-	+
15	16 L	Leccino	-	-	-	-	+
16	17 L	Leccino	-	O	-	-	+
17	NIN	nepoznata	-	-	-	-	+
18	U26 F	Frantoio	-	-	-	-	+
19	U27 L	Leccino	-	-	-	-	+
20	VS28 L	Leccino	-	O	-	-	+
21	VS28 N	nepoznata	-	O	-	-	+
22	VS29 L	Leccino	-	O	-	-	+
23	VS31 L	Leccino	-	-	-	-	+
24	R34 F	Frantoio	-	-	-	-	+
25	BR37 L	Leccino	-	-	-	-	+
26	N40 M	Maurino	-	-	-	-	+
27	N41 F	Frantoio	-	-	-	-	+
28	N42 F	Frantoio	-	-	-	-	+
29	N43 L	Leccino	-	-	-	-	+
30	N43 P	Pendolino	-	-	-	-	+
31	P44 F	Frantoio	-	+	-	-	+
32	B45 C-PR	Porečka rosulja	-	+	-	-	+
Udio izolata po svojstvu (%)	Pozitivno		100	6,23	0,00	0,00	100
	Negativno		0,00	80,50	100	100	0,00
	Odgođeno pozitivno		n.p.	12,50	n.p.	n.p.	n.p.

+ = pozitivno; - = negativno; O = odgođeno pozitivno; n.p. – nije primjenjivo.; L – proizvodnja levana; O – aktivnost oksidaze; P – pektolitička aktivnost; A – aktivnost arginin dehidrogenaze; T – hipersenzitivna reakcija na listovima duhana.

4.2. Virulentnost bakterijskih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* i osjetljivost sorti masline na rak masline

Osjetljivost hrvatskih autohtonih i introduciranih talijanskih sorti masline na rak masline, te virulentnost izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* prikazani su u tablici 12, a temeljeni su na dimenzijama tumorastih izraslina na sadnicama masline šest mjeseci nakon zaraze u uvjetima plastenika.

Dvofaktorskom analizom varijance, utvrđena je značajna razlika u dimenzijama tumorastih izraslina ovisno o zaraženoj sorti masline i inokuliranom izolatu bakterije. Temeljem prosječnih vrijednosti promjera tumorastih izraslina, sve istraživane sorte pokazale su slabu osjetljivost na rak masline, osim sorte Rosinjola (ocjena 4), koja se, prema autorima Abuamsha i sur. (2023), može definirati kao srednje osjetljiva sorta. Prosječno najveće vrijednosti promjera tumorastih izraslina (više od 20 mm) utvrđene su na sadnicama sorte Rosinjola i Frantoio zaraženima s hrvatskim izolatom I7 L. Od navedenih se nije značajno razlikovala sorta Rosinjola zaražena sa slovenskim izolatom A1-1 i hrvatskim izolatom P15 N. Prosječan promjer tumora na sadnicama sorte Rosinjola bio je 19,35 mm, neovisno o izolatu *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Temeljem promjera tumorastih izraslina, sorta Leccino se statistički nije razlikovala u osjetljivosti na rak masline od sorte Frantoio kada su sadnice bile zaražene referentnim izolatom i s dva hrvatska izolata (P15 N i B45 C-PR). Sorta Leccino se od sorte Buža značajno razlikovala isključivo kada su sadnice bile zaražene hrvatskim izolatom P15 N. Promjer tumorastih izraslina razlikovao se među sortama. Kod sorte Leccino, promjer se kretao od 8,94 mm do 17,17 mm, s prosječnom vrijednosti od 14,51 mm. Za sortu Frantoio, zabilježeni promjer iznosio je od 8,21 mm do 21,44 mm, uz prosječnu vrijednost od 14,27 mm. Dok se kod sorte Buža, promjer tumorastih izraslina kretao se od 8,18 mm do 17,90 mm, s prosječnom vrijednosti od 12,96 mm. Za sortu Istarska bjelica utvrđena je najniža razina osjetljivosti na rak masline, osim u slučaju zaraze s hrvatskim izolatom I7 L. Sorta Istarska bjelica se od ostalog sortimenta nije razlikovala temeljem prosječnih vrijednosti promjera tumora kada su sadnice zaražene referentnim izolatom *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Promjer tumora na ovoj sorti kretao se u rasponu 8,65 do 14,89 mm, s prosječnom vrijednosti od 11,12 mm.

Tablica 12. Ocjena osjetljivosti sortimenta masline temeljem promjera tumorastih izraslina nakon zaraze s pet izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost 60 mjerenja±standardna devijacija.

Sorta masline (SM)	Izolati <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (Pss)					Prosjeck po sorti	ocjena*	SM × Pss
	CFBP 5075	A1-1	I7 L	P15 N	B45 C-PR			
Frantoio	14,73±0,85c–f	10,22±0,94f–j	21,44±0,59ab	16,75±0,85c–e	8,21±0,74j	14,27±0,45	3	***
Leccino	14,11±0,95d–g	15,71±1,17c–e	16,60±1,06c–e	17,17±0,65b–e	8,94±0,93ij	14,51 ±0,46	3	
Rosinjola	17,49±1,30b–e	22,87±1,05a	22,57±0,97a	19,39±0,88a–c	14,43±1,08d–f	19,35±0,51	4	
Buža	13,80±0,94d–h	14,06±0,92d–h	17,90±0,81b–d	10,88±0,92f–j	8,18±0,75j	12,96±0,43	3	
Istarska bjelica	13,03±0,85e–i	9,62±0,87g–j	14,89±0,64c–f	8,65±0,77ij	9,43±0,68h–j	11,12±0,37	3	
Prosjeck po izolat	14,63±0,45	14,50±0,52	18,68±0,41	14,57±0,43	9,84±0,40			

*-ocjena kategorije osjetljivosti prema skali Ambuasha i sur. (2023); ***-značajnost interakcije faktora temeljem dvofaktorske analize varijance pri $p < 0,001$

Temeljem površine tumorastih izraslina (mm^2) na zaraženim sadnicama masline, najslabija virulentnost utvrđena je kod hrvatskog izolata B45 C-PR. U usporedbi s površinom tumorastih izraslina na sadnicama koje su zaražene drugim izolatima, na svim sortama masline, razvijeni su tumori manjih dimenzija (Tablica 13). Prosječna vrijednost površine tumora, neovisno o sorti masline, bila je $112,39 \text{ mm}^2$. Najveće prosječne vrijednosti površine tumorastih izraslina utvrđene su inokulacijom hrvatskih izolata I7 L i P15 N ($258,39$ i $175,90 \text{ mm}^2$). Izolat I7 L bio je izrazito virulentan za sortu Rosinjola ($401,56 \text{ mm}^2$), zajedno sa slovenskim izolatom A1-1 ($377,97 \text{ mm}^2$). Iako je izolat B45 C-PR bio slabije virulentan od drugih izolata, čak je i zaraza tim izolatom dovela do formiranja značajno većih tumora na sorti Rosinjola u usporedbi s ostalim zaraženim sortama masline. Izolat A1-1 je bio najslabije virulentan prema sorti Frantoio i Istarska bjelica ($<85 \text{ mm}^2$), P15 N prema Istarskoj bjelici ($\approx 70 \text{ mm}^2$), a izolat B45 C-PR prema sorti Frantoio, Istarska bjelica i Buža ($<80 \text{ mm}^2$).

Tablica 13. Površina tumorastih izraslina nakon inokulacije pet sorti masline s pet izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost 60 mjerenja $\pm$ standardna devijacija.

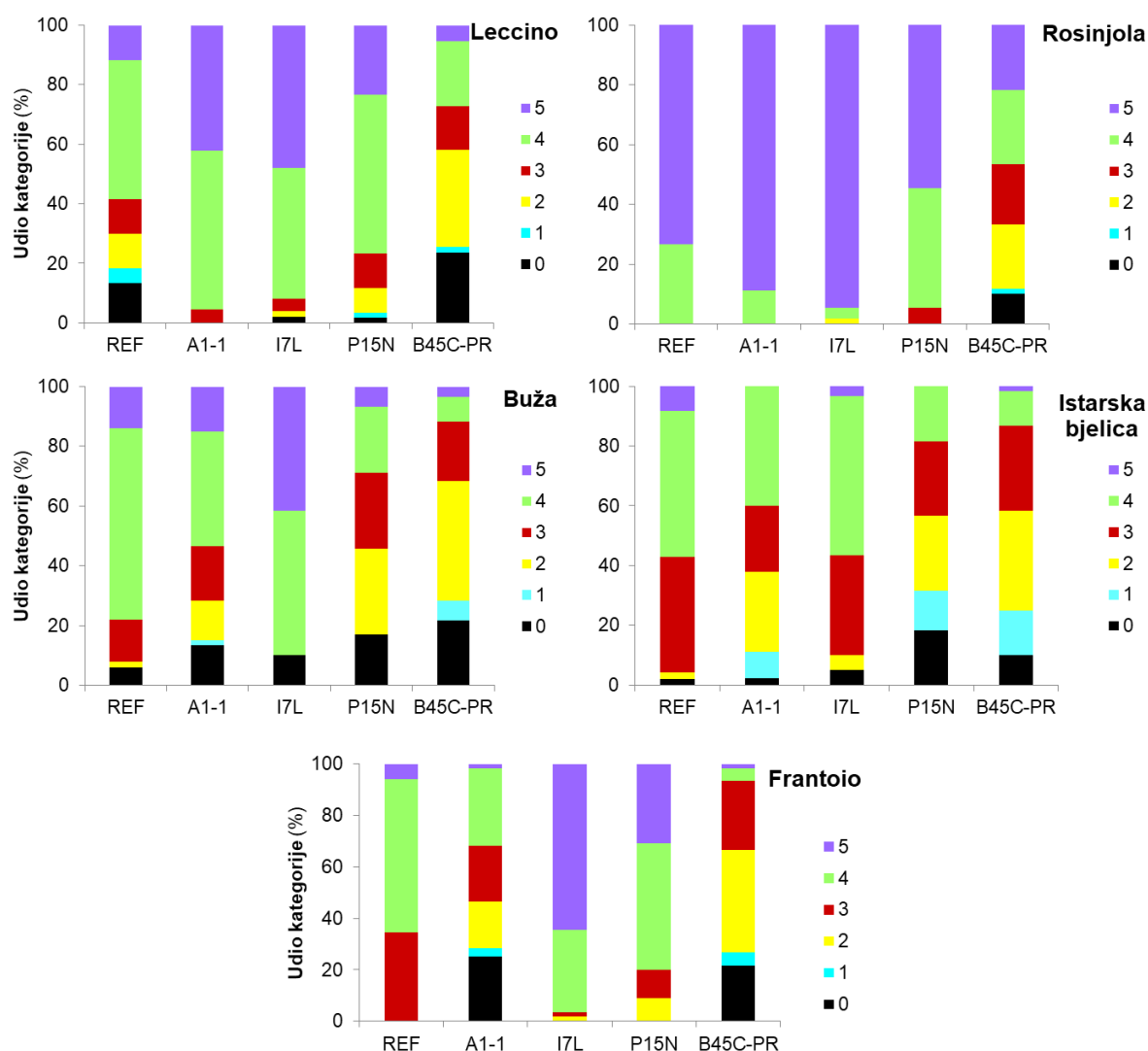
Sorta masline (SM)	Izolati <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (Pss)					Prosjeck po sorti	SM $\times$ Pss
	CFBP 5075	A1-1	I7 L	P15 N	B45 C-PR		
Frantoio	124,48 $\pm$ 9,59e–g	82,04 $\pm$ 10,19g–i	309,99 $\pm$ 17,53b	203,26 $\pm$ 15,65cd	79,37 $\pm$ 9,14hi	159,83 $\pm$ 7,64	***
Leccino	166,34 $\pm$ 15,43de	197,96 $\pm$ 19,13cd	232,56 $\pm$ 17,62c	212,39 $\pm$ 12,63c	95,21 $\pm$ 12,16f–i	180,89 $\pm$ 7,48	
Rosinjola	285,65 $\pm$ 25,65b	377,97 $\pm$ 23,07a	401,56 $\pm$ 23,38a	287,29 $\pm$ 22,48b	230,67 $\pm$ 25,94c	316,63 $\pm$ 11,34	
Buža	134,54 $\pm$ 11,42ef	126,45 $\pm$ 11,43ef	211,68 $\pm$ 11,12c	105,89 $\pm$ 11,25f–i	78,79 $\pm$ 9,26hi	131,47 $\pm$ 5,49	
Istarska bjelica	115,02 $\pm$ 9,16f–h	65,42 $\pm$ 6,98i	136,15 $\pm$ 8,35ef	70,65 $\pm$ 7,33i	77,91 $\pm$ 7,49hi	93,03 $\pm$ 3,86	
Prosjeck po izolatu	165,21 $\pm$ 7,78	169,97 $\pm$ 9,48	258,39 $\pm$ 9,00	175,90 $\pm$ 7,96	112,39 $\pm$ 7,29		

***-značajnost interakcije faktora analize temeljem dvofaktorske analize varijance pri $p < 0,001$

4.3. Analiza osjetljivosti sorti masline na bakterijski rak masline

Temeljem udjela (%) tumorastih izraslina, definiranog kao broj tumora/opažanja unutar svake ocjene prema skali Abuamsha i sur. (2023), u odnosu na ukupan broj opažanja (60 tumorastih izraslina) po izolatu $\times$ sorti, utvrđena je osjetljivost sorti masline na bakterijski rak masline. Osjetljivost je analizirana temeljem promjera tumorastih izraslina ovisno o inokuliranom izolatu *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Grafikon 1).

Zarazom sadnica sorte Leccino utvrđena je prisutnost tumorastih izraslina koji odgovara ocjenama 4 ili 5 više od 50%. kada su zaražene svim izolatima *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, osim B45 C-PR. Na sadnicama sorte Leccino koje su zaražene izolatom B45 C-PR, najvećim udjelom su razvijeni tumori promjera koji odgovara rasponu vrijednosti ocjene 2 (32,7%), uz manji udio tumora ocjene 0, 4 i 3. Najmanji udio razvijenih tumora na sorti Leccino bilo je promjera većeg od 20 mm (ocjena 5). Više od 50% tumora na sadnicama sorte Rosinjola bilo je promjera većeg od 20 mm (ocjena 5), osim kada su sadnice zaražene izolatom B45 C-PR, gdje je utvrđen približno jednak udio tumora koji odgovaraju rasponu vrijednosti ocjena 2 i 5. Na 10% mjesta inokulacije utvrđena je odsutnost tumora na sadnica sorte Rosinjola zaraženih sa izolatom B45 C-PR. Veće ocjene tumorastih izraslina utvrđene su na sadnicama sorte Buža koje su bile zaražene sa izolatima CFBP 5075, A1-1 i I7 L, dok je veća varijabilnost u ocjenama i udjelu tumora temeljem promjera, utvrđena na sadnicama zaraženim s izolatima P15 N i B45 C-PR. Na sadnicama sorte Buža koje su zaražene izolatom P15 N, utvrđen je razvoj tumora čiji promjer odgovara vrijednostima ocjena 2–4, s udjelom mjesta inokulacije više od 20% u svakoj ocjeni i 17% mjesta inokulacije bez tumora (ocjena 0). Kod sadnica zaraženih izolatom B45 C-PR, najveći udio tumora svrstano je u ocjenu 2 (40%), dok se tumori nisu razvili na 22% mjesta inokulacije. Kod sorte Istarska bjelica, na više od 40% mjesta inokulacije utvrđen je razvoj tumora čiji promjer odgovara rasponu vrijednosti ocjene 4. Odsutnost tumora zabilježena je na 18% mjesta inokulacije kada su sadnice bile zaražene izolatom P15 N i na 10% mjesta kada su zaražene izolatom B45 C-PR. Kod sorte Frantoio utvrđena je najveća varijabilnost u promjeru tumora, uz najveći udio mjesta inokulacije bez razvijenih simptoma zaraze (ocjena 0). Tumori koji promjerom pripadaju u raspon vrijednosti ocjene 4, bili su prisutni na približno 30–60%, a tumora ocjene 5 na 30–70% mjesta inokulacije, ovisno o izolatu *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Najveći udio mjesta inokulacije bez prisutnosti simptoma zaraze, utvrđen je na sadnicama sorte Frantoio koje su zaražene izolatima A1-1 i B45 C-PR (25% i 22%).



Grafikon 1. Virulentnost pet izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni soj CFBP 5075 iz Italije, slovenski izolat A1-1, hrvatski izolati I7 L, P15 N i B45 C-PR), temeljen na broju tumora/opažanja unutar svake skupine ocjene u odnosu na ukupan broj opažanja (60 tumorastih izraslina) po izolatu × sorti. Razvijeni simptomi su svrstani u ocjene/kategorije od 0 do 5 (legenda) prema prilagođenoj verziji skale autora Ambuasha i sur. (2023): 0: bez simptoma; 1: 1–5,5 mm; 2: 5,6–10,5 mm; 3: 10,6–15,5 mm; 4: 15,6–20,5 mm; 5: >20,5 mm.

4.4. Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti

4.4.1. Osjetljivost *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* na eterična ulja i njihove komponente

Testiranjem osjetljivosti referentnog izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (CFBP 5075) na EtU i njihove komponente, utvrđeno je da osjetljivost bakterije ovisi o tretmanu i koncentraciji tretmana (Tablica 14). Učinkovitost tretmana procijenjena je temeljem veličine zone inhibicije oko diska s tretmanom (mm). Od ukupno 36 testiranih tretmana, njih 34 pokazalo je inhibicijski učinak na rast *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Usporedba s referentnim tretmanima, antibiotikom i sredstvom na bazi bakarnog spoja, potvrdila je značajnu osjetljivost patogena na ove testirane tvari

Najveća zona inhibicije rasta bakterije (veća od 20 mm) utvrđena je na tretmanu s EtU od timijana (*T. vulgaris*) i mravinca (*O. compactum*) te na tretmanu karvakrol u nerazrijeđenom obliku. Izolat *P. savastanoi* pv. *savastanoi* bio je osjetljiviji na navedene tretmane u odnosu na tretman bakrom. Također je utvrđeno da se primjenom nižih koncentracija smanjivala inhibicija rasta bakterije oko diskova, što sugerira da je jačina učinka testiranih tvari proporcionalna primijenjenoj koncentraciji. Međutim, primijećena je iznimka na tretmanu EtU od muškatne kadulje (*S. sclarea*) i njegove komponente linalil acetat. Na tim tretmanima je *P. savastanoi* pv. *savastanoi* bio osjetljiviji kada su primijenjeni u razrijeđenom obliku, pri čemu je antibakterijski potencijal bio izraženiji pri najnižim testiranim koncentracijama (K2).

Tablica 14. Inhibicija rasta *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (mm) pri tri različite koncentracije tretmana metodom difuzije aktivne tvari pomoću diskova (srednja vrijednost±standardna pogreška). Testiran je učinak koncentracije nerazrijeđenog eteričnog ulja ili komponente ulja ili razrijeđene krute tvari - K1; razrjeđenje ulja timijana (*Thymus vulgaris*) i mravinca (*Origanum compactum*) od 20 mg/mL, ostala EtU 40 mg/mL i komponente ulja od 5,0 mg/mL - K2; razrjeđenja ulja i komponenti od 50 mg/mL – K3.

Skupina	Tretman	Inhibicija rasta <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (zona inhibicije oko diska, mm)		
		K1*	K2	K3
Eterična ulja	paprena metvica (<i>Mentha × piperita</i>)	8,60±0,90 ⁺	9,00±1,10 ⁺	8,50±3,30 ⁺
	timijan (<i>Thymus vulgaris</i>)	21,1±3,00 ⁺⁺	8,50±1,00 ⁺	10,1±1,00 ⁺
	mravinac (<i>Origanum compactum</i>)	20,3±2,30 ⁺⁺	8,90±0,80 ⁺	10,2±0,70 ⁺
	mažuran (<i>Origanum majorana</i>)	10,2±1,10 ⁺	9,80±0,60 ⁺	10,3±0,60 ⁺
	kadulja (<i>Salvia officinalis</i>)	13,2±2,50 ⁺	8,60±0,80 ⁺	9,40±0,80 ⁺
	muškatna kadulja (<i>Salvia sclarea</i>)	0,00±0,00 ^x	8,90±1,00 ⁺	8,30±0,80 ⁺
Komponente eteričnih ulja	DL-mentol	9,60±0,40 ⁺	8,30±3,00 ⁺	9,30±1,70 ⁺
	timol	9,10±0,70 ⁺	10,5±1,70 ⁺	10,0±0,90 ⁺
	karvakrol	28,5±4,00 ⁺⁺	9,30±0,70 ⁺	9,80±0,80 ⁺
	Linalil acetat	0,00±0,00 ^x	8,50±1,10 ⁺	7,80±1,00 ⁺
	(-)-terpinen-4-ol	10,8±2,20 ⁺	9,00±0,90 ⁺	9,10±0,90 ⁺
	α,β - tujon	11,7±0,90 ⁺	10,2±0,70 ⁺	9,20±0,50 ⁺
Antibiotik	tetraciklin	36,2±0,00	/	/
Komercijalno sredstvo na bazi bakra	Nordox 75 WG	16,3±0,70	/	/
Negativna kontrola	sterilna destilirana voda	0,00±0,00	/	/

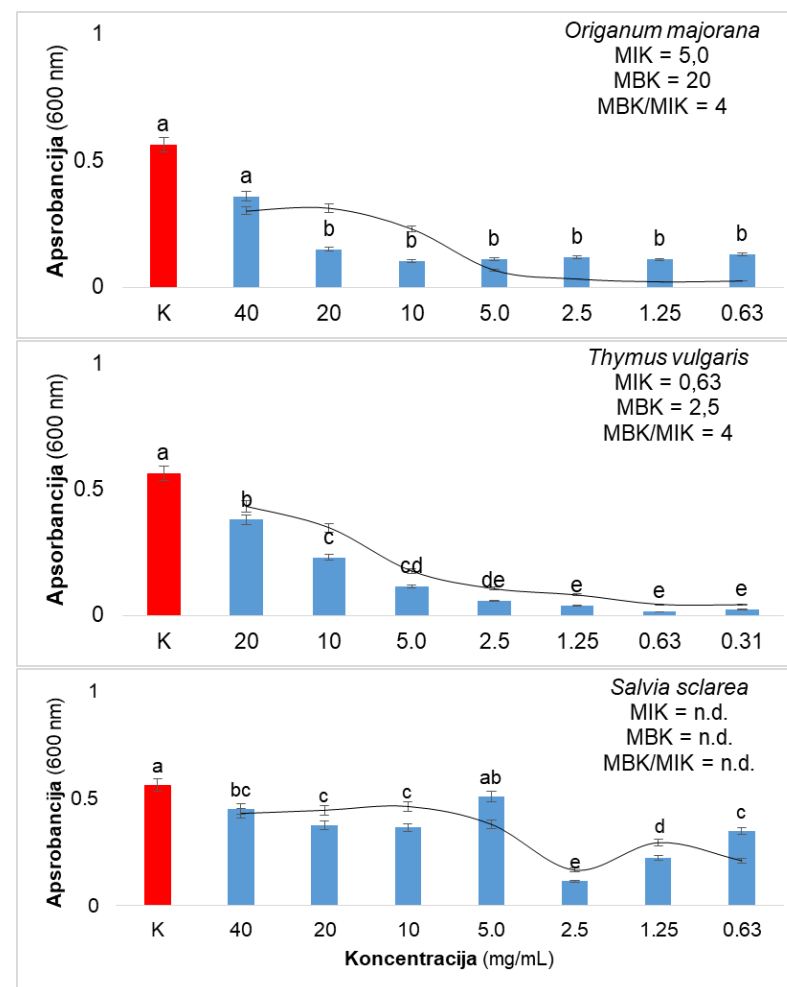
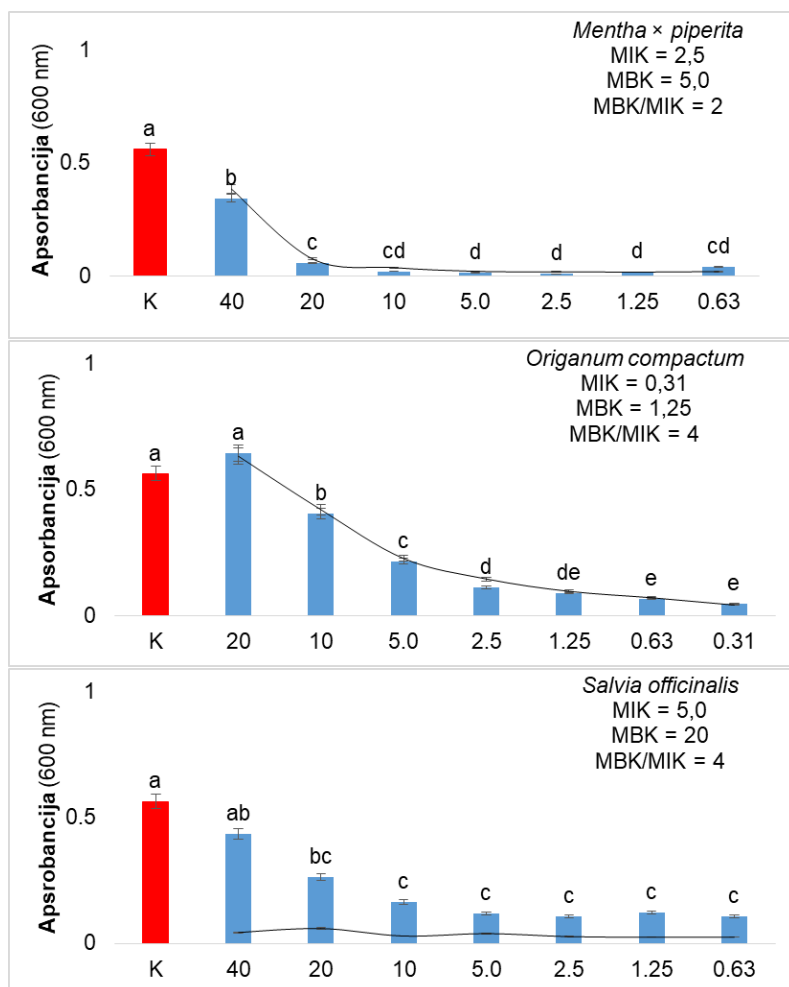
*K1 od DL-mentola i timola predstavlja razrijeđene tretmane (10 mg/mL) zbog kristalne strukture tvari; Učinak tretmana je utvrđen prema modificiranoj skali Aires i sur. (2009) x- bez učinka; +- zona inhibicije veća od nule, ali manja od antibiotika i komercijalnog sredstva; ++- zona inhibicije veća od tretmana komercijalnim sredstvom, ali manja od antibiotika.

4.4.2. Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije eteričnih ulja i njihovih komponenti za *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

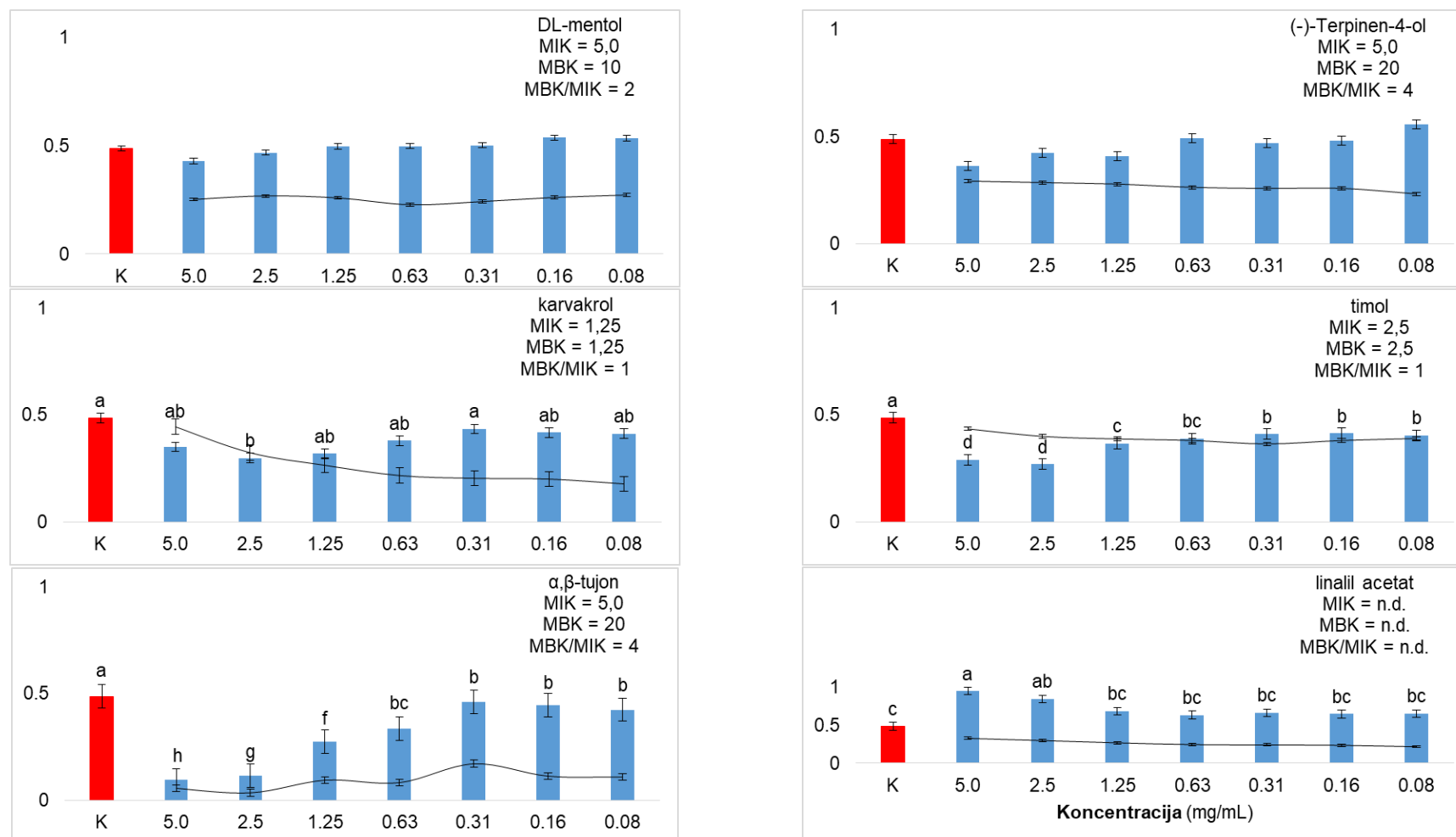
Analizom varijance utvrđene su značajne razlike između koncentracija unutar pojedinog tretmana temeljem vrijednosti OD₆₀₀ (Grafikon 2). Vrijednosti MIK i MBK bile su značajno različite od kontrolnog tretmana (suspenzija bakterije) za sve testirane tvari. Kod tretmana su mjerenja koncentracija kontrolnih tretmana bez bakterije bila slična vrijednostima tretmana paprene metvice (*Mentha × piperita*), mravinca (*O. compactum*) i timijana (*T. vulgaris*), što ukazuje na to da je pri koncentracijama jednakim ili većim od MIK rast bakterije značajno ili potpuno inhibiran. Međutim, na tretmanima EtU od kadulje (*S. officinalis*) i muškatne kadulje (*S. sclarea*) primijećen je slab učinak kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi*.

Primjenom komponenti EtU utvrđeno je da vrijednosti OD₆₀₀ rastu pri nižim koncentracijama tretmana (Grafikon 3). Za razliku od vrijednosti OD₆₀₀ na tretmanima EtU, MIK i/ili MBK vrijednosti komponenti nisu se statistički razlikovale od kontrolnog tretmana, osim na tretmanima timolom i α,β -tujon. Važno je napomenuti da, iako nije zabilježen vidljiv rast bakterije pri vrijednosti MIK, izostanak statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolni tretman vjerojatno je rezultat prekomjerne gustoće otopina tretmana.

Istraživanjem baktericidnog i bakteriostatskog djelovanja EtU i komponenti EtU utvrđeno je da svi tretmani imaju baktericidno djelovanje, što je potvrđeno omjerom MBK i MIK. Vrijednosti MIK od EtU bile su niže u usporedbi s komponentama, dok je MBK tretmana timijan (*T. vulgaris*), mravinac (*O. compactum*), mažuran (*O. majorana*), kadulja (*S. officinalis*), (-)-terpinen-4-ol i α,β -tujon bio četiri puta veći, odnosno jednak najvećoj testiranoj dozi tretmana (4× MIK). Omjer MBK/MIK bio je najniži na tretmanima timol, karvakrol i DL-mentol, gdje su timol i karvakrol djelovali baktericidno već pri koncentraciji od 2,50 i 1,25 mg/mL.



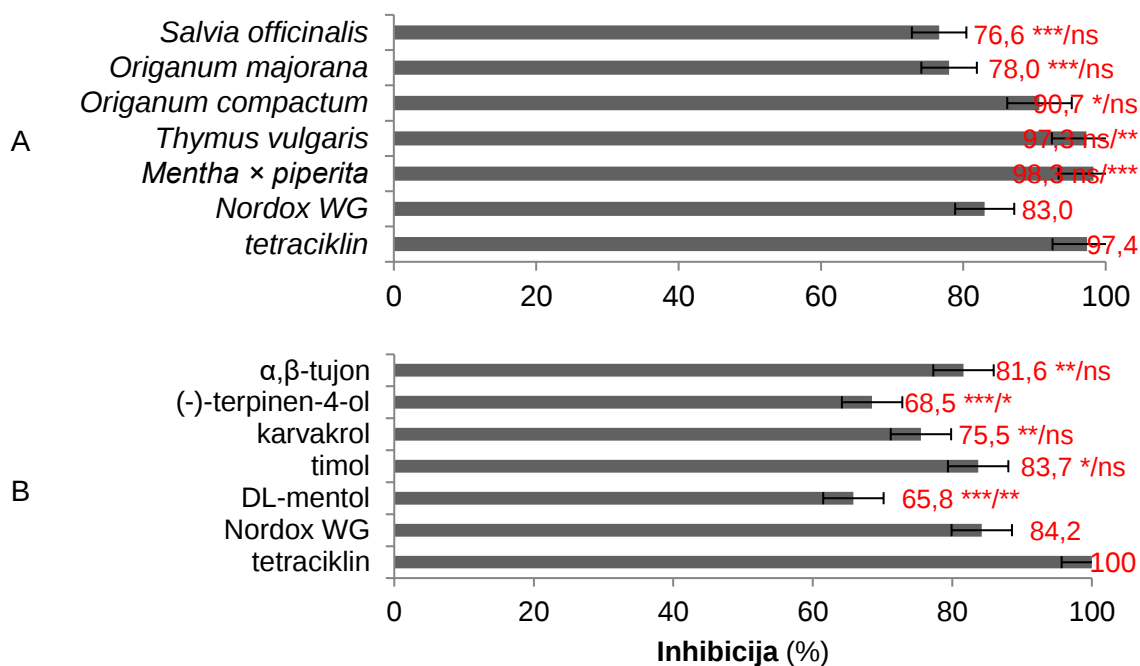
Grafikon 2. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije eteričnih ulja kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Stupci u histogramima predstavljaju vrijednosti OD₆₀₀ tretmana, dok su OD₆₀₀ tretmana bez bakterije (kontrola) prikazane kao linije u histogramima; n.d. – nije determinirano. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije pri 600 nm, a os x vrijednosti serijskih razrjeđenja tretmana. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajnu razliku između koncentracija i kontrole s bakterijom unutar pojedinog tretmana pri $p < 0,05$.



Grafikon 3. Minimalne inhibitorne (MIK) i minimalne baktericidne (MBK) koncentracije komponenti eteričnih ulja kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Stupci u histogramima predstavljaju vrijednosti OD₆₀₀ tretmana, dok su OD₆₀₀ tretmana bez bakterije (kontrola) prikazane kao linije u histogramima; n.d. – nije determinirano. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije pri 600 nm, a os x vrijednosti serijskih razrjeđenja tretmana. Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajnu razliku između koncentracija i kontrole s bakterijom unutar pojedinog tretmana pri $p < 0,05$.

4.4.3. Usporedba učinka MIK tretmana eteričnih ulja i njihovih komponenti s antibiotikom i komercijalnim sredstvom na bazi bakra

Tretmani EtU od timijana (*T. vulgaris*) i paprene metvice (*Mentha × piperita*) pokazali su najjače inhibicijsko *in vitro* djelovanje kod bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* pri MIK, pri čemu se inhibicija na navedenim tretmanima nije značajno razlikovala u odnosu na tretman antibiotikom. Osim toga, inhibicija rasta bakterije na tretmanima EtU kadulje (*S. officinalis*), mažurana (*O. majorana*) i mravinca (*O. compactum*), nije se značajno razlikovala u odnosu na komercijalni pripravak na bazi bakra (Nordox 75 WG) (Grafikon 4A). Primjenom pojedinačnih komponenti EtU, utvrđeno je da su svi tretmani slabije inhibirali rast bakterije od antibiotika pri vrijednostima MIK (Grafikon 4B). Tretman timol, α,β -tujon i karvakrol pokazali su približan učinak kao tretman bakrom. Slabija inhibicija rasta *P. savastanoi* pv. *savastanoi* zabilježena je na tretmanu DL-mentol i (-)-terpinen-4-ol, u usporedbi s antibiotikom i bakrom.



Grafikon 4. Inhibicija rasta *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* *in vitro* pri vrijednostima MIK eteričnih ulja (A) i komponenti eteričnih ulja (B), u usporedbi s inhibicijom rasta na tretmanu antibiotikom tetraciklinom i komercijalnim sredstvom na bazi bakra (Nordox 75 WG). Usporedba tretmana utvrđena je Dunnett testom pri $p * \leq 0.05$, $** \leq 0.01$, $*** \leq 0.001$, ns–nije signifikantno. Razlike u djelovanju u usporedbi s antibiotikom su označene na lijevoj strani kose crte, dok vrijednosti s desne strane predstavljaju razlike inhibicije testiranih tvari u usporedbi sa sredstvom Nordox 75 WG.

4.4.4. Krivulja *time - kill* (Test *time – kill*)

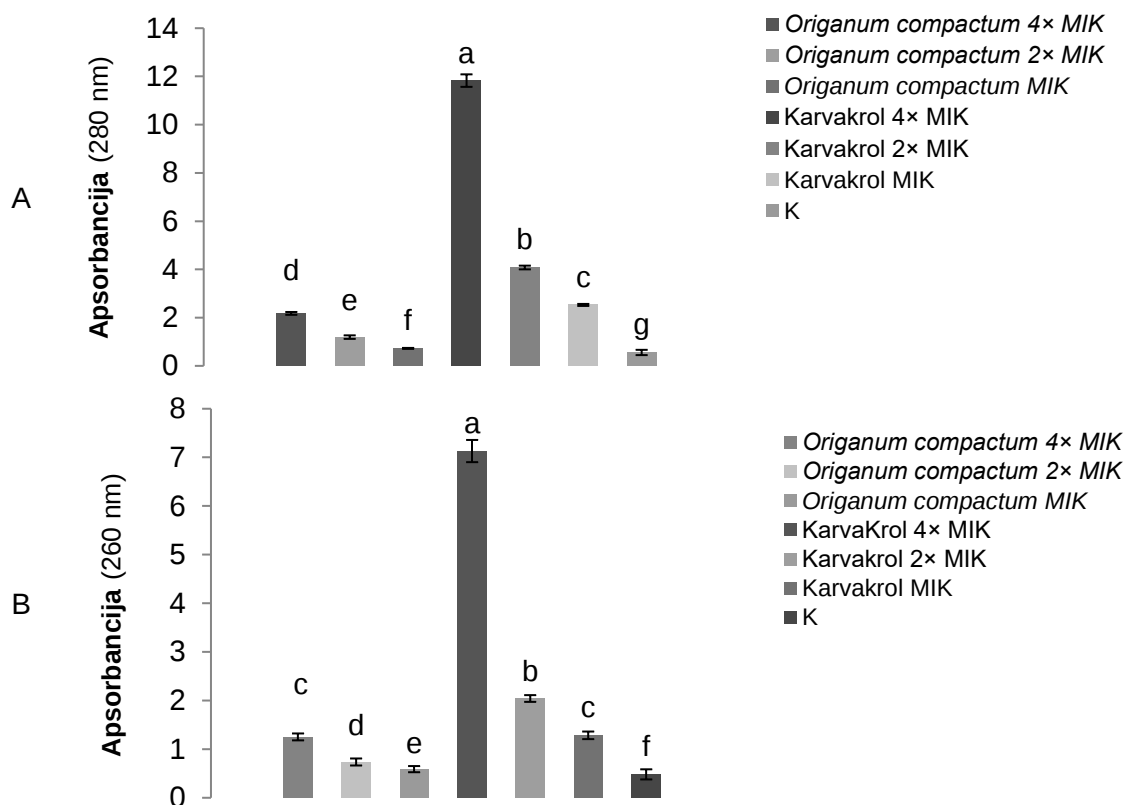
Testom *time-kill* (Grafikon 5) utvrđena je inhibicija rasta bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* ≥ 3 log CFU/mL, kada je izložena rastućim koncentracijama tretmana. EtU su pokazala razlike u djelovanju, pri čemu je kod većine tretmana primijećena inicijalna antibakterijska aktivnost, osim na tretmanu EtU paprene metvice (*Mentha × piperita*) i sastojka α, β -tujon, gdje je antibakterijsko djelovanje utvrđeno nakon 4 i 2 sata. Potpuna inhibicija rasta bakterije na tretmanu paprena metvica (*Mentha × piperita*) utvrđena je pri 4× MIK nakon 4 sata te pri 2× MIK nakon 6 sati inkubacije. Baktericidno djelovanje tih tretmana utvrđeno je i nakon 24 sata inkubacije. Pri koncentracijama 4× MIK, ostali tretmani su potpuno inhibirali rast bakterije već nakon jednog sata inkubacije. Komponente timol i karvakrol su inhibirale rast bakterije pri svim testiranim koncentracijama.

Na tretmanu EtU timijana (*T. vulgaris*) i mravinca (*O. compactum*), potpuna inhibicija rasta *P. savastanoi* pv. *savastanoi* utvrđena je već nakon prvog sata inkubacije pri 4× MIK. Pri 2× MIK, baktericidno djelovanje utvrđeno je nakon prvog i četvrtog sata izlaganja tretmanima, iako je nakon 24 sata, pri istim koncentracijama, primijećen ponovni rast bakterije, koji je bio približan kontrolnom tretmanu.

Primjenom komponenti EtU, utvrđeno je baktericidno djelovanje svih tretmana pri koncentracijama 4× MIK već nakon prvog sata inkubacije, odnosno nakon dva sata na tretmanu α, β -tujon. Ponovni rast *P. savastanoi* pv. *savastanoi* nije zabilježen nakon 24 sata pri 4× MIK.

4.4.5. Mehanizam djelovanja eteričnog ulja mravinca i komponente karvakrol kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Relativna apsorbancija filtrata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* tretiranih različitim koncentracijama (MIK, 2× MIK i 4× MIK) EtU mravinca (*O. compactum*) i njegove koncentrirane komponente –karvakrola, pri 260 i 280 nm, zajedno s negativnom kontrolom prikazana je na Grafikonu 6. Iz grafikona je vidljivo da je tretman karvakrol uzrokovao intenzivnije istjecanje proteina i nukleinskih kiselina iz stanica bakterije u usporedbi s primjenom EtU. Tretman s MIK koncentracijom EtU mravinca (*O. compactum*) nije se značajno razlikovao u učinku u odnosu na kontrolni tretman. Međutim, tretman EtU pri najvišoj testiranoj koncentraciji (4× MIK) pokazao je isti intenzitet curenja nukleinskih kiselina kao tretman najnižom koncentracijom (MIK) karvakrola.



Grafikon 6. Istjecanje metabolita iz stanica bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tretiranih s MIK, 2× MIK i 4× MIK eteričnog ulja mravinca (*Origanum compactum*) i njegove komponente karvakrol. K – suspenzija bakterije bez tretmana. Vrijednosti apsorbancije pri 280 nm predstavljaju istjecanje proteina (A), vrijednosti apsorbancije pri 260 nm predstavljaju istjecanje nukleinskih kiselina (B). Tretmani označeni istim slovima se statistički ne razlikuju pri $p \leq 0,05$.

4.5. Fitotoksičnost karvakrola za sadnice masline

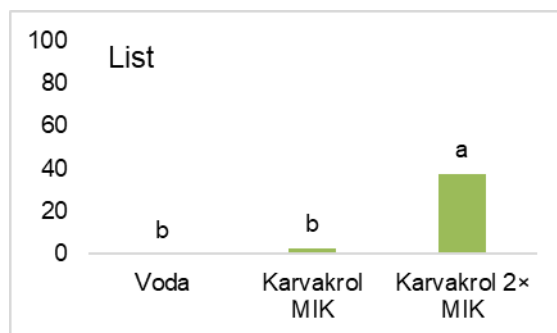
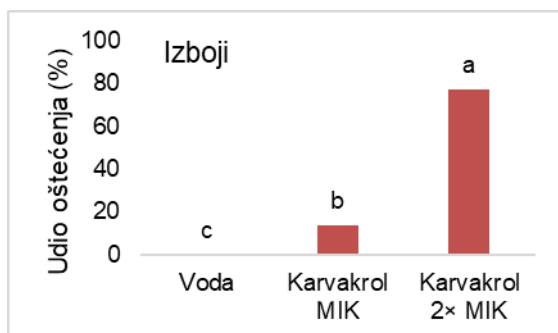
Udio oštećenja, u obliku nekrotičnih lezija na licu mladih listova, povećavao se s porastom koncentracije karvakrola u otopini. U Tablici 15 prikazan je utjecaj tretmana na svježju i suhu masu listova. Razlike u masi listova nisu se značajno razlikovale ovisno o tretmanu pri $p \leq 0,05$.

Tablica 15. Masa (g) listova sa sadnica sorte Leccino tretiranih s otopinom karvakrola u uvjetima plastenika (n=160).

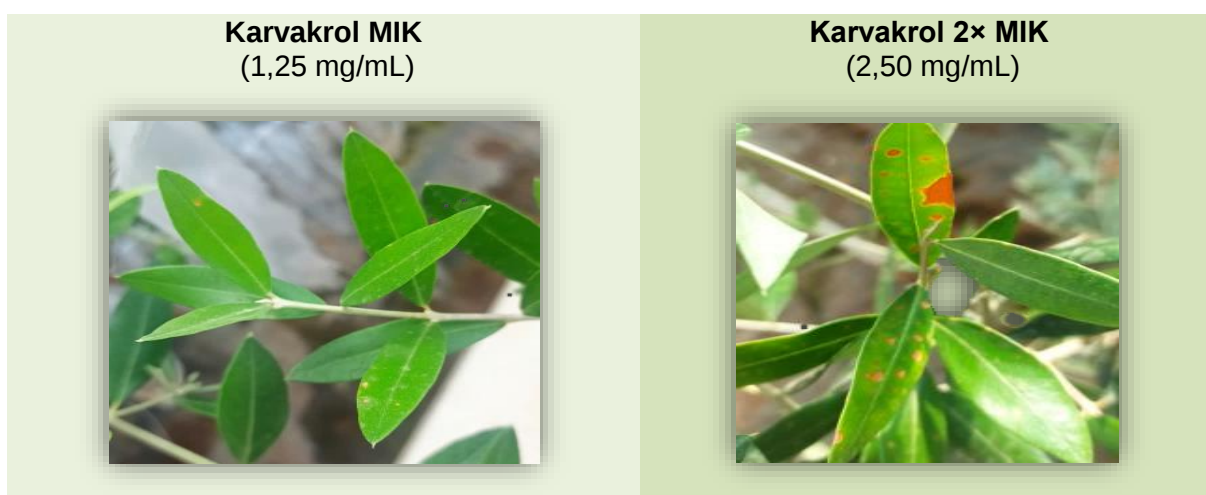
Tretman	Masa listova (g)	
	Svježa	Suha
Kontrola (voda)	4,85±0,19a	2,11±0,26a
Karvakrol MIK (1,25 mg/mL)	4,35±0,19a	1,76±0,26a
Karvakrol 2× MIK (2,5 mg/mL)	4,62±0,19a	1,91±0,35a

Vrijednosti u stupcu označene istim slovima statistički se značajno ne razlikuju pri $p \leq 0,05$.

Na Grafikonu 7 prikazan je udio oštećenja krošnje i listova u krošnji na sadnicama masline sorte Leccino s vidljivim fitotoksičnim učincima nakon folijarne primjene dvije doze otopine karvakrola. Primjena tretmana u koncentraciji jednakoj MIK vrijednosti dovela je do oštećenja krošnje u rasponu od 0 do 44,4%, uz oštećenje 0–5,6% listova po biljci. Međutim, nakon primjene karvakrola u koncentraciji jednakoj 2× MIK, došlo je do oštećenja većeg udjela krošnje (od 55,6 do 100%), uz oštećenje 10,1–60,7% listova po biljci. Prosječni udio oštećenja krošnje iznosio je 0,00% za kontrolu (voda), 13,4% za karvakrol MIK i 70,3% za karvakrol 2× MIK. Analizom varijance utvrđene su značajne razlike u oštećenju krošnje ovisno o tretmanu. Najveće oštećenje zabilježeno je kod tretmana karvakrolom 2× MIK, u usporedbi s kontrolom i MIK, pri $p < 0,001$. Također, utvrđena je značajna razlika između kontrole i tretmana karvakrolom MIK pri $p < 0,05$. Udio oštećenih listova slijedi sličan obrazac, pri čemu je zabilježen značajno veći udio oštećenja kod tretmana karvakrolom 2× MIK u usporedbi s karvakrolom MIK i kontrolom (Slika 13). Međutim, udio oštećenih listova na tretmanu karvakrolom u koncentraciji MIK (1,25 mg/mL), nije se značajno razlikovao od kontrole.



Grafikon 7. Udio izbojaka i listova na sadnicama masline sorte Leccino s utvrđenim fitotoksičnim oštećenjima 14 dana nakon tretiranja suspenzijom karvakrola u minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK) i 2× MIK. Statistički značajna razlika srednjih vrijednosti tretmana označene su različitim slovima. Statistički značajne razlike između tretmana utvrđene su analizom varijance (ANOVA) na razini značajnosti $p \leq 0,05$.



Slika 13. Nektorične lezije kao simptom fitotoksičnosti na sadnicama masline sorte Leccino nakon folijarne primjene otopine karvakrola: MIK) odsustvo ili slabo oštećenje lista tretiranog karvakrolom u koncentraciji 1,25 mg/mL; 2× MIK) oštećenje listova na izbojcima sadnica masline tretiranih otopinom karvakrola u koncentraciji 2,50 mg/mL.

4.6. Antibakterijsko djelovanje biljne vodebiljne vode masline i fenola hidroksitirozola

4.6.1. Osjetljivost izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* na biljne vodebiljne vode masline i fenol hidroksitirozol

Osjetljivost izolata bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* na tretmane biljne vode masline (tretirane HCl-om i netretirane) i fenol HTyr, utvrđena je metodom difuzije aktivne tvari pomoću diskova na krutom hranjivom mediju (Tablica 16). Kao referentni tretmani korišteni su antibiotik tetraciklin i komercijalni pripravak na bazi bakra Nordox 75 WG. Od ukupno 13 tretmana, utvrđena je osjetljivost izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* na tri tretmana, uključujući HTyr, gdje su zabilježene vrijednosti inhibicije rasta oba bakterijska izolata od 11,6 i 11,3 mm. Najveća inhibicija rasta utvrđena je na tretmanu antibiotikom (oko 25,5 mm), a zatim na tretmanu bakrom (19 i 17,8 mm). Izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* nisu bili osjetljivi na tretmane biljnom vodom masline.

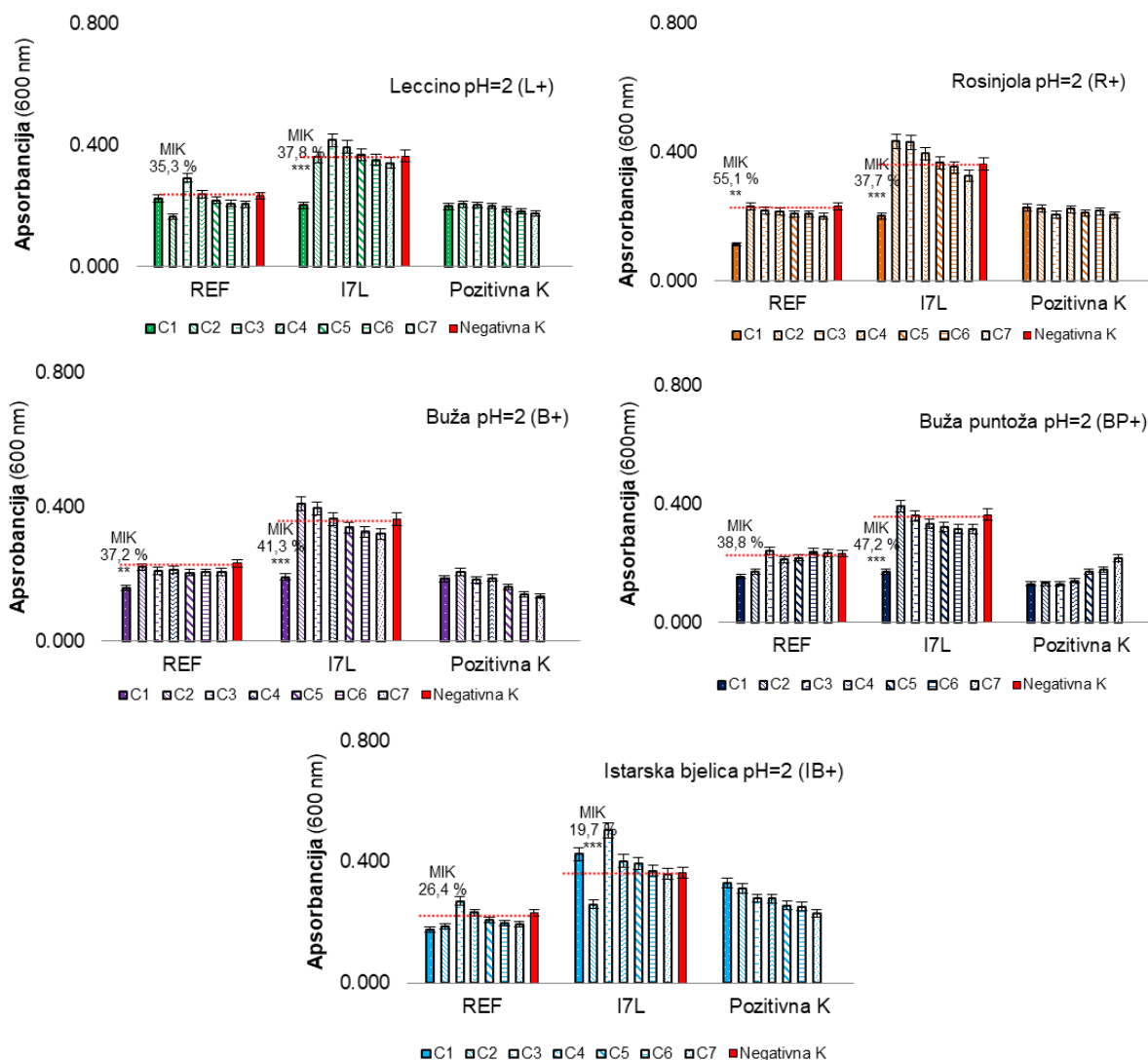
Tablica 16. Osjetljivost dva bakterijska izolata (CFBP 5075 i I7 L) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* na tretirane i netretirane biljne vodebiljne vode masline, fenol hidroksitirozol (HTyr) i referentne antibakterijske tvari temeljem zone inhibicije rasta oko diskova s tretmanima izražene u mm. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost devet mjerenja/diskova $\pm$ standardna devijacija.

Skupina antimikrobnih tvari	Tretman	Inhibicija rasta <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (zona inhibicije, mm)	
		CFBP 5075	I7 L
Biljne vode masline	tretirane i netretirane	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Fenol	hidroksitirozol (HTyr)	11,6 $\pm$ 3,20	11,3 $\pm$ 1,60
Sredstvo na bazi bakra	Nordox 75 WG	19,0 $\pm$ 0,90	17,8 $\pm$ 2,90
Antibiotik	tetraciklin	25,5 $\pm$ 0,80	25,6 $\pm$ 0,70

4.6.2. Minimalne inhibitorne koncentracije biljne vode masline i fenola hidroksitirozola kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

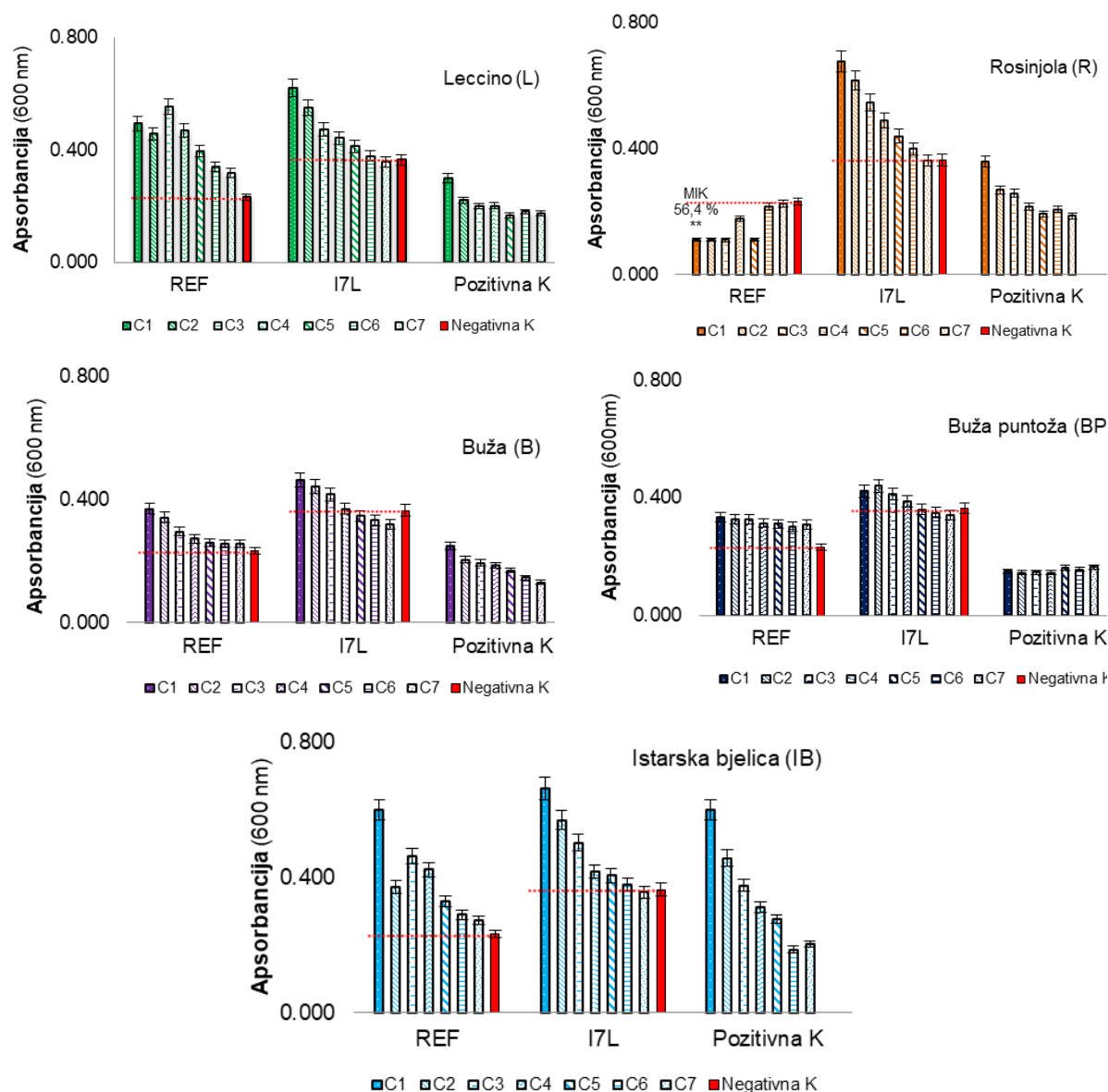
Metodom (mikro)razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju, utvrđene su vrijednosti MIK i postotak inhibicije rasta dva izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* na MIK tretmanima u odnosu na netretiranu kontrolnu varijantu. Vrijednosti MIK od biljne vode masline utvrđene su na tretmanima s dodatkom HCl-a (pH=2). Samo je pri najvećoj koncentraciji tretmana R, utvrđena MIK kod referentnog izolata CFBP 5075 (Grafikoni 8-10). Antibakterijski učinak ostalih netretiranih biljnih voda bio je slab ili odsutan.

Vrijednosti MIK utvrđene su primjenom najvećih koncentracija tretiranih biljnih voda masline (Grafikon 8). Samo je na tretmanu L+ utvrđena inhibicija rasta referentnog izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* pri drugoj koncentraciji (C2) i na tretmanu IB+ kod oba izolata. MIK vrijednosti tretmana prema izolatu I7 L bile su značajno niže u usporedbi s negativnom kontrolnom varijantom tretmana, iako isto nije utvrđeno kod referentnog izolata, osim na tretmanima B+ i R+.



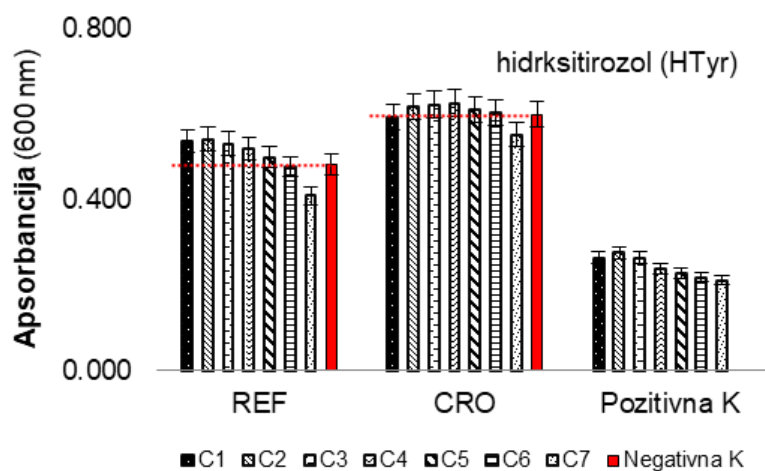
Grafikon 8. Antibakterijski učinak i MIK vrijednosti tretmana biljnih voda masline (tretirane, pH=2) kod dva izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni izolat CFBP 5075, Italija i hrvatski izolat I7 L, Istra, Hrvatska). Vrijednosti apsorbancije tretmana s bakterijom prikazane su stupcima s različitim uzorcima, pri čemu svaki uzorak predstavlja jednu od sedam testiranih koncentracija ($\frac{1}{2}$ (C1) do $\frac{1}{128}$ (C7), s lijeva na desno). Crveni stupci (Negativna K) predstavljaju negativnu kontrolu (bakterija bez tretmana). Brojevi iznad stupaca predstavljaju postotak inhibicije rasta bakterije pri MIK vrijednostima tretmana. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije (OD_{600}), dok os x prikazuje testirane koncentracije tretmana definirane u Tablici 7. Zvezdice iznad stupaca predstavljaju razlike rasta bakterije na MIK u usporedbi s negativnom kontrolom, s razinom značajnosti $p \leq 0,01$ (**) i $p \leq 0,001$ (***).

Antibakterijski potencijal netretiranih biljnih voda masline bio je slab ili odsutan (Grafikon 9). Vrijednost MIK utvrđena je isključivo na tretmanu R kod referentnog izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. MIK tretmana R se značajno razlikovao od negativne kontrole.



Grafikon 9. Antibakterijski učinak i MIK vrijednosti tretmana biljnih voda masline (netretirane) kod dva izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni izolat CFBP 5075, Italija i hrvatski izolat I7 L, Istra, Hrvatska). Vrijednosti apsorbancije tretmana s bakterijom prikazane su stupcima s različitim uzorcima, pri čemu svaki uzorak predstavlja jednu od sedam testiranih koncentracija ($\frac{1}{2}$ (C1) do $\frac{1}{128}$ (C7), s lijeva na desno). Crveni stupci (Negativna K) predstavljaju negativnu kontrolu (bakterija bez tretmana). Brojevi iznad stupaca predstavljaju postotak inhibicije rasta bakterija pri MIK vrijednostima tretmana. Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije (OD_{600}), dok os x prikazuje testirane koncentracije tretmana definirane u Tablici 7. Zvezdice iznad stupaca predstavljaju razlike rasta bakterije na MIK u usporedbi s negativnom kontrolom, s razinom značajnosti $p \leq 0,01$ (**).

Izlaganjem izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* fenolu HTyr, utvrđena je njegova neučinkovitost u rasponu testiranih koncentracija (Grafikon 10).



Grafikon 10. Antibakterijski učinak i MIK vrijednosti tretmana hidroksitirozol (HTyr) kod dva izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (referentni izolat CFBP 5075, Italija i hrvatski izolat I7 L, Istra, Hrvatska). Vrijednosti apsorbancije tretmana s bakterijom prikazane su stupcima s različitim uzorcima, pri čemu svaki uzorak predstavlja jednu od sedam testiranih koncentracija ($\frac{1}{2}$ (C1) do $\frac{1}{128}$ (C7), s lijeva na desno). Crveni stupci (Negativna K) predstavljaju negativnu kontrolu (bakterija bez tretmana). Os y predstavlja vrijednosti apsorbancije (OD_{600}), dok os x prikazuje testirane koncentracije tretmana definirane u Tablici 7.

5. RASPRAVA

5.1. Sortiment masline i prisutnost bakterioznog raka masline u Istri

U posljednjih nekoliko godina, sve veći interes za zdravu prehranu i pozitivne učinke ekstra djevičanskog maslinovog ulja na ljudsko zdravlje, potaknuo je značajan porast uzgojnih površina pod maslinom diljem svijeta (Russo i sur., 2022), uključujući i Hrvatsku. Međutim, povećanje proizvodnih nasada masline nailazi na ozbiljne izazove u zaštiti bilja, među kojima je jedna od najznačajnijih bolesti bakteriozni rak masline ili šuga masline, uzrokovan bakterijom *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Bakteriozni rak masline može smanjiti prinos masline, kao i kvalitativne aspekte ploda te negativno utjecati na formiranje stabala (Godena i sur., 2012). Razvoj simptoma raka masline, koji se manifestiraju hipertrofiranim biljnim tkivom ili tumorastim izraslinama na granama, izbojima i deblu, može rezultirati fiziološkim poremećajima stabala. Oštećenja često uključuju pucanje kore i sušenje jako pogođenih grana ili izbojaka, čime se dodatno smanjuje prinos i trajnost stabala, što je primijećeno i na stablima u maslinicima obuhvaćenih ovim istraživanjem. Intenzitet takvih šteta može varirati ovisno o nizu faktora, uključujući genotip masline, geografski položaj maslinika te virulentnost bakterije (Salman i sur., 2020). Intenzivno pucanje kore primijećeno je na sorti Arbequina za koju je poznato da je izrazito osjetljiva sorta na bolest raka masline. Utjecaj sortimenta na intenzitet zaraze utvrđen je i u ovom istraživanju, gdje je primjerice zabilježena prosječno veća zaraženost sorte Frantoio, Leccino i Maurino u odnosu na neke druge sorte poput sorte Istarska bjelica, Karbonaca, Picholine, Buža i dr. Osim toga, dimenzijama i masom prosječno veće tumoraste izrasline su utvrđene na sorti Frantoio i Pendolino u odnosu na sorte Porečka rosulja, Buža, Karbonaca i dr.

Prema istraživanju koje su proveli Marchi i sur. (2009), *P. savastanoi* pv. *savastanoi* može se širiti sistemski unutar biljnog tkiva domaćina, na kraćim udaljenostima od primarnog mjesta zaraze, što dodatno naglašava potrebu za pažljivom selekcijom reznica koje se koriste za proizvodnju sadnog materijala. Sukladno tome, važno je da se reznice uzimaju isključivo sa zdravih stabala, kako bi se spriječilo širenje bolesti u nove nasade (NN 9/2017). Preventivne mjere, poput strogog nadzora u rasadničkoj proizvodnji, od ključne su važnosti za sprječavanje pojave i širenja ove bolesti (Katalinić i sur., 2009).

Specifičan kontekst Hrvatske, osobito Istre, pokazuje kako je bakteriozni rak masline prisutan u velikom broju maslinika. Temeljem istraživanja provedenog u 45 maslinika koji obuhvaća više od 600 ha površine, utvrđeno je da su simptomi ove bolesti prisutni na svim istraživanim lokalitetima. Najčešće su bile zaražene grane stabala masline, a raznolikost

zaraženih sorti ukazuje na osjetljivost većine prisutnih sorti na ovu bolest, iako postoje razlike u intenzitetu simptoma u različitim nasadima. Temeljem prosječnih dimenzija i mase tumorastih izraslina na uzrokovanom biljnom materijalu, hrvatske autohtone sorte pokazuju slabiju osjetljivost na rak masline. Prisutnost bakterioznog raka masline nedavno je potvrđena i u srednjoj Dalmaciji, što dodatno ukazuje na rasprostranjenost ove bolesti u Hrvatskoj (Vuletin Selak i sur., 2022). Obzirom na važnost maslinarstva u mediteranskim regijama pa tako i u Hrvatskoj, borba protiv bakterioznog raka masline zahtijeva integrirani pristup koji uključuje preventivne mjere, pravovremenu detekciju bolesti i usvajanje inovativnih tehnologija u zaštiti nasada od bolesti.

Prema podacima iz 2006. godine (Pribetić, 2006), u hrvatskom dijelu Istre dominira uzgoj talijanske sorte Leccino, koja zauzima 59% ukupnih uzgojnih površina, dok je hrvatska autohtona sorta Istarska bjelica zastupljena sa 17%. Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazuju značajan porast i promjene u sortimentu na istraživanom području Istre u posljednja dva desetljeća. Tako su sorte koje čine najveći udio u maslinicima obuhvaćenih ovim istraživanjem: Leccino (82%), Pendolino (69%), Istarska bjelica (67%), Frantoio (58%) i Buža (56%). Sukladno navedenom, primjećuje se da su tradicionalne talijanske sorte i dalje dominantne sorte koje se uzgajaju u Istri, međutim, primijećen je i veći udio (7–18%) autohtonih sorti u istraživanim maslinicima, poput sorte Porečka rosulja, Rosinjola, Karbonaca, te neke druge introducirane sorte poput Ascolana tenera, Leccio del Corno, Moraiolo, Picholine i Maurino. Prisutnost raznolikog autohtonog sortimenta masline potencijalno sugerira na promjene uzgojnih praksi, odnosno prilagođavanje maslinara specifičnim klimatskim i ekološkim uvjetima Istre. Tako je za autohtonu sortu Istarska bjelica utvrđeno da je najzastupljenija i izrazito tolerantna sorta na bakteriozni rak masline u maslinicima obuhvaćenih ovim istraživanjem, što je sukladno opažanjima prisutnosti raka masline na Istarskoj bjelici u prethodnim istraživanjima (Godena i sur., 2012; Bjeliš, 2005; Mijušković, 1999). Simptomi bolesti kod ove sorte zabilježeni su uglavnom na sjevernijim mikro-lokalitetima, što potencijalno ukazuje na specifične klimatske i ekološke uvjete koji pogoduju razvoju simptoma, odnosno širenju bakterije u zaraženom biljnom tkivu. Slično tome, kod autohtone sorte Porečka rosulja, simptomi bolesti raka masline primijećeni su na jednom lokalitetu na sjeveru Istre, gdje je intenzitet zaraze bio izrazito slab, s tek nekoliko tumorastih izraslina na izbojku jednog stabla. Navedeno sugerira da bi Porečka rosulja mogla biti tolerantna na zarazu, no za konačnu potvrdu potrebna su opsežnija daljnja istraživanja.

Prisutnost bakterioznog raka masline utvrđena je kod većine dominantnih sorti u istraživanim maslinicima u Istri, a najveći broj zaraženih uzoraka prikupljen je sa sorti Leccino, Pendolino i Frantoio. Ove sorte se u literaturi redovito navode kao osjetljive na ovu bolest (Godena i sur., 2012; Iannotta i sur., 2005), što je sukladno rezultatima terenskog istraživanja.

Podaci su također u skladu s ranijim istraživanjima osjetljivosti masline na rak, gdje autori Mijušković (1999) i Bjeliš (2005) kategoriziraju sortu Frantoio kao osjetljivu, dok sortu Pendolino navode kao srednje osjetljivu, a Leccino kao slabo osjetljivu na rak masline. Međutim, važno je napomenuti da je bakterijski rak masline „dinamična“ bolest, čiji intenzitet može značajno varirati iz godine u godinu. Tako Young (2004) navodi da u pojedinim godinama može doći do tzv. "epifitocije", odnosno pojave jake zaraze praćene velikim brojem tumora, dok tijekom drugih godina simptomi mogu izostati. Takva fluktuacija u pojavnosti bolesti može biti povezana s promjenama u uvjetima okoliša, poput temperature i relativne vlage zraka, koji utječu na razvoj i širenje bakterije te razvoj simptoma na zaraženim stablima masline. Zanimljivo je da je na simptomatičnom sortimentu iz nasada na sjevernijim lokalitetima u Istri, utvrđen prosječno jači intenzitet zaraze temeljem mase i promjera tumorastih izraslina. Navedeno sugerira da su takvi uvjeti povoljniji za razvoj bolesti, ali i na složenost interakcije između sorti masline i mikro-lokalnih uvjeta uzgoja. Na sjevernijim lokalitetima, posebno u unutrašnjosti Istre i sjevernom Jadranu, Blašković i sur. (2023) te Jelić i sur. (2020) ukazuju na povećanu učestalost i specifičnu klimatologiju pojave tuče koja je izraženija tijekom ljetnih mjeseci, pri čemu su oštećenja uzrokovana tučom na biljkama masline mogući razlog jačeg intenziteta zaraze bakterijskim rakom. Varijabilna pojava tuče u Istri, kako navode Jelić i sur. (2020) u smislu broja dana i zabilježenih slučajeva, mogla bi biti jedan od čimbenika koji utječu na učestalost i intenzitet raka masline u pojedinim godinama. Stoga bi se potencijalna korelacija između ovih fenomena trebala detaljnije istražiti. Uzročnik raka masline je fitopatogena bakterija *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, a u Hrvatskoj je njegova prisutnost slabo istraživana, iako je maslinarstvo stoljetna tradicija na području Istre i Dalmacije. Stoga je u ovom istraživanju bakterija izolirana iz uzorkovanog biljnog materijala te karakterizirana prema tradicionalnoj LOPAT shemi i identificirana molekularnom metodom *real-time* PCR. Tako je *P. savastanoi* pv. *savastanoi* molekularno potvrđen kao uzročnik bakterijskog raka masline u 31,4% prikupljenih uzoraka. Naime, manji udio potvrđenih uzoraka na prisutnost uzročnika raka masline, vjerojatno je rezultat otežane izolacije bakterije iz simptomatičnog biljnog materijala zbog starosti tumora, što je otežalo usitnjavanje biljnog materijala. Zbog prisutnosti pukotina na uzorcima, moguće je i da su na uzorcima bili prisutnosti drugi mikroorganizmi, što je moglo interferirati u dijagnostičkim reakcijama. Drugi mogući potencijalni razlog ukazuje na to da su simptomi bolesti moguće i rezultat prethodnih infekcija, dok bakterija više nije bila prisutna u uzorcima u trenutku uzorkovanja. Osim toga, istraživanje na terenu je provedeno u većini maslinika nakon proljetne primjene zaštitnih sredstava na bazi bakra, što je standardna mjera suzbijanja raka masline. Korištenje bakarnih spojeva moglo je smanjiti populacije bakterije u/na uzorcima, što je potencijalno otežalo izolaciju i identifikaciju bakterije nakon tretiranja maslinika.

Najveći broj pozitivnih uzoraka utvrđen je u biljnom materijalu sorte Leccino (40%), a potom kod sorti Frantoio, Pendolino, Buža, Karbonaca, Rosciola, Nocciara i kod nepoznatih sorti. Obzirom na varijabilnost u pojavnosti bolesti ovisno o sorti masline i problema kurativnog suzbijanja bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, naponi istraživača usmjereni su na pronalazak sorti koje su tolerantne ili otporne na infekciju (Licciardello i sur., 2023). Primjer toga je istraživanje autora Vuletin Selak i sur. (2022), u kojemu je obuhvaćeno testiranje osjetljivosti 21 različite sorte masline, uključujući hrvatske autohtone i introducirane sorte masline. Sve testirane sorte pokazale su određeni stupanj osjetljivosti na bakterijski rak, no sorte Coratina, Favarol i Leccino pokazale su se kao najtolerantnije. Sorte Leccino, iako nerijetko zaražena, pokazuje relativno visoku otpornost u nasadima. Sorte Fasolina, Grignan, Moraiolo, Oblica, Sigoise, Canino, Koroneiki, Levatinka, Maurino i Rosciola također su se pokazale kao tolerantne, dok su sorte Drobnica, Pendolino, Picholine marocaine i Taggiasca klasificirane kao srednje osjetljive na bolest. Sorte Frantoio, Lastovka, Santa Catarina i Chemlali se navode kao najosjetljivije na bakterijski rak masline (Vuletin Selak i sur., 2022).

Unatoč osjetljivosti velikog udjela sortimenta koji je prisutan u Hrvatskoj, na određenim sortama koje se uzgajaju u istraživanim maslinicima u Istri, simptomi bakterijskog raka nisu primijećeni na sortama Grignan, Ravece, Coratina, Verzola, Itrana, Leccione i Žizolera, unatoč tome što se uzgajaju u zahvaćenim maslinicima gdje su prisutni simptomi bolesti na drugim sortama. Navedeno sugerira mogućnost da su te sorte tolerantnije na zarazu, ali je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se potvrdila njihova otpornost na bakterijski rak masline.

U zaštiti maslina od zaraze bakterijom *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, trenutno je naglasak stavljen na primjenu preventivnih agrotehničkih i sanitarnih mjera u okviru integriranog pristupa zaštiti bilja. Glavna kemijska mjera zaštite temelji se na primjeni sredstava na bazi bakra, uz poseban naglasak na ispravnu i doziranu upotrebu kako bi se izbjegao fitotoksični učinak. Pravovremeno otkrivanje, uklanjanje i dezinfekcija zaraženih grana može značajno smanjiti intenzitet zaraze (Ramos i sur., 2012; Barić, 2006; Young, 2004). Naime, populacije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* pokazuju sezonsku distribuciju, pri čemu se najveća gustoća populacije bilježi tijekom proljeća i jeseni, kada uvjeti postaju povoljniji za ostvarivanje infekcije. Također, gustoća populacije djelomično ovisi o starosti biljnih organa, ali je pod većim utjecajem sezonskih faktora, poput temperature i vlage, koji omogućavaju brži razvoj bakterije (Quesada i sur., 2007). Sukladno tome i načelima integrirane zaštite bilja, preporučuje se ograničiti tretiranje na najviše dva puta godišnje, uz kontinuirano praćenje zdravstvenog stanja maslinika, osobito mladih stabala (Barić, 2006). Uz prilagodbu rokova tretiranja sezonskim uvjetima u kojima je gustoća populacije bakterije najveća, učinkovitije bi se spriječilo ostvarivanje infekcije i prijenos bolesti.

U ovom istraživanju, utvrđeno je da ispitivani maslinari u Istri rijetko primjenjuju mjere zaštite nakon kasnih proljetnih mrazova i tuče, unatoč činjenici da takve klimatske pojave mogu značajno oštetiti biljke. Takva oštećenja stvaraju ulazne rane za infekciju bakterijom, čime se povećava rizik od širenja bakterioznog raka u nasadima. Istraživanje utjecaja kasnog mraza na intenzitet pojavnosti raka masline provedeno je u regiji Marche u Italiji od strane autora Valverde i sur. (2020). U istraživanju je utvrđeno da intenzitet šteta od mraza i pojave raka masline može varirati ovisno o tri važna faktora, a to je položaj maslinika, sklop sadnje i sortiment u nasadu. Pojava raka masline bila je pozitivno korelirana s organima oštećenima mrazom. Sve su sorte pretrpjele oštećenja od mraza i pokazale simptome bolesti nakon šest mjeseci. Sorte Piantone di Mogliano, FS-17 i Frantoio bile su najviše pogođene. Sorte Carboncella, Maurino i Arbequina pokazale su srednju osjetljivost, dok su Ascolana Tenera, Leccino, Piantone di Falerone i Rosciola Colli Esini bile tolerantne na kombinaciju kasnog mraza i zaraze. Starije grane (>3 godine) općenito su bile više oštećene u usporedbi s mlađima. Nadmorska visina također je imala značajan utjecaj, pri čemu su nasadi na nižim nadmorskim visinama bili slabije oštećeni od mraza, što je ujedno smanjilo pojavnost bakterioznog raka masline. Osjetljivost sorti Frantoio, Maurino i Arbequina na oštećenja od mraza potencijalno može objasniti rezultate ovog istraživanja, gdje je intenzitet zaraze na navedenim sortama također bio visok, a što je vjerojatno rezultat kombinacije nepovoljnih vremenskih uvjeta, izostanka mjera zaštite i osjetljivosti sorte. Sukladno tome, naglašena je važnost sorte otpornosti u borbi protiv bakterioznog raka masline te potreba za daljnjim istraživanjima koja bi omogućila precizniju selekciju tolerantnih sorti za uzgoj. Poticanje uzgoja tolerantnih sorti može predstavljati dugoročno rješenje u suzbijanju bolesti, čime bi se osigurala stabilnost prinosa u voćnjacima na Mediteranu.

5.2. Biokemijska karakterizacija molekularno identificiranih izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* iz zaraženih maslinika u Istri

Istraživanje izolata bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* izoliranih iz simptomatičnog biljnog materijala prikupljenog u maslinicima u Istri, pokazalo je određena odstupanja u biokemijskim svojstvima izolata unutar standardne LOPAT sheme za razlikovanje vrsta roda *Pseudomonas*. Temeljem dostupne literature, poput istraživanja Moretti i sur. (2008) te Pérez-Martínez i sur. (2008), poznato je da razlike u biokemijskom profilu mogu postojati čak i između sojeva izoliranih s iste biljke. Autori pretpostavljaju da bi takva varijabilnost mogla biti uzrokovana genetskim čimbenicima, kao i specifičnim ekološkim uvjetima u različitim dijelovima maslinika.

Utvrđeno je da izolati, iako izolirani iz istog maslinika, pokazuju varijabilnost u morfološkim i biokemijskim svojstvima, što je dodatno primijećeno kroz morfološku karakterizaciju kolonija. Na hranjivoj podlozi KB, razvijene su kolonije okruglog ili blago ovalnog oblika, s bijelo-sivom do svijetložutom pigmentacijom, a njihov promjer je varirao 1–3 mm. Razlika u fenotipu (morfologiji) kolonija iste vrste zapravo je opći fenomen za kojega se smatra da je rezultat mehanizma adaptacije prema promjenjivom okolišu ili se pripisuje horizontalnom prijenosu gena (Pérez-Martínez i sur., 2007; Scortichini i sur., 2004). Kolonije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* fenotipski su se značajno razlikovale nakon inkubacije od 48 sati na 28 °C na hranjivoj podlozi KB u istraživanju Pérez-Martínez i sur. (2007). U navedenom istraživanju su izolati CFBP 2074, NCPPB 64 i ITM 317 formirali velike kolonije (2–3,5 mm) s nepravilnim marginama, a izolati NCPPB 1344 i NCPPB 3335 male kolonije (<1,5 mm) s glatkom površinom. Razlika u morfologiji kolonija izoliranih iz biljnog materijala različitih sorti masline utvrđena je i na izolatima koji potječu iz različitih uzgojnih regija u Italiji (Surico i Marchi, 2003).

Osim fenotipskih različitosti kolonija, jedno od važnijih odstupanja u ovom istraživanju je odsutnost proizvodnje fluorescentnog pigmenta kod većine hrvatskih izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Obzirom da je ovaj patogen specifičan patogen masline, bilo je očekivano da će izloženost sličnim ekološkim i klimatskim uvjetima rezultirati većom homogenosti između izolata. Međutim, potencijalna genetska varijabilnost između sojeva, uvjetovana lokalnim čimbenicima mikroklimatskih uvjeta ili specifičnih karakteristika mikrolokaliteta, mogući je razlog primijećenih razlika (Vuletin-Selak i sur., 2022). Naime, izolati podvrgnuti testovima LOPAT sheme (Lelliot, 1966) ne moraju u svakom slučaju zadovoljavati očekivane rezultate u biokemijskim testovima unutar sheme. Primjerice, svi uzorci *P. savastanoi* obuhvaćeni

istraživanjem autora Mugnai i sur. (1994), bili su negativni na proizvodnju levana, osim izolata PVFi3 i PVFi5 (Firenca, Italija) koji također nisu fluorescirali na KB hranjivoj podlozi.

Iako se fluorescentni pigment tradicionalno smatra ključnim obilježjem za određene vrste roda *Pseudomonas*, novija istraživanja ukazuju na to da ovo svojstvo može biti varijabilno kod izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Tako je u istraživanju Hall i sur. (2004) i Surico i Marchi (2003), utvrđeno da fluorescencija nije uvijek prisutna niti kod tzv. fluorescirajućih pseudomonada, što je također primijećeno kod izolata izoliranih iz voćnjaka u Australiji i Japanu (Tsuji i sur., 2017). Bultreys i sur. (2001) sugeriraju da odsutnost fluorescencije može biti povezana s raznim čimbenicima, uključujući utjecaj okoliša ili metaboličke promjene unutar sojeva.

Važno je istaknuti da odsutnost fluorescentnog pigmenta kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi* može biti povezana s pozitivnim testovima na proizvodnju levana (Mugnai i sur., 1994), međutim, u ovom istraživanju, proizvodnja levana nije detektirana kod istraživanih izolata. Prema Turco i sur. (2022) i Marchi i sur. (2005), proizvodnja levana može biti ključni pokazatelj metaboličkih putova kod sojeva, a njegova odsutnost u ovom istraživanju ukazuje na potrebu za daljnjim analizama kako bi se razumjeli specifični uzroci atipičnosti hrvatskih izolata. Daljnja istraživanja trebala bi obuhvatiti detaljnije genetske analize kako bi se utvrdilo jesu li varijacije posljedica horizontalnog prijenosa gena ili lokalnih čimbenika okoliša.

Identifikacija atipičnosti u biokemijskim svojstvima, virulentnosti i sl., važan je korak u detaljnijem mapiranju distribucije sojeva *P. savastanoi*. Naime, potrebno je precizno razlikovanje sojeva vrste *P. savastanoi*, koji uzrokuju slične simptome na različitim biljkama domaćinima, kao što su *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (na maslini), *P. savastanoi* pv. *nerii* (na oleandru) i *P. savastanoi* pv. *fraxini* (na jasenu). U bazama podataka često se ova tri soja navode zajedno, unatoč razlikama u virulentnosti ovisno o domaćinu i geografskom podrijetlu (Añorga i sur., 2020; Moretti i sur., 2017; Krid i sur., 2009). Primjerice, Moretti i sur. (2017) utvrdili su da su izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* izolirani iz biljnog materijala masline koje se uzgajaju na istočnoj obali Jadranskog mora, slabije virulentni u usporedbi sa sojevima iz Portugala, a razlika u virulentnosti sojeva uzročnika raka masline utvrđena je i u ovom istraživanju. To dodatno naglašava potrebu za istraživanjem genetske strukture sojeva prema njihovom geografskom porijeklu i jasnog odvajanja od srodnih patovara. Naime, geografski čimbenici poput klime i nadmorske visine, mogu utjecati na virulentnost i prilagodbu sojeva bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Zbog toga bi buduća istraživanja mogla dati jasniji uvid u grupiranje sojeva temeljem specifičnih uvjeta okoliša koje nastanjuju populacije, što bi imalo važnu ulogu u razumijevanju dinamike širenja i raznolikosti fitopatogena. Osim toga, odstupanja u rezultatima biokemijskih svojstava kod hrvatskih izolata, sugeriraju i na

potencijalno ažuriranje postojeće LOPAT sheme, a s ciljem preciznije diferencijacije sojeva temeljem varijabilnosti unutar patovara *P. savastanoi*, što bi dodatno unaprijedilo dijagnostiku i razumijevanje patogeneze, a potencijalno i razvoj prognoznih modela zaraze ovisno o geografskom položaju i sortimentu nasada te virulentnosti sojeva koji su prisutni u specifičnim mikro- ili makro klimatskim uvjetima (Turco i sur., 2022; Tsuji i sur., 2017; Marchi i sur., 2005; Hall i sur., 2004; Lelliot i sur., 1966).

5.3. Osjetljivost hrvatskih autohtonih sorti masline na bakteriozni rak masline

U istraživanju je testirana potencijalna razlika u razini virulentnosti pet sojeva *P. savastanoi* pv. *savastanoi*: oni sojevi koji su izolirani iz maslinika u Istri (I7 L, P15 N i B45 C-PR) te jednog soja iz Italije (referentni soj CFBP 5075) i jednog iz Slovenije (A1-1). Zbog varijabilnosti u pojavnosti bakterioznog raka masline ovisno o sorti, također je testirana osjetljivost tri hrvatske autohtone sorte (Buža, Rosinjola i Istarska bjelica) i dvije talijanske introducirane sorte masline (Leccino i Frantoio). Osjetljivost sorti na rak masline utvrđena je inokulacijom sojeva *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u kontroliranim uvjetima plastenika, temeljem promjera tumorastih izraslina na mjestima inokulacije, a virulentnost različitih sojeva bakterije temeljena je na površini tumorastih izraslina na zaraženim sadnicama masline.

Dva istraživana hrvatska izolata, B45 C-PR i I7 L, pokazala su značajne razlike u virulentnosti. Izolat B45 C-PR bio je najslabije virulentan prema svim istraživanim sortama, dok je izolat I7 L pokazao najveću virulentnost, iako su čak i virulentniji izolati rezultirali manjim izraslinama na sorti Istarska bjelica. Zanimljivo je da su rezultati ovog istraživanja djelomično u skladu s prethodnim istraživanjima, poput istraživanja autora Moretti i sur. (2017), gdje je utvrđena niža razina virulentnosti izolata s istočne obale Jadrana u usporedbi s talijanskim i portugalskim izolatima. Iznimka je izolat I7 L koji je pokazao veću virulentnost u odnosu na talijanski izolat CFBP 5075. Razlike u virulentnosti izolata mogu biti posljedica evolucijske adaptacije na specifične obrambene mehanizme domaćina ili genetskih varijacija unutar populacije bakterije, što može uključivati i otpornost na antimikrobne fenolne komponente koje biljke sintetiziraju kao mehanizam obrane (Cameron i Sarojini, 2014; Ashraf i sur., 2014).

Istarska bjelica, jedna od hrvatskih autohtonih sorti, pokazala je najveću tolerantnost na rak masline. Ipak, sorta Rosinjola koja je također hrvatska autohtona sorta, pokazala je najvišu osjetljivost na zarazu *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Niska osjetljivost sorte Istarska bjelica sugerira da autohtoni sortiment može sadržavati gene za otpornost ili tolerantnost prema zarazi. Talijanske sorte Frantoio i Leccino pokazale su varijabilnosti u osjetljivosti ovisno o inokuliranom izolat *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Primjerice, slovenski i hrvatski izolat A1-1 i B45 C-PR pokazali su slabu virulentnost prema sorti Frantoio, dok su asimptomatska mjesta inokulacije bila česta kod hrvatske sorte Buža, neovisno o inokuliranom izolat. Sorte Frantoio i Buža pokazale su zanimljive rezultate, budući da su kod njih primijećene značajne varijacije u veličini tumora i udjelu mjesta inokulacije bez simptoma. Ova opažanja potencijalno sugeriraju određenu razinu otpornosti ili poboljšanu sposobnost ovih sorti da se efikasnije nose s infekcijom kada su pod optimalnijim uvjetima uzgoja, kao što je navodnjavanje, odnosno kada su eliminirani stresni faktori iz okoline. Ipak, slaba osjetljivost u kontroliranim uvjetima ne

implicira otpornost u prirodnom okruženju, gdje kumulativni stres može kompromitirati obrambene mehanizme biljke.

Obzirom da je utvrđeno da i najvirulentniji izolati formiraju manje tumoraste izrasline na sadnicama sorte Istarska bjelica, potvrđuje se potencijal ove sorte u smanjenju širenja bolesti. Zbog slabijeg intenziteta zaraze, Istarska bjelica se ističe kao potencijalno vrijedna sorta za proširenje uzgojnog područja, posebno u regijama u kojima su bolesti masline učestale i ugrožavaju prinose. Tolerantnost sorte Istarska bjelica na rak masline, u skladu je s opažanjima tijekom istraživanja ne terenu, gdje je utvrđen slab intenzitet zaraze u usporedbi s drugim sortama koje se uzgajaju u Istri.

Kategorizacijom osjetljivosti sorti masline na rak masline prema Abuamsha i sur. (2023), sorte Buža, Leccino i Frantoio pokazale su sličnosti s Istarskom bjelicom temeljem prosječnih vrijednosti dimenzija tumora, osim kada su iste zaražene jako virulentnim izolatima poput I7 L. Međutim, pretpostavka je da je odsutnost simptoma kod većeg broja mjesta inokulacije na sadnicama ovih sorti, pridonijela sličnostima s Istarskom bjelicom, dok se Rosinjola izdvaja po visokoj osjetljivosti. Stoga se temeljem udjela tumora pojedine ocjene osjetljivosti, istraživane sorte masline potencijalno može kategorizirati kako slijedi: 1–niska osjetljivost (Istarska bjelica), 2–srednja osjetljivost (Leccino), 3–visoka osjetljivost (Frantoio i Buža) i 4–vrlo visoka osjetljivost (Rosinjola). Takva klasifikacija temelji se na promjeru tumorastih izraslina i sukladna je prethodnim istraživanjima, gdje je sorta Leccino kategorizirana kao tolerantna sorta (Vuletin Selak i sur., 2022). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ispitivane hrvatske autohtone sorte masline nisu jako osjetljive prema skali Ambuasha i sur. (2023) na zarazu *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u kontroliranim uvjetima inokulacije. Iako ovi rezultati sugeriraju određenu razinu otpornosti istraživanih sorti, treba uzeti u obzir da su poljski uvjeti znatno složeniji i podložni utjecaju različitih stresnih faktora kao što su ekstremni vremenski uvjeti (npr. mraz, suša), mehanička oštećenja tijekom berbe ili rezidbe, te napad drugih štetnika ili bolesti. Svi ovi faktori mogu značajno utjecati na osjetljivost biljaka na zaraze, čineći ih podložnijima infekciji čak i ako su u kontroliranim uvjetima pokazale određenu otpornost.

Iako su sorte Frantoio, Leccino i Buža temeljem prosječnih vrijednosti promjera tumora mogle biti kategorizirane kao srednje osjetljive, to nije u potpunosti u skladu s literaturom koja često navodi sortu Leccino kao značajno tolerantniju od sorte Frantoio (Abuamsha i sur., 2023; Vuletin Selak i sur., 2022). Razlike u određivanju stupnja osjetljivosti u nekontroliranim uvjetima nasada, može biti posljedica varijabilne količine inokuluma u odnosu na kontrolirane uvjete u plasteniku, što sugerira da bi se točna kategorizacija sortimenta u kontroliranim

uvjetima, mogla temeljiti na udjelu tumora unutar pojedine ocjene osjetljivosti na mjestima inokulacije.

Poznato je da određene bakterije, uključujući vrste kompleksa *P. savastanoi*, imaju sposobnost razgradnje fenolnih spojeva (Mandal i sur., 2010). Ta sposobnost im omogućuje da ometaju obrambene mehanizme domaćina. U literaturi navodi se da se razlike u osjetljivosti sorti na zaraze fitopatogenim bakterijama, mogu djelomično objasniti i razlikama u fenolnom profilu biljnog tkiva pojedine sorte. Tako je u istraživanju Xie i sur. (2021) utvrđeno da sorte Leccino i Frantoio imaju različiti fenolni sastav biljnog tkiva. U istom istraživanju navode da sorta Leccino sadrži visoke koncentracije oleuropeina, dok Frantoio ima raznolik kemijski profil. Također, u istraživanju autora Pasković i sur. (2020) utvrđena je stabilnost i uniformnost fenolnog sastava tijekom vegetacije kod sorte Istarska bjelica, što bi vjerojatno moglo biti razlog utvrđene tolerantnosti na rak masline u ovom istraživanju. Pretpostavka je da stabilan fenolni profil omogućuje lakšu i nesmetanu borbu protiv infekcija fitopatogena.

Obzirom na sve navedeno, potrebno je provesti dodatna istraživanja koja bi obuhvatila interakciju između virulentnosti sojeva fitopatogena, specifičnosti sortimenta, kemijskog sastava različitih biljnih tkiva domaćina i njihovog lokaliteta. Takva istraživanja mogla bi pružiti značajne uvide u raznolikost sojeva *P. savastanoi* i omogućiti bolje razumijevanje specifične virulentnosti pojedinih izolata u odnosu na različite sorte masline, a što je potencijalno uvjetovano genetskom raznolikosti. Tolerantnost sorte Istarska bjelica na zarazu s *P. savastanoi* pv. *savastanoi* potiče potrebu za daljnjim istraživanjima hrvatskih autohtonih genotipova radi identifikacije gena otpornosti, koji bi se mogli koristiti u budućim programima oplemenjivanja.

5.4. Antibakterijsko djelovanje eteričnih ulja i njihovih komponenti kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

U ovom istraživanju utvrđena je antibakterijska aktivnost 12 bioaktivnih spojeva kod referentnog izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (CFBP 5075), a 10 spojeva je pokazalo određeni stupanj toksičnosti, što sugerira njihov potencijal za razvoj formulacija za zaštitu bilja od fitopatogenih bakterija. Visoka učinkovitost je utvrđena primjenom EtU od paprene metvice (*Mentha × piperita*) i njegove komponente DL-mentola, koji je pokazao snažno baktericidno djelovanje već nakon jednog sata izlaganja bakterije koncentracijama od 10 i 20 mg/mL. DL-mentol je pokazao brz učinak na smanjenje rasta populacije *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, što je u skladu s literaturom gdje se navodi da antibakterijska učinkovitost EtU od vrsta roda *Mentha*, ovisi o koncentraciji mentola (Wińska i sur., 2019). Uz to, poznato je da EtU *Mentha* mogu djelovati sinergijski s drugim EtU ili antibioticima, čime bi se potencijalno mogla smanjiti doza konvencionalnih SZB (Wińska i sur., 2019).

Antibakterijski učinak EtU od roda *Salvia* bio je varijabilan i ovisan o vrsti. Ulje kadulje *S. officinalis* (kemotip α,β -tujon) pokazalo je učinkovitost kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, s baktericidnim djelovanjem pri koncentraciji od 40 mg/mL. Suprotno tome, ulje muškatne kadulje *S. sclarea* (kemotip linalil acetat) imalo je slabiji učinak, što potvrđuje prethodna istraživanja o slabijoj učinkovitosti EtU od vrsta roda *Salvia* kod Gram–negativnih bakterija roda *Pseudomonas* (Man i sur., 2019). Na tretmanu EtU od muškatne kadulje (*S. sclarea*) i njegove komponente linalil acetat utvrđeno je da je *P. savastanoi* pv. *savastanoi* osjetljiviji kada su primijenjeni u razrijeđenom obliku, pri čemu je najveći antibakterijski potencijal utvrđen pri najnižim primijenjenim koncentracijama. Pretpostavka je da je ovaj fenomen posljedica difuzije tretmana kroz čvrsti hranjivi medij. Naime, linalil acetat pripada kemijskoj skupini estera koji se strukturno razlikuju od ostalih testiranih sastojaka EtU. Stoga je pretpostavka da je razrjeđivanje tih tretmana potencijalno utjecalo na ionsku snagu i topljivost acetata, što je rezultiralo smanjenjem koncentracije soli u otopini tretmana, te olakšalo difuziju kroz kruti hranjivi medij (Bogunia i Makowski, 2020). Zanimljivo je da je linalil acetat pokazao stimulativni učinak na rast *P. savastanoi* pv. *savastanoi* metodom razrjeđenja u tekućem mediju, što je utvrđeno povećanjem vrijednosti apsorbancije na svim testiranim koncentracijama. Ovaj fenomen ukazuje na potencijalnu biostimulaciju, koja zahtijeva dodatna istraživanja kako bi se razjasnio njegov mehanizam i značaj. Slabija učinkovitost nekih komponenti, poput linalil acetata, mogla bi biti povezana s genetskom sposobnosti *P. savastanoi* pv. *savastanoi* da razgrađuje fenolne spojeve i koristi ih kao izvor energije za vlastiti rast. Također, nepolarna priroda biljnih spojeva može ometati njihovu difuziju kroz hranjivi medij, što dovodi do varijabilnosti rezultata istraživanja između laboratorija (Bubonja i sur., 2008; Balouri i sur., 2016). Stoga, postoji potreba i za standardizacijom metoda ispitivanja antibakterijskih

svojstva biljnih spojeva, temeljem razlika u difuzijskom potencijalu pojedinog spoja. Hidrofobna svojstva EtU mogu utjecati na rezultate testiranja, pri čemu bi povećanje temperature inkubacije potencijalno moglo poboljšati topljivost i učinkovitost većih molekula u razrijeđenim oblicima, kako sugeriraju autori Bogunia i Makowski (2020).

Među najučinkovitijim tretmanima u ovom istraživanju bili su karvakrol i timol, koji su pokazali snažnu antibakterijsku aktivnost već pri vrlo niskim koncentracijama (1,25 i 2,5 mg/mL), dovodeći do redukcije broja stanica bakterije >3 log unutar jednog sata. Ovi rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima koja ukazuju na jak potencijal EtU bogatih karvakrolom i timolom kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Bozkurt i sur., 2020; Wińska i sur., 2019). Međutim, ponovni rast bakterije utvrđen je nakon 6 sati od primjene EtU od mravinca *O. compactum* (kemetip karvakrol) i timijana *Thymus vulgaris* (kemetip timol) pri koncentraciji $2\times$ MIK, dok je pri višoj koncentraciji ($4\times$ MIK) inhibicija zabilježena i nakon 24 sata. Ovo sugerira da je antibakterijski učinak tih ulja ovisan o koncentraciji i vremenu izlaganja, što može biti posljedica hlapljivosti komponenti iz EtU ili interakcija unutar složenih kemijskih profila ulja.

U istraživanju Bozkurt i sur. (2020), EtU bogata karvakrolom i timolom također su pokazala najveći potencijal kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. U istom istraživanju je istaknut i potencijal EtU od mažurana *O. majorana* (kemetip terpinen-4-ol), za kojega je utvrđeno jače inhibicijsko djelovanje na rast *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u usporedbi s rezultatima ovog istraživanja. Međutim, EtU su se razlikovala u koncentraciji spoja terpinen-4-ol. Koncentracija terpinen-4-ol u istraživanju Bozkurt i sur. (2020), bila je veća u EtU *O. majorana* (31,67%) u usporedbi s ovim istraživanjem (22,54%). Navedeno sugerira da je antibakterijski potencijal komponente terpinen-4-ol ovisan o koncentraciji, što je sukladno utvrđenom baktericidnom djelovanju pri koncentraciji $4\times$ MIK na tretmanu terpinen-4-ol-a i EtU mažurana.

Hlapljivost EtU može značajno ograničiti njihovu sposobnost ulaska u stanice i učinkovite inhibicije rasta bakterije, što često dovodi do ponovnog rasta bakterija nakon određenog vremena. Da bi se prevladali ovi izazovi i poboljšala dugotrajna učinkovitost antibakterijskih učinaka EtU, predlaže se njihova inkapsulacija. U istraživanju autora Baldassarre i sur. (2023) utvrđeno je da komponenta timol, iako inicijalno učinkovit kod fitopatogene bakterije *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, gubi svoje antibakterijsko djelovanje tijekom vremena kada se koristi u slobodnoj formi. Suprotno tome, inkapsulirani oblik timola pokazuje dugotrajniju učinkovitost, što bi moglo objasniti ponovni rast *P. savastanoi* pv. *savastanoi* zabilježen na tretmanu EtU od timijana *Thymus vulgaris* pri koncentraciji $2\times$ MIC, unatoč inicijalnim antibakterijskim učincima unutar prvih 6 sati.

Fenolne komponente poput karvakrola i timola djeluju na bakterije prvenstveno oštećivanjem stanične membrane, što dovodi do curenja metabolita i, konačno, smrti bakterije

(Wińska i sur., 2019). U ovom istraživanju, tretman *P. savastanoi* pv. *savastanoi* s karvakrolom i EtU od mravinca (*Origanum compactum*) pokazao je jače oštećenje stanične membrane, s izraženijim učinkom na tretmanu karvakrolom. Antimikrobni mehanizmi EtU, posebno komponenti kao što su karvakrol i timol, povezani su s njihovim lipofilnim i hidrofobnim svojstvima, koja im omogućuju prolazak kroz stanične membrane mikroorganizama (Rastgou i sur., 2022; Wińska i sur., 2019). Nakon što ovi spojevi prođu kroz membranu, mogu izazvati smrt bakterije putem raznih mehanizama, uključujući lizu staničnih membrana, inhibiciju sinteze proteina, koagulaciju citoplazme, povećanje propusnosti membrane i promjene u staničnom pH (Camele i sur., 2019; Kröl i sur., 2013). Takva multifaktorska priroda antimikrobnog djelovanja čini karvakrol, timol i slične komponente izuzetno perspektivnim tvarima u borbi protiv fitopatogenih bakterija, ali i ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima inkapsuliranih formulacija kako bi se poboljšala njihova dugoročna učinkovitost.

Unatoč izraženom antibakterijskom učinku EtU i njihovih komponenti, poput karvakrola i timola, postoji zabrinutost oko njihove fitotoksičnosti, posebno prema drvenastim vrstama kao što je maslina. Antibakterijski učinak većine ispitivanih EtU bio je jednak ili čak snažniji od tradicionalnih bakarnih preparata, no literatura još uvijek nedovoljno pokriva učinke ovih ulja na samu biljku. To naglašava potrebu za daljnjim istraživanjima kako bi se procijenio rizik primjene EtU u zaštiti bilja, posebno u kontekstu očuvanja zdravlja biljaka i njihove produktivnosti. Potaknuti time, u ovom je istraživanju provedena preliminarna evaluacija fitotoksičnosti karvakrola, koji je odabran zbog mnogobrojnih istraživanja njegovih antibakterijskih svojstava u različitim znanstvenim područjima (NCBI, 2023; Aydin i sur., 2014). Karvakrol se smatra jednim od najčešće istraživanih fenolnih spojeva, ali njegova toksičnost prema biljkama, osobito prema maslini, nije dovoljno istražena.

Fitotoksičnost se definira kao sposobnost tvari da izazove štetne promjene u ili na biljkama i predstavlja ključni aspekt koji se treba istražiti prije primjene u poljoprivrednoj praksi. Prethodno istraživanje u kojemu je istraživana bioherbicidni učinak EtU, sugerira moguću fitotoksičnost karvakrola prema maslini (Verdeguer i sur., 2020). Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati razinu i simptome fitotoksičnosti karvakrola prilikom folijarne primjene na sadnice masline. Terpenoidi, uključujući komponente kao što su karvakrol, mogu izazvati promjene u/na biljkama koje sliče simptomima koje uzrokuje stres od visokog saliniteta. Simptomi takvog stresa podrazumijevaju povećanje koncentracije abscisinske kiseline, zatvaranje stomata, porast temperature na listovima, inhibiciju mitoze, gubitak kutikularnog voska i promjene u mikrotubulima (Raveau i sur., 2020).

U ovom istraživanju utvrđeno je da karvakrol može biti fitotoksičan prema maslini ukoliko se primjenjuje folijarno. Fitotoksičnost karvakrola zabilježena je već nakon jednog dana

od tretiranja sadnica masline sorte Leccino u plasteniku. Simptomi su se manifestirali u vidu nekrotičnih lezija na mladim listovima, a njihov intenzitet pojave bio je ovisan o primijenjenoj dozi. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji (2× MIK; 2,5 mg/mL), primijećen je najveći intenzitet oštećenja, uključujući 12,9% izbojaka i 78,3% listova. Na tretmanu MIK (1,25 mg/mL), fitotoksičnost je bila slabija, s 2,80% izbojaka i 34,3% oštećenih listova.

Fitotoksičnost karvakrola potencijalno može varirati ovisno o klimatskim uvjetima, fazi rasta masline i načinu primjene. Temeljem rezultata ovog istraživanja, potrebno je provesti daljnja sveobuhvatna testiranja biljnih spojeva u različitim vremenskim periodima poput ranog proljeća ili tijekom faze mirovanja vegetacije masline. Takav pristup može razjasniti kako i u kojem intenzitetu temperatura i fenološka faza biljke mogu utjecati na fitotoksičnost karvakrola i drugih sličnih komponenti, što će omogućiti i bolje razumijevanje njihove primjene u nasadima.

Ovi rezultati naglašavaju važnost daljnjih istraživanja formulacije i načina primjene odabranih bioaktivnih spojeva kako bi se maksimizirao njihov antibakterijski potencijal uz minimiziranje potencijalne fitotoksičnosti. Buduća istraživanja trebala bi obuhvatiti testiranje učinkovitosti karvakrola prije same infekcije masline bakterijom *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Istraživanje različitih koncentracija karvakrola, kao i dodavanje adjuvanata u formulacije, moglo bi biti korisno za smanjenje fitotoksičnosti. Korištenje adjuvanata može pomoći u ravnomjernijoj distribuciji karvakrola na površini biljke, smanjujući lokalizirane toksične učinke dok se istovremeno zadržava antibakterijski učinak. Kombinacijom precizno dozirane primjene antimikrobnih spojeva, adekvatne formulacije i detaljnih ispitivanja fitotoksičnosti značajno bi se doprinijelo razvoju učinkovitih i ekološki prihvatljivih SZB, a s ciljem postizanja ravnoteže između zaštite od bolesti i očuvanja prinosa.

5.5. Antibakterijski učinak biljne vode masline i fenola hidroksitirozola kod *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Antibakterijski potencijal utvrđen je i za biljne vode, a temeljen je na razlikama u pH reakciji tretmana i ukupnom sadržaju fenolnih spojeva. Na taj način je obuhvaćen širi raspon koncentracija fenola te moguće razlike u fenolnom profilu biljne vode od različitih sorti masline. Iako je u uzorcima s nižim pH sadržaj fenola trebao biti veći u odnosu na netretirane uzorke (Jerman Klen i Mozetič Vodopivec., 2011), analizom su utvrđene su niže koncentracije ukupnih fenola kod tretiranih biljnih voda. Kako bi se odredio ukupni sadržaj fenola, korišten je FCR, pri čemu je bilo neophodno dodati natrijev karbonat za postizanje pH 10 (Pérez i sur., 2023). Unatoč tome što je dodatak 0,10–0,25 µL tretiranog uzorka biljne vode trebao omogućiti neometanu reakciju, navedeno bi moglo biti uzrok smanjenja koncentracije fenola u uzorcima koji su zakiseljeni na pH 2.

Utvrđeno je da izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* nisu osjetljivi na biljne vode masline kada je korištena metoda difuzije aktivne tvari kroz čvrsti hranjivi medij pomoću diskova, bez obzira na to jesu li uzorci tretirani ili netretirani HCl-om. Ovi rezultati su u suprotnosti s nekim prethodnim istraživanjima u kojima je utvrđeno antibakterijsko djelovanje biljne vode masline (Russo i sur., 2022; Krid i sur., 2011; Ciafardini i Zullo, 2003). Prema autorima Caballo-Ponce i sur. (2018) i Mandal i sur. (2010), jedan od mogućih uzroka neučinkovitosti je degradacija fenolnih spojeva od strane bakterije. Također, otežana difuzija tretmana kroz hranjivi medij u *in vitro* uvjetima može dodatno smanjiti njihovu učinkovitost (Bubonja-Šonje i sur., 2020; Eloff, 2019).

Na nekoliko tretmana primijećena je stimulacija rasta izolata *P. savastanoi* pv. *savastanoi* prilikom testiranja učinka biljne vode metodom mikro razrjeđenja aktivne tvari u tekućem hranjivom mediju. Navedeno sugerira mogućnost da su bakterije iskoristile šećere, druge organske spojeve i mikroelemente prisutne u biljnoj vodi kao izvor energije za svoj rast, što bi moglo potisnuti potencijal antibakterijskih fenolnih spojeva. Osim toga, degradacija fenola tijekom skladištenja uzoraka mogla bi objasniti nedostatak učinkovitosti kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, što ukazuje na to da bi se daljnja istraživanja mogla provesti kako bi se utvrdili optimalni uvjeti skladištenja uzoraka s ciljem očuvanja kemijskog sastava s antibakterijskim djelovanjem.

Unatoč nižem sadržaju ukupnih fenola u tretiranim biljnim vodama, na tretmanima R+ i R, zabilježena je inhibicija rasta referentnog izolata za 55% i 56%. Pretpostavka je da je hrvatski izolat I7 L, slabije osjetljiv na primjenu biljne vode *in vitro*, dok je istovremeno pokazao najvišu razinu virulentnosti na sadnicama masline *in vivo*.

Obzirom na odsutnost antibakterijskog djelovanja biljne vode biljne vode masline, rezultati ovog istraživanja nisu u skladu s prethodnim istraživanjem autora Krid i sur. (2011), gdje je utvrđeno da biljne vode biljne vode masline posjeduju antibakterijska svojstva. U nedavnom istraživanju autora Russo i sur. (2022), istaknuto je da način filtracije uzoraka značajno utječe na antibakterijski potencijal nusproizvoda od ekstrakcije ulja masline. Autori su utvrdili da su inhibitorne koncentracije tretmana ovisne o ukupnom sadržaju fenola, pri čemu su niže MIK vrijednosti utvrđene na tretmanima s višim koncentracijama fenola. Navedeno sugerira da sadržaj ukupnih fenola u uzorcima biljne vode masline obuhvaćenih ovim istraživanjem, nije bio dovoljan za postizanje antibakterijskog učinka.

Primijećeno povećanje apsorpcije, odnosno broja bakterija s povećanjem razrjeđenja uzoraka biljne vode, mogući je rezultat nedovoljne koncentracije fenola potrebnih za inhibiciju rasta bakterije. Stoga je biljna vodavjerojatno služila kao izvor topivih šećera i drugih hranjivih tvari, što je potaknulo rast i razvoj bakterije na tretmanima. Navedeno je u skladu s hipotezom da je slab učinak biljne vode biljne vode masline temeljen na niskom sadržaju ukupnih fenola. Naime, u istraživanju Ciafardini i Zullo (2003), MIK vrijednosti biljne vode utvrđene su tek pri koncentraciji ukupnih fenola od 2,5 mg/mL kod *X. campestris* spp. Sukladno tome, potrebno je istražiti učinke načina ekstrakcije, primjene i razlike u sojevima bakterija kako bi se jasnije definirali uvjeti koji omogućuju maksimalan antibakterijski potencijal spojeva biljnog porijekla.

U usporedbi s istraživanjem autora Russo i sur. (2022), primijećeno je da su koncentracije ukupnih fenola u tretmanima biljne vode koji su analizirani u ovom istraživanju, slične koncentracijama fenola nakon filtracije biljne vode masline (MF2) u istraživanju Russo i sur. (2022). U oba istraživanja je zabilježen izostanak antibakterijskog učinka, što sugerira da sadržaj ukupnih fenola nije jedini faktor koji utječe na antibakterijski potencijal biljne vode biljne vode masline. Stoga je naglašena potreba za daljnjom evaluacijom antibakterijskog potencijala biljne vode biljne vode masline koje su testirane u ovom istraživanju, istraživanjem tretmana dobivenih različitim metodama ekstrakcije i filtracije, koje bi mogle sačuvati antibakterijski potencijal biljne vode.

U literaturi se navodi da je antibakterijski potencijal biljne vode biljne vode masline rezultat prisutnosti specifičnih fenolnih spojeva koji čine njihov kemijski sastav, s naglaskom na fenolni spoj HTyr (Medina-Martínez i sur., 2016). Rezultati ovog istraživanja djelomično podupiru ovu hipotezu. Naime, antibakterijski učinak tretmana HTyr utvrđen je kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi* kada je testirana njegova osjetljivost metodom difuzije aktivne tvari kroz hranjivi medij, pri čemu je primijećen jači učinak pri višim koncentracijama tretmana. U usporedbi s tretmanom na bazi bakra, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* je osjetljiv na HTyr.

S druge strane, antibakterijski učinak HTyr nije utvrđen kada je testiran metodom razrjeđenja u tekućem hranjivom mediju, što je suprotno od tretmana s biljnom vodom masline. U istraživanju Pannucci i sur. (2019), istraživao je antibakterijski potencijal HTyr i biljne vode masline u kombinaciji s HTyr. U istom istraživanju je primjenom HTyr u koncentraciji od 1 mg/mL, utvrđena inhibicija rasta *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Ipak, jače djelovanje utvrđeno je na tretmanu kombinacije biljne vode masline i HTyr, gdje je zabilježena potpuna inhibicija rasta bakterije. Navedeno sugerirana postojanje sinergijskog učinka fenolnih spojeva u biljnoj vodi masline, kao i važnost visokih početnih koncentracija fenola s antibakterijskim djelovanjem u kemijskom profilu za njihovo učinkovito suzbijanje fitopatogenih bakterija. Antibakterijski učinak fenola prisutnih u biljnoj vodi masline također je utvrđen kod *P. savastanoi* pv. *savastanoi* i Gram–pozitivne bakterije *C. michiganensis*, gdje je tretman HTyr jače inhibirao rast *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Capasso i sur., 1995). Unatoč varijabilnosti u antibakterijskom učinku, može se pretpostaviti da biljna voda sastojci koji čine kemijski profil, poput HTyr, posjeduju antibakterijska svojstva koja značajno ovise o njihovoj koncentraciji.

Primijećene razlike u antibakterijskom učinku biljne vode kod različitih sojeva iste vrste bakterije, moguće da su uzrokovane genetskom raznolikosti, odnosno potencijalnom prisutnosti gena za otpornost na antibakterijske tvari. Primjerice, primjenom EtU od paprene metvice *Mentha × piperita* (kemitip mentol), autori Hsouna i sur. (2019) utvrdili su razlike u vrijednostima MIK (od 0,01 do 12,5 mg/mL) kod različitih sojeva vrste *R. radiobacter*. Razlika sojeva u osjetljivosti prema tvarima biljnog porijekla može biti pod utjecajem genetske plastičnosti bakterija, kao i drugih bioloških mehanizama koji određuju pokretljivost, otpornost i patogenost bakterija (Ashraf i sur., 2014; Camerom i Sarojini, 2014). Raznolikosti u sojevima iste vrste bakterije utvrđene su i u istraživanju Moretti i sur. (2017), gdje su izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* s istočne obale južnog Jadrana slabije virulentni u usporedbi s talijanskim i portugalskim izolatima. Ipak, u ovom istraživanju utvrđeno je da je hrvatski soj I7 L (sjeverni Jadran) virulentniji od testiranih izolata iz Italije, Slovenije, kao i drugih dijelova Istre, što dodatno naglašava važnost razumijevanja genetskih i bioloških čimbenika koji utječu na otpornost bakterija na antibakterijske tvari, a može imati ključnu ulogu u razvoju učinkovitijih strategija za suzbijanje fitopatogenih bakterija.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, izvedeni su sljedeći ključni zaključci:

1.

Simptomi bakterioznog raka masline utvrđeni su na 23 različite sorte masline u istraživanim maslinicima Istre. Korištenjem molekularne metode *real-time* PCR, potvrđena je prisutnost bakterije *P. savastanoi* pv. *savastanoi* u ukupno 32 od 102 uzorka zaraženog biljnog materijala, što čini 31,4% od ukupnog broja uzoraka. Izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* su, prema LOPAT shemi, grupirani tipično za vrstu, međutim, kod većine izolata nije zabilježena proizvodnja fluorescentnog pigmenta *in vitro*, što ukazuje na specifičnost hrvatskih izolata. Utvrđene su značajne razlike u patogenosti hrvatskih izolata; izolat B45 C-PR pokazao je najnižu, dok je izolat I7 L pokazao najvišu razinu virulentnosti.

2.

Testirane sorte masline potencijalno se mogu razvrstati u četiri kategorije osjetljivosti: 1—niska osjetljivost (Istarska bjelica); 2—osjetljiva (Leccino); 3—visoka osjetljivost (Frantoio i Buža); 4—vrlo visoka osjetljivost (Rosinjola).

3.

Eterično ulje paprene metvice (*Mentha × piperita*), kemotipa mentol, te komponenta tog ulja – DL-mentol, ističu se kao učinkoviti u suzbijanju rasta patogena, s utvrđenim minimalnim inhibitornim koncentracijama (MIK) pri 2,5 i 5,0 mg/mL. Također, snažno antibakterijsko djelovanje pri vrlo niskim koncentracijama utvrđeno je za karvakrol (1,25 mg/mL) i timol (2,5 mg/mL), primijenjeni kao pojedinačni tretmani ili u specifičnim kemotipovima eteričnih ulja origana (*Origanum compactum*) (0,31 mg/mL) i timijana (*Thymus vulgaris*) (0,63 mg/mL). Tretirane biljne vode masline pokazale su relativno slab antibakterijski učinak, dok je bakterija bila osjetljiva prema tretmanu fenolom hidroksitirozolum (HTyr), iako metodom razrjeđenja nije utvrđena MIK.

4.

Intenzitet oštećenja listova na sadnicama masline nakon folijarne primjene otopine karvakrola bio je proporcionalan primijenjenoj dozi, što ukazuje na fitotoksičnost pri višim koncentracijama. Veća oštećenja u vidu nekrotičnih lezija utvrđena su primjenom koncentracije od 2,5 mg/mL u usporedbi s primjenom tretmana u koncentraciji od 1,25 mg/mL. Oštećenja su bila vidljiva na licu mladih listova masline, dok se svježja i suha masa listova nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu varijantu.

7. POPIS LITERATURE

1. Abuamsha R., Kluepfel D., McClean A., Salman M. (2023). Evaluation of Commercial Olive Accessions for Resistance to the Olive Knot Disease Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Arabian Journal for Science and Engineering* 49: 87–95. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13369-023-08054-7>
2. Aires A., Mota V.R., Saavedra M.J., Monteiro A.A., Simões M., Rosa E.A.S., Bennett R.N. (2009). Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 106: 2096–2105. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04181.x>
3. Al-Baharwee N.I.K., Qasim W.S., Abdlla Y.A. (2023). Phytochemical analysis of *Annona atemoya* seed extract by HPLC and their ability to inhibit the growth of *Agrobacterium tumefaciens*. *Biodiversitas* 24: 603–608. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240168>
4. Alfano J.R., Charkowski A.O., Deng W.L., Badel J.L., Petnicki-Ocwieja T., Van Dijk K., Collmer A. (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 4856–4861. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.9.4856>
5. Amensour M., Sendra E., Perez-Alvarez J.A., Skali-Senhaji N., Abrini J., Fernández-López J. (2010). Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods for Human Nutrition* 65: 170–178. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0168-2>
6. Andre W.P.P., Ribeiro W.L.C., Cavalcante G.S., dos Santos J.M.L., Macedo I.T.F., de Paula H.C.B., de Freitas R.M., de Moraes S.M., de Melo J.V., Bevilaqua M.L. (2016). Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology* 218: 52–58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.001>
7. Añorga M., Pintado A., Ramos C., De Diego N., Ugena L., Novák O., Murillo J. (2020). Genes *ptz* and *idi*, coding for cytokinin biosynthesis enzymes, are essential for tumorigenesis and *in planta* growth by *P. syringae* pv. *savastanoi* NCPPB 3335. *Frontiers in Plant Science* 11: 1294. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01294>
8. Arrebola E., Cazorla F.M., Perez-García A., de Vicente A. (2011). Chemical and metabolic aspects of antimetabolite toxins produced by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Toxins* 3: 1089–1110. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins3091089>

- 9.Ashraf S., Chatha M.A., Ejaz W., Janjua H.A., Hussain I. (2014). Lysozyme-coated silver nanoparticles for differentiating bacterial strains on the basis of antibacterial activity. *Nanoscale Research Letters* 9: 565. DOI: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-565>
- 10.Aydin E., Türkez H., Sait Keles M. (2014). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology* 66(1): 149–157. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9547-5>
- 11.Ayilara M.S., Adeleke B.S., Akinola S.A., Fayose C.A., Adeyemi U.T., Gbadegesin L.A., Omole R.K., Johnson R.M., Uthman Q.O., Babalola O.O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology* 14: 1040901. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>
- 12.Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Shafrif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117: 426–436. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- 13.Badawy M.E.I., Abdelgaleil S.A.M. (2014). Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial Crops and Products* 52: 776–782. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.003>
- 14.Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- 15.Baldassarre F., Schiavi D., Ciarroni S., Tagliavento V., De Stradis A., Vergaro V., Suranna G.P., Balestra G.M., Ciccarella G. (2023). Thymol-Nanoparticles as Effective Biocides against the Quarantine Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nanomaterials* 13(7): 1285. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano13071285>
- 16.Balouri M., Sadiki M., Ibnsoouda S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- 17.Baltrus D.A., Mccann H.C., Guttman D.S. (2017). Evolution, genomics, and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Pathology* 18: 152–168. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12506>
- 18.Barić, B. (2006.): Integrirana zaštita maslina od bolesti i štetnika unutar integrirane proizvodnje. *Pomologia Croatica* 12 (1): 87–92.
- 19.Benali T., Bouyahya A., Habbadi K., Zengin G., Khabbach A., Achbani E.H., Hammani K. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Cistus ladaniferus* subsp. *ladanifer* and *Mentha suaveolens* against

- phytopathogenic bacteria and their ecofriendly management of phytopathogenic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 28: 101696. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101696>
20. Berge O., Monteil C.L., Bartoli C., Chandeysson C., Guilbaud C., Sands D.C., Morris C.E. (2014). A user's guide to a database of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE* 9: e105547. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547>
 21. Bjeliš M. (2005). Zaštita masline u ekološkoj proizvodnji. Vlastita naklada, Solin.
 22. Blašković L.; Jelić D., Malečić, B., Omazić, B., Güttler I., Telišman Prtenjak M. (2023). Trend analysis and climatology of hail in Croatia. *Atmospheric research*, 294: 106927, 14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2023.106927>
 23. Podaci o odgovornosti Bogunia M., Makowski M. (2020). Influence of Ionic Strength on Hydrophobic Interactions in Water: Dependence on Solute Size and Shape. *The Journal of Physical Chemistry B* 124: 10326–10336. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c06399>
 24. Bouaziz M., Grayer R.J., Simmonds M.S.J., Damak M., Sayadi S. (2005). Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar Chemlali growing in Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 236–241. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf048859d>
 25. Boucekouk C., Zohra Kara F., Tail G., Saidi F., Benabdelkader T. (2019). Essential oil composition and antibacterial activity of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Biologia Futura* 70: 56–61. DOI: <https://doi.org/10.1556/019.70.2019.07>
 26. Bouhdid S., Skali S.N., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Amensour M., Abrini J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *African Journal of Biotechnology* 7: 1563-1570. DOI: <https://doi.org/10.4314/AJB.V7I10.58723>
 27. Bozkurt I.A., Soylu S., Kara M., Soylu E.M. (2020). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Isolated from Medicinal Plants against Gall Forming Plant Pathogenic Bacterial Disease Agents. *Journal of Agriculture and Nature* 23: 1474–1482. DOI: <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.723544>
 28. Braun-Kiewnick A., Sands D.C. (2001). Gram-negative bacteria. U: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 3rd ed. (ur. Schaad N.W., Jones J.B., Chun W.), APS Press, St. Paul, MN, USA, str. 84–103.
 29. Brenes M., García A., Santos B., Medina E., Romero C., de Castro A., Romero F. (2011). Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. *Food Chemistry* 125: 1262–1266. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.055>

30. Brentini Santiago M., da Silva Moraes T., Massuco J.E., Silva L.O., Lucarini R., da Silva D.F., Manzini Vieira T., Miller Crotti A.E., Gomes Martins C.H. (2018). *In vitro* evaluation of essential oils for potential antibacterial effects against *Xylella fastidiosa*. Journal of Phytopathology 166: 790–798. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12762>
31. Broniarek-Niemiec A., Børve J., Puławska J. (2023). Control of Bacterial Canker in Stone Fruit Trees by Chemical and Biological Products. Agronomy 13: 1166. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13041166>
32. Bubonja M., Mesarić M., Miše A., Jakovac M., Abram M. (2008). Utjecaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom. Medicina 44(3-4): 280–284.
33. Bubonja-Šonje M., Knežević M., Abram M. (2020). Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 71: 300–311. DOI: <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>
34. Bultreys A., Gheysen I., Maraite H., de Hoffman E. (2001). Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification. Applied and Environmental Microbiology 67: 1718–1727. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1718-1727.2001>
35. Buonauro R., Moretti C., da Silva D.P., Cortese C., Ramos C., Venturi V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. Frontiers in Plant Science 6: 434. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00434>
36. Caballero-Guerrero B., Garrido-Fernández A., Feroso F.G., Rodríguez-Gutierrez G., Fernández-Prior M.A., Reinhard C., Nyström L., Benítez-Cabello A., Née Arroyo-López F. (2022). Antimicrobial effects of treated olive mill waste on foodborne pathogens. LWT Food Science and Technology 164: 113628. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113628>
37. Caballo-Ponce E., Meng X., Uzelac, G., Halliday N., Cámara M., Licastro D., da Silva D.P., Ramos C., Venturi V. (2018). Quorum Sensing in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Erwinia toletana*: Role in Virulence and Interspecies Interactions in the Olive Knot. Applied and Environmental Microbiology 84: e00950-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00950-18>
38. Caballo-Ponce E., Murillo J., Martínez-Gil M., Moreno-Pérez A., Pintado A., Ramos C. (2017). Knots Untie: Molecular Determinants Involved in Knot Formation Included by *Pseudomonas savastanoi* in Woody Hosts. Frontiers in Plant Science 8: 1089. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01089>

- 39.Camele I., Elshafie H.S., Caputo L., De Feo V. (2019). Anti-quorum Sensing and Antimicrobial Effect of Mediterranean Plant Essential Oils against Phytopathogenic Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 10: 2619. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02619>
- 40.Camele I., Grul'ova D., Elshafie H.S. (2021). Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Mentha × piperita* cv. 'Kristinka' Essential Oil. *Plants* 10: 1567. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10081567>
- 41.Cameron A., Sarojini V. (2014). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives. *Plant Pathology* 63: 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12066>
- 42.Caparrotta S., Comparini D., Marone E., Kimmenfield R., Luzziatti L., Taiti C., Mancuso S. (2019). Correlation between VOC fingerprinting and antimicrobial activity of several essential oils extracted by plant resins against *A. tumefaciens* and *P. savastanoi*. *Flavour and Fragrance Journal* 5: 377–387. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.3518>
- 43.Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru' G., Marcialis M.A., Cristinzio G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 393–398. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03153.x>
- 44.Cardoni M., Mercado-Blanco J. (2023). Confronting stresses affecting olive cultivation from the holobiont perspective. *Frontiers in Plant Science* 14: 1261754. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1261754>
- 45.Castañeda-Ojeda M.P., Moreno-Pérez A., López-Solanilla E., Ramos C. (2017). Suppression of plant immune responses by the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 type III effector tyrosine phosphatases HopAO1 and HopAO2. *Frontiers in Plant Science* 5: 680. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00680>
- 46.Catara V., Cubero J., Pothier J.F., Bosis E., Bragard C., Đermić E., Holeva M.C., Jacques M.A., Petter F., Pruvost O., Robène I., Studholme D.J., Tavares F., Vicente J.G., Koebnik R., Costa J. (2021). Trends in Molecular Diagnosis and Diversity Studies for Phytosanitary Regulated *Xanthomonas*. *Microorganisms* 9: 862. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040862>
- 47.Cerboneschi M., Decorosi F., Biancalani C., Ortenzi M.V., Macconi S., Giovannetti L., Viti C., Campanella B., Onor M., Bramanti E., Tegli S. (2016). Indole-3-acetic acid in plant-pathogen interactions: A key molecule for *in planta* bacterial virulence and fitness. *Research in Microbiology* 167: 774–787. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.09.002>
- 48.Cesari E., Marocchi F., L'Aurora A., Pucci N., Scala V., Loreti S., Scortichini M. (2023). Occurrence of copper-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains in

- kiwifruit orchards of Central Italy. *Journal of Phytopathology* 171: 768–774. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.13219>
49. Chiocchio I., Mandrone M., Tacchini M., Guerrini A., Poli F. (2023). Phytochemical Profile and In Vitro Bioactivities of Plant-Based By-Products in View of a Potential Reuse and Valorization. *Plants* 12: 795. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12040795>
 50. Chouhan S., Sharma K., Guleria S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* 4: 58. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
 51. Ciafardini G., Zullo B.A. (2003). Antimicrobial activity of olive-mill waste water polyphenols on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* spp. *Annals in Microbiology* 53: 283–290. DOI: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1995.TB03153.X>
 52. Clarke S. (2008). Composition of essential oils and other materials. U: *Essential Chemistry for Aromatherapy* (2nd Edition) (ur. Clarke S.). Churchill Livingstone, str. 123-229.
 53. Clinical Laboratory Standards Institute (1999). CLSI, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI Document M26-A., Wayne, PA, USA, 1999. (preuzeto s: https://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf; 05.09.2021.)
 54. D'agostino M., Tesse N., Fripiat J.P., Machouart M., Debourgogne A. (2019). Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. *Molecules* 24: 3713. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24203713>
 55. de Almeida J.M., Crippa B.L., Martins Alencar de Souza V.V., Perez Alonso V.P., da Motta Santos Júnior E., Picone C.F.S., Prata A.S., Silva N.C.C. (2023). Antimicrobial action of Oregano, Thyme, Clove, Cinnamon and Black pepper essential oils free and encapsulated against foodborne pathogens. *Food Control* 144: 109356. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109356>
 56. de Sousa Barros A., de Moraes S.M., Ferreira P.A.T., Vieira I.G.P., Craveiro A.A., Fontenelle R.O.S., de Menezes J.E.S.A., da Silva F.W.F., de Sousa H.A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products* 76: 557–564. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.004>
 57. Direktiva 2009/128/EK – Narodne novine. (preuzeto s: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2023_03_26_429.html; : 26.03.2023.)
 58. Ditsawanon T., Roytrakul S., Phaonakrop N., Charoenlappanit S., Thaisakun S., Parinthawong N. (2022). Novel Small Antimicrobial Peptides Extracted from

- Agricultural Wastes Act against Phytopathogens but Not Rhizobacteria. *Agronomy* 12: 1841. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12081841>
- 59.El-Abbassi A., Saadaoui N., Kiai H., Raiti J., Hafidi A. (2017). Potential application of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. *Science of The Total Environment* 576: 10–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.032>
 - 60.Elcocks E.R., Spencer-Phillips P.T.N., Adukwu E.C. (2019). Rapid bactericidal effect of cinnamon bark essential oil against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* 128: 1025–1037. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14538>
 - 61.Eloff J.N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 22: 106. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>
 - 62.Elshafie H.S., Camele I., Mohamed A.A. (2023). A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences* 24(4): 3266. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
 - 63.Facchini P.J. (2001). ALKALOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 29-66. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29>. PMID: 11337391
 64. Feizi H., Tahan V., Kariman K. (2023). *In vitro* antibacterial activity of essential oils from *Carum copticum* and *Ziziphora clinopodioides* plants against the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Biosystems* 157: 487–492. DOI: <https://doi.org/10.1080/11263504.2023.2165564>
 - 65.Feki M., Allouche N., Bouaziz M., Gargoubi A., Sayadi S. (2006). Effect of storage of olive mill wastewaters on hydroxytyrosol concentration. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108: 1021–1027. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500348>
 - 66.Fenibo E.O., Ijoma G.N., Matambo, T. (2021). Bipesticides in Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed by Green Chemistry Principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: 619058. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>
 - 67.Fitosanitarni informacijski sustav (2024). fis.mps.hr –Zagreb, Hrvatska. (preuzeto s: - <https://fis.mps.hr/fis/javna-trazilica-szb/>;27.09.2024.)
 - 68.Godena S., Dminić I., Đermić E. (2012). Differential Susceptibility of olive varieties to olive knot disease in Istria. *Journal of Central European Agriculture* 13: 85–94. DOI: <https://doi.org/10.5513/JCEA01/13.1.1018>

69. Gomila M., Busquets A., Mulet M., García-Valdés E., Lalucat J. (2017). Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analyses. *Frontiers in Microbiology* 8: 2422. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>
70. Gonçalves L.A., Lorenzo J.M., Trindade M.A. (2021). Fruit and Agro-Industrial Waste Extracts as Potential Antimicrobials in Meat Products: A Brief Review. *Foods* 10: 1469. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10071469>
71. Gori A., Cerboneschi M., Tegli S. (2012). High-Resolution Melting Analysis as a powerful tool to discriminate and genotype *Pseudomonas savastanoi* pathovars and strains. *PLoS ONE* 7: e30199. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030199>
72. Gormez A., Bozari S., Yanmis D., Gulluce M., Sahin F., Agar G. (2015). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Two Species of Lamiaceae against Phytopathogenic bacteria. *Polish Journal of Microbiology* 64: 121–127. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26373171/>
73. Grul'ová D., Caputo L., Elshafie H.S., Baranová B., De Martino L., Sedlák V., Gogal'ová Z., Poráčová B., Camele I., De Feo V. (2020). Thymol Chemotype *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Selective Bio-Based Herbicide on Monocot Plant Species. *Molecules* 25: 595. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25030595>
74. Gupta A., Bhardwaj M., Phan Tran L.S. (2020). Jasmonic Acid at the Crossroads of Plant Immunity and *Pseudomonas syringae* Virulence. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 7482. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21207482>
75. György É., Laslo É., Salamon B. (2023). Antimicrobial impacts of selected Lamiaceae plants on bacteria isolated from vegetables and their application in edible films. *Food Bioscience* 51: 102280. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102280>
76. Hall B.H., Cother E.J., Whattam M., Noble D., Luck J., Cartwright D. (2004). First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology* 33: 433–436. DOI: <https://doi.org/10.1071/AP04031>
77. Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3): 346-363. DOI: <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>
78. Hsouna A.B., Touj N., Hammami I., Dridi K., Al-Ayed A.S., Hamdi N. (2019). Chemical Composition and *in vivo* Efficacy of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. in the Suppression of Crown Gall Disease on Tomato Plants. *Journal of Oleo Science* 68: 419–426. DOI: <https://doi.org/10.5650/jos.ess18261>
79. Hudzicki J. (2009). Kirby–Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology: Washington, DC, USA (preuzeto s: chrome-

- extension://efaidnbmnnnibpcajpcgicfindmkaj/https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf; 10.02.2022).
80. Hyldgaard M., Mygind M., Meyer R.L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3: 12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
 81. Iannotta N., Monardo D., Noce M. E., Perri L. (2005). Susceptibility of olive genotypes to *Pseudomonas savastanoi* (Smith). U: Proceedings of the meeting IOBC/WPRS "Integrated Protection of Olive Crops", Florence, Italy, Darmstadt, Germany str. 253–258.
 82. Ichinose Y., Taguchi F., Mukaihara T. (2013). Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. *Journal of General Plant Pathology* 79: 285–296. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0452-8>
 83. Janačković P., Rajčević, N., Gavrilović, M., Novaković, J., Radulović, M., Miletić M., Janakiev T., Dimkić, I., Marin P.D. (2022). Essential Oil Composition of *Ambrosia artemisiifolia* and Its Antibacterial Activity against Phytopathogens. *Biology and Life Sciences Forum* 15: 22. DOI: <https://doi.org/10.3390/IECD2022-12348>
 84. Jelić D., Megyeri O.A., Malečić B., Belušić Vozila A., Strelec Mahović N., Telišman Prtenjak M. (2020). Hail climatology along the northeastern Adriatic. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 125: 1-18.
DOI: <https://doi.org/10.1029/2020JD032749>
 85. Jerman Klen, T., Mozetič Vodopivec, B. (2011). Ultrasonic Extraction of Phenols from Olive Mill Wastewater: Comparison with Conventional Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(24): 2725–2731. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/jf202800n>
 86. Katalinić M., Kačić S., Vitanović E. (2009). Štetnici i bolesti masline. *Agroknjiga*, Split.
 87. Kokoskova B.D., Pouvova D., Pavela R. (2011). Effectiveness of plant essential oils against *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and associated saprophytic bacteria on/in host plants. *Journal of Plant Pathology* 93: 133–139. DOI: <https://doi.org/10.4454/jpp.v93i1.283>
 88. Kraepiel Y., Barny M.A. (2016). Gram-negative phytopathogenic bacteria, all hemibiotrophs after all? *Molecular Plant Pathology* 17: 313–316. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12345>
 89. Krid S., Bouaziz M., Triki M.A., Gargouri A., Rhouma A. (2011). Inhibition of olive knot disease by polyphenols extracted from olive mill waste waters. *Journal of Plant Pathology* 93: 561–568.
 90. Krid S., Rhouma A., Quesada J.M., Penyalver R., Gargouri A. (2009). Delineation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains in Tunisia by random amplified

- polymorphic DNA analysis. *Journal of Applied Microbiology* 106: 886–894. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04058.x>
91. Kröl S.K., Skalicka-Woźniak K., Kandefer-Szerszeń M., Stepulak A. (2013). Aktywność biologiczna i farmakologiczna olejków eterycznych w leczeniu i profilaktyce chorób infekcyjnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67: 1000–1007. DOI: <https://doi.org/10.5604/17322693.1067687>
 92. Kumar J., Ramlal A., Mallick D., Mishra V. (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants* 10: 1185. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
 93. Kumar N., Goel N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* 24: e00370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>
 94. Lamichhane J.R., Varvaro L., Parisi L., Audergon J.M., Moris C.E. (2014). Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: Seeing the forests for the trees. U: *Advances in Agronomy* (ur. Sparks D.L.), Academic Press Inc., San Diego, CA, USA, str. 235–295.
 95. Lanza B., Ninfali P. (2020). Antioxidants in extra virgin olive oil and table olives: Connections between agriculture and processing for health choices. *Antioxidants* 9: 41. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9010041>
 96. Lelliot R.A., Billing E., Hayward A.C. A. (1966). Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 470–489. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x>
 97. Licciardello G., Mosca A., Di Silvestro S., Puglisi D., Russo M.P., Catara V., Caruso P. (2023). Cultivar Susceptibility to Olive Knot Disease and Association with Endophytic Microbiota Community. *Agronomy* 13: 468. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13020468>
 98. Liu Q., Yang J., Ahmed W., Wan X., Wei L., Ji G. (2022). Exploiting the antibacterial mechanism of phenazine substances from *Lysobacter antibioticus* 13-6 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Journal of Microbiology* 60: 496–510. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-022-1542-0>
 99. Liu, H.; Coulthurst, S.J.; Pritchard, L.; Hedley, P.E.; Ravensdale, M.; Humphris, S.; Burr, T.; Takle, G.; Brurberg, M.B.; Birch, P.R., Salmond G.P.C., Toth I.K. (2008). Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogens* 4: e1000093. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000093>

- 100.Lovelace A.H., Dorhmi S., Hulin M.T., Li Y., Mansfield J.W., Ma W. (2023). Effectors Identification in Plant Pathogens. *Phytopathology* 113: 637–650. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-22-0337-KD>
- 101.Mamoucha S., Prombona A., Galeou A. (2023). Evaluation of the antibacterial activity of essential oil of *Laurus nobilis* against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and potential biocidal action. *Hellenic Plant Protection Journal* 16: 29–39. DOI: <https://doi.org/10.2478/hppj-2023-0005>
- 102.Man A., Santacroce L., Jacob R., Mare A., Man L. (2019). Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study. *Pathogens* 8(1): 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- 103.Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior* 5: 359–368. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- 104.Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M.A.X., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 614–629. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- 105.Marchi G., Mori B., Pollacci P., Mencuccini M., Surico G. (2009). Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. *Plant Pathology* 58: 152–158. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01935.x>
- 106.Marchi G., Viti C., Giovannetti L., Surico G. (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112: 101–112. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0804-0>
- 107.Martinko K., Ivanković S., Đermić E., Đermić D. (2022a). Phenylboronic acid as a novel agent for controlling plant pathogenic bacteria. *Pest Management Science* 78: 2417–2422. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.6872>
- 108.Martinko K., Ivanković S., Đermić E., Đermić D. (2022b). *In vitro* antifungal effect of phenylboronic and boric acid on *Alternaria alternata*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 73: 83–87. Doi: <https://doi.org/10.2478/aiht-2022-73-3620>
- 109.Martinko K., Ivanković S., Lazarević B., Đermić E., Đermić D. (2022c). Control of early blight fungus (*Alternaria alternata*) in tomato by boric and phenylboronic acid. *Antibiotics* 11: 320. Doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030320>
- 110.Martins P.M.M., Merfa M.V., Takita M.A., De Souza A.A. (2018). Persistence in phytopathogenic bacteria: Do we know enough? *Frontiers in Microbiology* 9: 1099. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01099>

111. Medina E., Romero C., de los Santos B., de Castro A., García A., Romero F., Brenes M. (2011). Antimicrobial Activity of Olive Solutions from Stored Alpeorujo against Plant Pathogenic Microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 6927–6932. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2010386>
112. Medina-Martínez M.S., Truchado P., Castro-Ibáñez I., Allende A. (2016). Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: A current controversy. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80: 801–810. DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1116924>
113. Mijušković M. (1999). Bolesti i štetočine suptropskih voćaka. Biotehnički institute, Podgorica.
114. Mikiciński A., Sobiczewski P., Berczyński S. (2012). Efficacy of fungicides and essential oils against bacterial diseases of fruit trees. *Journal of Plant Protection Research* 52: 467–471. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0075-7>
115. Miksusanti M., Jenie S.L., Priosoeryanto B.P., Syarief R., Rekso G.T. (2008). Mode of action temu kunci (*Kaempferia pandurata*) essential oil on *E. coli* k1.1 cell determined by leakage of material cell and salt tolerance assays. *HAYATI Journal of Biosciences* 45: 101–108. DOI: <https://doi.org/10.4308/hjb.15.2.56>
116. Mina D., Pereira J.A., Lino-Neto T., Baptista P. (2020). Screening the olive phyllosphere: Search and find potential antagonists against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Frontiers in Microbiology* 11: 2051. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02051>
117. Mole B.M., Baltrus D.A., Dangl J.L., Grant S.R. (2007). Global virulence regulation networks in phytopathogenic Bacteria. *Trends in Microbiology* 15: 363–371. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.06.005>
118. Morales-Ubaldo A.L., Rivero-Perez N., Avila-Ramos F., Aquino-Torres E., Prieto-Méndez J., Hetta H.F., El-Saber Batiha G., Zaragoza-Bastida A. (2021). Bactericidal Activity of *Larrea tridentata* Hydroalcoholic Extract against Phytopathogenic bacteria. *Agronomy* 11: 957. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050957>
119. Moreno-Pérez A., Pintado A., Murillo J., Caballo-Ponce E., Tegli S., Moretti C., Rodríguez-Pelenzuela P., Ramos C. (2020). Host range determinants of *Pseudomonas savastanoi* pathovars of woody hosts revealed by comparative genomics and cross-pathogenicity tests. *Frontiers in Plant Science* 11: 973. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00973>
120. Moretti C., Ferrante P., Hosni T., Valentini F., D'Onghia A., Fatmi M., Buonauro R. (2008). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains collected from olive trees in different countries. U: *Pseudomonas Syringae* Pathovars and Related Pathogens—Identification, Epidemiology and Genomics (ur. Fatmi M.B.,

- Collmer A., Iacobellis N.S., Mansfield J.W., Murillo J., Schaad N.W., Ullrich M.), Springer Science Business Media, Berlin, Germany, str. 321–329.
121. Moretti C., Trabalza S., Granieri L., Caballo-Ponce E., Devescovi G., Del Pino A.M., Ramos C., Venturi, V., Van Den Burg H.A., Buonauro R., Palmerini C.A. (2019). A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger of the olive pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* is critical for its virulence. *Molecular Plant Pathology* 20: 716–730. DOI: <https://doi.org/10.1111/mpp.12787>
 122. Moretti C., Vinatzer B.A., Onofri A., Valentini F., Buonauro R. (2017). Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology* 66: 595–605. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12614>
 123. Morillo J.A., Antizar-Ladislao B., Monteoliva-Sánchez M., Ramos-Cormenzana A., Russell N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 25–39. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1801-y>
 124. Morris C.E., Ramirez N., Berge O., Lacroix C., Monteil C., Chandeysson C., Guilbaud C., Blischke A., Audūr Sigurbjörnsdóttir M., Vilhelmsson O.P. (2022). *Pseudomonas syringae* on plants in iceland has likely evolved for several million years outside the reach of processes that mix this bacterial complex across Earth's temperate zones. *Pathogens* 11: 357. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11030357>
 125. Mugnai L., Giovannetti L., Ventura S., Surico G. (1994). The Grouping of Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* by DNA Restriction Fingerprinting. *Journal of Phytopathology* 142: 209–218. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb00014.x>
 126. Muthee Gakuubi M., Wagacha J.M., Dossaji S.F., Wanzala W. (2016). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Microbiology* 2016: 7352509. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/7352509>
 127. Najmi Z., Calogero Scalia A., De Giglio E., Cometa S., Cochis A., Colasanto A., Locatelli M., Coisson J.D., Iriti M., Vallone L., Rimondini L. (2023). Screening of Different Essential Oils Based on Their Physicochemical and Microbiological Properties to Preserve Red Fruits and Improve Their Shelf Life. *Foods* 12: 332. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12020332>
 128. Nath P.C., Ojha A., Debnath S., Sharma M., Sridhar K., Nayak P.K., Inbaraj B.S. (2023). Biogeneration of Valuable Nanomaterials from Agro-Wastes: A Comprehensive Review. *Agronomy* 13: 561. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13020561>

- 129.Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* 6: 1451–1474. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- 130.NCBI (2023) – <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=carvacrol+antibacterial>, pristupljeno: 27 Rujan, 2023
- 131.NN 9/2017 – Pravilnik o stavljanju na tržište reprodukcijaskog sadnog materijala i sadnica namijenjenih za proizvodnju voća - https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2017_02_9_275.html
- 132.Obanor F.O., Jaspers M.V., Jones E.E., Walter M. (2008). Greenhouse and field evaluation of fungicides for control of olive leaf spot in New Zealand. *Crop Protection* 27: 1335–1342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.007>
- 133.Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 823–837. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf048569x>
- 134.Obied H.K., Bedgood Jr D.R., Prenzler P.D., Robards K. (2007). Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1238–1248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.01.004>
- 135.Pannucci E., Caracciolo R., Romani A., Cacciola F., Dugo P., Bernini R., Varvaro L., Santi L. (2019). An hydroxytyrosol enriched extract from olive mill wastewaters exerts antioxidant activity and antimicrobial activity on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Natural Product Research* 35: 2677–2684. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1662006>
- 136.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>
- 137.Patel H.K., Gomes E.N., Wu Q., Patel N., Kobayashi D.Y., Wang C., Simon J.E. (2023). Volatile metabolites from new cultivars of catnip and oregano as potential antibacterial and insect repellent agents. *Frontiers in Plant Science* 14: 1124305. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1124305>
- 138.Pérez M., Dominguez-López I., Lamuela-Raventós R.M. (2023). The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 71: 17543–17553. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>

139. Pérez-Martínez I., Zhao Y., Murillo J., Sundin G.W., Ramos C. (2008). Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *Journal of Bacteriology* 190: 625–635. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01067-07>
140. Pribetić Đ. (2006). Sorte maslina u Istri. MIH, Poreč.
141. Quesada J.M., García A., Bertolini E., López M.M., Penyalver R. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *International Microbiology* 10: 77–84. DOI: <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.11>
142. Quesada J.M., Penyalver R., Pérez-Panadés J., Salcedo C.I., Carbonell E.A., López M.M. (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology* 59: 262–269. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02200.x>
143. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
144. Rahi Y.J., Turco S., Taratufolo M.C., Tati M., Cerboneschi M., Tegli S., Valentini F., D'Onghia A., Iacobellis N.S., Balestra G.M., Mazzaglia A. (2020). Genetic diversity and population structure of *Pseudomonas savastanoi*, an endemic pathogen of the Mediterranean area, revealed up to strain level by the MLVA assay. *Journal of Plant Pathology* 102: 1051–1064. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00589-0>
145. Ramos C., Matas I., Bardaji L., Aragón I.M., Murillo J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Some like it knot. *Molecular Plant Pathology* 13: 998–1009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x>
146. Ramos C., Matas I., Bardaji L., Aragón I.M., Murillo J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Some like it knot. *Molecular Plant Pathology* 13: 998–1009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x>
147. Rastgou M., Danesh Y.R., Ercisli S., Sayyed R.Z., El Enshasy H.A., Dailin D.J., Alfarraj S., Ansari M.J. (2022). The Effect of Some Wild Grown Plant Extracts and Essential Oils on *Pectobacterium betavascularum*: The Causative Agent of Bacterial Soft Rot and Vascular Wilt of Sugar Beet. *Plants* 11: 1155. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11091155>
148. Rathod T., Padalia H., Chand S. (2017). Chemical constituents of *Mentha piperita* and *Pongamia pinnata* essential oils and their synergistic anticandidal activity with some antibiotics against multidrug resistant clinical isolates of *Candida*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6: 579–589.
149. Raveau R., Fontaine J., Lounès-Hadj S. A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. *Foods* 9: 365. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9030365>

150. Rhimini Y., Bouaichi A., Chliyah M., Msairi S., Ouzzani Touhami A., Benkirane R., Achbani E. H., Douira A. (2018). Influence of Variations in Climatic Factors and Some Cultural Practices on Knot Disease Development on Oleaster and Olive Tree (*Olea europaea* L.) Northwest of Morocco. *Annual Research and Review in Biology* 24(1): 1–3. DOI: <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/38771>
151. Rossi P.G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A., Serra D.R., Gonny M., Bolla J.M. (2007). Antibacterial action of essential oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research* 19: 176–182. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699254>
152. Russo E., Spallarossa A., Comite A., Pagliero M., Guida P., Belotti V., Caviglia D., Schito A.M. (2022). Valorization and Potential Antimicrobial Use of Olive Mill Wastewater (OMW) from Italian Olive oil Production. *Antioxidants* 11: 903. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11050903>
153. Saad R.E., Mohamed A.R., Shady A.E.M., Sheb M.S. (2008). Antibacterial screening of some essential oils, monoterpenoids and novel N-methyl carbamates based on monoterpenoids against *Agrobacterium tumefaciens* and *Erwinia carotovora*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41: 451–461. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235400600833696>
154. Salman M., Greenhut R., Preece J., Ferguson L., Kluepfel D. (2020). Field evaluation of olive (*Olea europaea*) genotypes for resistance to *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal of Plant Pathology* 102: 663–670. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00549-8>
155. Sánchez-Hernández E., González-García V., Palacio-Bielsa A., Lorenzo-Vidal B., Buzón-Durán L., Martín-Gil J., Martín-Ramos P. (2023). Antibacterial Activity of *Ginkgo biloba* Extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas* spp., and *Xanthomonas vesicatoria*. *Horticulturae* 9: 461. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040461>
156. Sanzani S.M., Schena L., Nigro F., Sergeeva V., Ippolito A., Salerno M.G. (2012). Abiotic diseases of olive. *Journal of Plant Pathology* 94(3): 469–491. DOI: <https://doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.069>
157. Sauer A.V., Santos E.M., Gonçalves-Zuliani A.M.O., Nocchi P.T.R., Nunes W.M.C., Bonato C.M. (2015). Bacteriostatic and Bactericidal Activity In Vitro of Different Essential Oils as Alternative Treatments to Control *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Acta Horticulturae* 1065: 931–936. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.116>
158. Schaad N.W. (2001). Initial identification of Common Genera. U: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 3rd Edition. (ur. Schaad N.W.; Jones J.B.;

- Chun W.), The American Phytopathological Society, APS PRESS, St. Paul, Minnesota, str. 4.
159. Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279–285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>
 160. Schloss P.D., Handelsman J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Review* 68: 686–691. DOI: <https://doi.org/10.1128/mmmbr.68.4.686-691.2004>
 161. Schollenberger M., Staniek T.M., Paduch-Cichal E., Dasiewicz B., Gadomska-Gajadur A., Mirzwa-Mróz E. (2018). The activity of essential oils obtained from species and interspecies hybrids of the *Mentha* genus against selected plant pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 17: 167–174. DOI: <https://doi.org/10.24326/asphc.2018.6.17>
 162. Scortichini M. (2020). Predisposing Factors for “Olive Quick Decline Syndrome” in Salento (Apulia, Italy). *Agronomy* 10: 1445. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10091445>
 163. Scortichini M., Rossi M.P., Salerno M. (2004). Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant Pathology* 53: 491–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01051.x>
 164. Shaaban H.A.H., El-Ghorab A.H., Takayuki S. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research* 24: 203–2012. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.659528>
 165. Sisto A., Cantore P.L., Iacobellis N.S. (2001). Preliminary results on the response of olive cultivars to artificial inoculation with *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. U: Proceedings 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, 17-20 September, 2001, Evora, Portugal, str. 240–242.
 166. Sisto A., Cipriani M.G., Morea M. (2004). Knot Formation Caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on Olive Plants Is *hrp*-Dependent. *Phytopathology* 94: 484–489. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.5.484>
 167. Strange R.N., Scott P.R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology* 43: 83–116. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
 168. Strange R.N., Scott P.R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology* 43: 83–116. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>

- 169.Strikić F. (2011). Regionalizacija maslinarske proizvodnje i sortiment. U: Maslina i maslinovo ulje: Božji dar u Hrvata (ur. Gašparec-Škočić Lj., Milat V., Ričković M., Strikić F., Tratnik M.), Mavi d.o.o., Zagreb, Hrvatska, str. 70.
- 170.Surico G., Marchi G. (2003). Olive knot disease: New insights in the ecology, physiology and epidemiology of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. U: *Pseudomonas Syringae* and Related Pathogens: Biology and Genetic (ur. Iacobellis N.S., Collmer A., Utcheson S.W., Mansfield J.W., Morris C.E., Murillo J., Schaad N.W., Stead D.E., Surico G., Ullrich M.S.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, str. 17–28.
- 171.Tarakanov R.I., Dzhalilov F.S.U. (2022). Using of Essential Oils and Plant Extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on Soybean. Plants 11: 2989. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11212989>
- 172.Tardugno R., Serio A., Pellati F., D'Amato S., Chaves López C., Bellardi M.G., Di Vito M., Savini V., Paparella A., Benvenuti S. (2019). *Lavandula intermedia* and *Lavandula angustifolia* essential oils: Phytochemical composition and antimicrobial activity against foodborne pathogens. Natural Products Research 33: 3330–3335. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1475377>
- 173.Tegli S., Carboneschi M., Fatmi M. (2017). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Asymptomatic Olive Plants. U: Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material (ur. Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.W.), APS Press, St. Paul, MN, USA, str. 311–319.
- 174.Tegli S., Carboneschi M., Marsili Libelli I., Santilli E. (2010). Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. BMC Microbiology 10: 156. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-156>
- 175.Tegli S., Gori A., Carboneschi M., Cipriani M.G., Sisto A. (2011). Type Three Secretion System in *Pseudomonas savastanoi* Pathovars: Does timing matter? Genes 2: 957–979. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes2040957>
- 176.Teviotdale B. L., Krueger W. H. (2004). Effects of timing of copper sprays, defoliation, rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease. Plant Disease 88: 131–135. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.131>
- 177.Timilsina S., Potnis N., Newberry E.A., Liyanapathirana P., Iruegas-Bocardo F., White F.F., Goss E.M., Jones J.B. (2020). *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions. Nature Reviews Microbiology 18: 415–427. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>

- 178.Todorović B., Potočnik I., Rekanović E., Stepanović M., Kostić M., Ristić M., Milijašević-Marčić S. (2016). Toxicity of twenty-two plant essential oils against pathogenic bacteria of vegetables and mashrooms. *Journal of Environmental Science and Health B* 51: 832–839. DOI: <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1208462>
- 179.Tsuji M., Ohta K., Tanaka K., Takikawa Y. (2017). Comparison among Japanese isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal agent of olive knot disease. *Journal of General Plant Pathology* 83: 152–161. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0710-2>
- 180.Turco S., Drais M.I., Rossini L., Chaboteaux E., Rahi Y.J., Balestra G.M., Iacobellis N.S., Mazzaglia A.(2022). Complete genome assembly of the levan-positive strain PVFi1 of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolated from olive knots in Central Italy. *Environmental Microbiology Reports* 14: 274–285. DOI: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13048>
- 181.Upadhyay R.K., Dwivedi P., Ahmad S. (2010). Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils against Pathogenic Bacterial Strains. *Asian Journal of Medical Sciences* 2: 152–158.
- 182.Valverde P., Zucchini M., Polverigiani S., Lodolini E.M., López-Escudero F.J., Neri D. (2020). Olive knot damages in ten olive cultivars after late-winter frost in central Italy. *Scientia Horticulturae* 266: 109274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109274>
- 183.Vasinauskiene M., Radušienė J., Žitikaite I., Surviliene E. (2006). Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. *Agronomy Research* 4: 437–440.
- 184.Verdeguer M., Sánchez-Moreiras A.M., Araniti F. (2020). Phytotoxic Effects and Mechanism of Action of Essential Oils and Terpenoids. *Plants* 9: 1571. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9111571>
185. Verhaegen M., Bergot T., Liebana E., Stancanelli G., Streissl F., Mingeot-Leclercq M.P., Mahillon J., Bragard C. (2023). On the use of antibiotics to control plant pathogenic bacteria: a genetic and genomic perspective. *Frontiers in Microbiology* 14: 1221478. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1221478>
- 186.Vuletin Selak G., Raboteg Božiković M., Abrouk D., Bolčić M., Žanić K., Perica S., Normand P., Pujić P. (2022). *Pseudomonas* ST1 and *Pantoea* Paga Strains Cohabit in Olive Knots. *Microorganisms* 10: 1528. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081529>
- 187.Wińska K., Maćzka W., Łyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. (2019). Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* 24: 2130. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>

- 188.Xie P., Cecchi L., Bellumori M., Balli D., Giovannelli L., Huang L., Mulinacci N. (2021). Phenolic Compounds and Triterpenes in Different Olive Tissues and Olive Oil By-Products, and Cytotoxicity on Human Colorectal Cancer Cells: The Case of Frantoio, Moraiolo and Leccino Cultivars (*Olea europaea* L.). *Foods* 10: 2823. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10112823>
- 189.Yakhlef W., Arhab R., Romero C., Brenes M., de Castro A., Medina E. (2018). Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. *LWT Food Science and Technology* 93: 323–328. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.044>
- 190.Young J. M. (2004). Olive knot and its pathogens. *Australasian Plant Pathology* 33: 33–39. DOI: <https://doi.org/10.1071/AP03074>
- 191.Ziegler, J., Facchini, P.J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59: 735-769. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730>
- 192.Zheng X., Weaver Spivey N., Zeng W., Liu P.P., Qing Fu Z., Klessig D.F., Yang He S., Dong X. (2012). Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host Microbe* 11: 587–596. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>
- 193.Zucchini M., Maoloni A., Lodolini E.M., Ferrocino I., Aquilanti L., Neri D. (2023). Knot formation and spread along the shoot stem in 13 olive cultivars inoculated with and indigenous pathobiome of 7 species of *Pseudomonas* including *Pseudomonas savastanoi*. *PLoS ONE* 18: e0289875. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289875>
- 194.Žužić I. (2008). Maslina i maslinovo ulje: sa posebnim osvrtom na Istru. "Olea" udruga maslinara Istarske županije, Tar.

8. Životopis autora

Laura Koščak, mag.ing.agr.

Datum i mjesto rođenja: 27. rujan 1994. Našice, Hrvatska

Matični broj znanstvenika: 396333

2021.-2025. Asistent u Laboratoriju za zaštitu bilja na Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču; Zamjenica voditeljice Laboratorija za zaštitu bilja (2022. – 2025); Pomoćnica voditeljice Pokusno-poljoprivrednog imanja Instituta u poslovima zaštite bilja (2022. – 2024.); Predstavnica zaposlenika na suradničkim radnim mjestima (asistenti i viši asistenti) u Znanstvenom vijeću Instituta (2021.-2023.)

2020. – mag. ing. agr. Fitomedicine

2017. – univ. bacc. ing. agr. Zaštite bilja

Znanstveni interesi: integralna i ekološka zaštita bilja; mediteranske kulture; osjetljivost sortimenta na biljne bolesti; bioaktivni spojevi u zaštiti bilja; održiva poljoprivreda; monitoring biljnih bolesti, štetnika i korova; molekularne metode dijagnostike biljnih bolesti

Nagrade:

- Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet - Dekanova nagrada „Alelopatski potencijal pokrivnih biljaka na klijavost, dinamiku klijanja i početni rast koštana (*Echinochloa crus-galli*) i sivog muhara (*Setaria glauca*)“. (akad. god. 2018/2019).
- Sveučilište u Zagrebu - Rektorova nagrada „Razvoj standardizirane metode prekidanja fiziološke dormantnosti sjemena ambrozije: unapređenje biotest metode utvrđivanja rezistentnih populacija“. (akd. god. 2019/2020).
- Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet - Nagrada za najbolji znanstveni rad doktoranda u akademskoj godini 2022/2023.

Usavršavanja:

- Znanstveno usavršavanje u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu, Molekularne dijagnostičke metode identifikacije bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* – PCR. – Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (HAPiH), Laboratorij za bakteriologiju - dr.sc. Jelena Plavec.
- Znanstveno usavršavanje na Molekularne dijagnostičke metode identifikacije bakterije *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* – end-point PCR, ARDRA, *real-time* PCR: Sveučilište u Firenci, Italija, Zavod za poljoprivrednu biotehnologiju, Laboratorij za molekularnu biljnu patologiju – prof. dr. sc. Stefania Tegli
- Znanstveno usavršavanje na Kmetijski inštitut Slovenija, Metode utvrđivanja anibakterijskog učinka bioaktivnih tvari – Poljoprivredni Institut Slovenije, Ljubljana, Slovenija – dr.sc. Janja Lamovšek

Projekti:

- “Prirodni bioaktivni spojevi kao izvor potencijalnih antimikrobnih tvari u suzbijanju bakterijskih i drugih gljivičnih patogena masline” (HRZZ); (nositelj: Institut za poljoprivredu i turizam u Poreču;
- European Space Agency (ESA) AMSADE – Employing Machine Learning for Ambrosia Satellite DEtection using Earth Observation Data, (nositelj: LIST LABS d.o.o.)

Stručni i znanstveni skupovi:

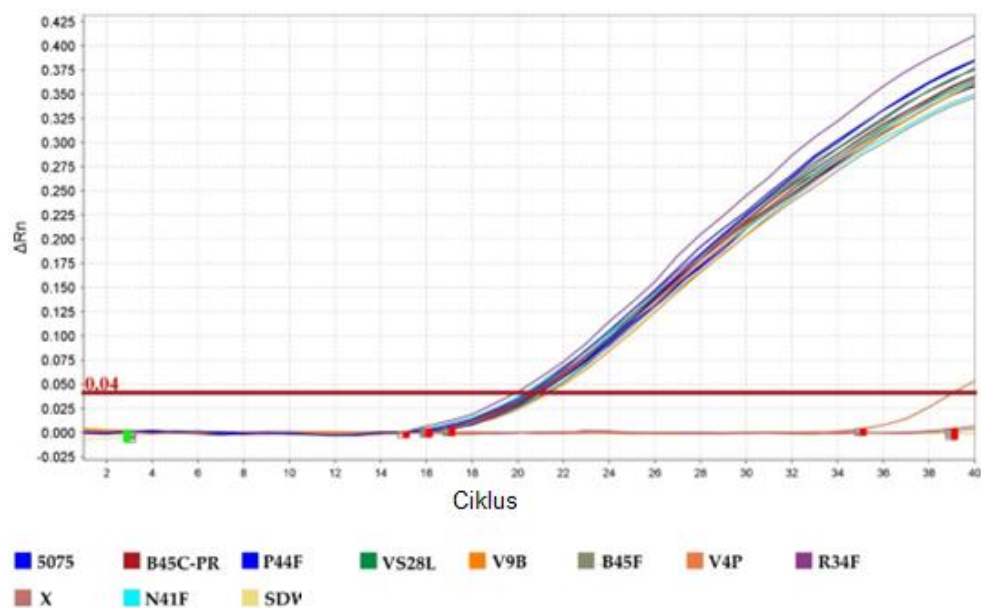
- Koščak L.; Plavec J., Đermić E., Tegli S., Godena S. (2022). Occurrence and presence of olive knot disease (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) on Istrian peninsula // Zbornik sažetaka 57. hrvatski i 17. međunarodni simpoziji agronoma (ur. Majić I.,

Antunović Z.), Osijek: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska, str. 297-297.

- Šćepanović M., Koščak L., Šoštarčić V., Pismarović L., Milanović-Litre Ana., Kljak K. (2022). Ferulična, vanilična, p-hidroksibenzojeva i p- kumarična kiselina inhibiraju rast klijanaca ambrozije // Zbornik sažetaka 57. hrvatski i 17. međunarodni simpoziji agronoma (ur. Majić I., Antunović Z.) Osijek: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska str. 69-70.
- Koščak L., Lamovšek J., Đermić E., Godena S. (2023). Antimicrobial Efficacy of Bioactive Compounds Against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Strain-Specific Responses and Concentration-Dependent Effects. Slovenian Microbiome Network Symposium. Maribor, Slovenija
- Koščak L., Lamovšek J., Đermić E., Godena S. (2024). Exploring antimicrobial effect of essential oils and their components against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. 16. Slovensko posvetovanje o varstvu rastlinz mednarodno udeležbo . 5. – 6. Ožujka 2024., Bohinjska Bistrica, Slovenija.

Radovi:

- Koščak L., Lamovšek J., Đermić E., Godena S. (2025). Potential of Plant-Based Agents as Next-Generation Plant Growth-Promoters and Green Bactericides Against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Agronomy 15(4):819. Doi: 10.3398/agronomy15040819
- Koščak L., Lamovšek J., Lukić M., Kovačević T.K., Đermić E., Goreta Ban S., Major N., Godena S. (2024). Varietal Susceptibility of Olive to *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and the Antibacterial Potential of Plant-Based Agents. Microorganisms 12(7): 1301-1-1301-21. doi: 10.3390/microorganisms12071301
- Koščak L., Đermić E., Godena S. (2023). Pojavnost i rasprostranjenost bakterioznog raka masline (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) na istarskom poluotoku. Agronomski glasnik 85(1-2): 3-14. doi: 10.33128/ag.85.1-2.1
- Koščak L., Lamovšek J., Đermić E., Godena S. (2023). The Antibacterial Effect of Selected Essential Oils and Their Bioactive Constituents on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Phytotoxic Properties and Potential for Future Olive Disease Control. Microorganisms 11(11): 273518. doi: 10.3390/microorganisms11112735
- Koščak L., Lamovšek J., Đermić E., Prgomet I., Godena S. (2023). Microbial and Plant-Based Compounds as Alternatives for the Control of Phytopathogenic Bacteria. Horticulturae 9(10): 112426. doi: 10.3390/horticulturae9101124
- Koščak L., Lamovšek J., Đermić E., Tegli S., Gruntar I., Godena S. (2023). Identification and Characterisation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* as the Causal Agent of Olive Knot Disease in Croatian, Slovenian and Portuguese Olive (*Olea europaea* L.) Orchards. Plants 12(2): 30715. doi: 10.3390/plants12020307
- Šćepanović M., Koščak L., Pismarović L., Šoštarčić V. (2022). Stimulation of Germination of Freshly Collected and Cold-Stored Seeds of *Ambrosia artemisiifolia* L. Plants, 11(14): 188813. doi: 10.3390/plants11141888
- Šćepanović M., Koščak L., Šoštarčić V., Pismarović L., Milanović-Litre A., Kljak K. (2022). Selected Phenolic Acids Inhibit the Initial Growth of *Ambrosia artemisiifolia* L. Biology 11(4): 48211. doi: 10.3390/biology11040482
- Koščak L., Šoštarčić V., Šćepanović M. (2020). Biologija i ekologija poljske ljubice (*Viola arvensis* Murray). Fragmenta phytomedica 34(6): 39-52.
- **Članstva:** Hrvatsko društvo biljne zaštite; • Hrvatska Agronomska Komora



Prilog 1. Primjer grafikona umnožavanja dijela genoma omeđenog početnicama za nekoliko izolata *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* korištenjem *real-time* PCR. Os x predstavlja broj ciklusa umnožavanja, a y os omjer intenziteta emitirane fluorescencije probe (VIC) i pasivne referentne boje (ROX). Sterilna destilirana voda je korištena kao negativna kontrola (SDV). Pozitivni izolati *P. savastanoi* pv. *savastanoi* su prikazani obojenim krivuljama.