

MOGUĆNOST DEZINFEKCIJE SEMENA KORIJANDERA ETARSKIM ULJEM PITOME NANE

Sara D. Mikić^{1*}, Ivana M. Vico², Nataša D. Duduk² i Tatjana Lj. Marković¹

¹Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet, Beograd - Zemun, Srbija

Sažetak: Ispitivanje zdravstvenog stanja semena ima za cilj osiguranje dobijanja zdravog useva i sprečavanje širenja biljnih bolesti upotrebom zaraženog semena. Potreba za proučavanjem i primenom etarskih ulja i biljnih ekstrakata u cilju zaštite semena se povećava i ona sve više dobijaju na značaju. Korijander (*Coriandrum sativum* L.) je jednogodišnja zeljasta, aromatična, začinska i lekovita biljka iz familije Apiaceae, poznata po semenu karakterističnog i prijatnog mirisa. U humanoj medicini korijander ulazi u sastav raznih lekova za lečenje organa za varenje. Najčešći i najznačajniji prouzrokovani oboljenja semena korijandera su fitopatogene gljive i bakterije. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita zdravstveno stanje semena korijandera i mogućnost dezinfekcije etarskim uljem pitome nane (*Mentha x piperita*). Zdravstveno stanje semena ispitano je standardnom laboratorijskom metodom na filter papiru, a mogućnost dezinfekcije potapanjem semena u različite koncentracije (1, 2, 5 i 10%) etarskog ulja pitome nane. Sastav etarskog ulja određen je gasnohromatografskom analizom. Nakon sedam dana inkubacije u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi, na osnovu prisustva simptoma, makroskopskim i mikroskopskim pregledom i izolacijom gljiva na hranljivu podlogu krompir dekstrozni agar, utvrđeno je da su na/u semenu prisutne patogene gljive iz roda *Alternaria* sekcija *Alternaria*. Potapanje zaraženog semena u rastvore etarskog ulja pitome nane smanjilo je zaraze tretiranih semena. Najveću inhibiciju zaraze 69,33%, odnosno 58,93% kada se izuzme delovanje emulgatora, ispoljilo je ulje primenjeno u koncentraciji od 5%. Uočena je stagnacija u inhibiciji sa daljim povećavanjem koncentracije ulja. Rezultati ovih ispitivanja ukazuju na mogućnost dezinfekcije semena korijandera etarskim uljem pitome nane s ciljem zaštite od bolesti prouzrokovane gljivom *Alternaria* sp.

Ključne reči: zdravstveno stanje semena, seme korijandera, etarsko ulje pitome nane, *Alternaria* sp.

* Autor za kontakt: e-mail: smikic@mocbilja.rs

Uvod

Korijander (*Coriandrum sativum* L.) je jednogodišnja zeljasta, aromatična, začinska i lekovita biljka iz familije Apiaceae. Poreklom je iz severne Afrike i istočnog Sredozemlja. U narodu je poznata i kao paprić, paprič, kišnec ili korion. Zeleni plodovi, listovi i drugi zeleni delovi biljke su neprijatnog mirisa na stenice (na grčkom *coris* – stenica, pa otuda i naziv biljke) (Jevtić et al., 1986), dok je seme karakterističnog i prijatnog mirisa. Seme korijandera može biti okruglog ili ovalnog oblika sa rebrastom semenjačom. Klija i niče na temperaturi od 6 do 7°C. Sveže seme ima visoku klijavost koja nakon 2–3 godine naglo opada (Pavlović et al., 2002). Seme sadrži 0,4–1,5% etarskog ulja, 18–28% masnih ulja i do 30% belančevina, pa se posle destilacije etarskog ulja iz semena ostaci koriste za ishranu stoke (Kišgeci i Adamović, 1994).

Etarsko ulje semena korijandera predstavlja smešu raznih derivata terpenoida, alkohola, aldehida, ketona i etara, i glavni je izvor za dobijanje linalola (60–80%), koji se upotrebljava u industriji parfema, kozmetici i industriji sapuna. U humanoj medicini, korijander ulazi u sastav različitih lekova za lečenje organa za varenje. Korijander se koristi i u veterinarskoj medicini, a i u industriji likera, piva, peciva i slatkiša, kao zamena za biber i cimet (Kišgeci i Adamović, 1994).

Brojni biotski i abiotski faktori mogu negativno uticati na zdravlje biljaka i kvalitet semena korijandera. Među biotskim faktorima značajno mesto zauzimaju fitopatogene gljive *Fusarium oxysporum* f. sp. *corianderi*, *Protomyces macrosporus*, *Erysiphe polygoni*, *Cercospora corianderi*, *Phoma multirostrata* i *Colletotrichum gloeosporioides* (Khare et al., 2017). Neke od patogenih gljiva kao što su *Pythium* spp., *Alternaria alternata*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *R. solani* i *Sclerotium rolfsii* mogu izazvati bolest semena ili se njime prenositi. Patogene gljive mogu biti prisutne na ili u semenu, na ili u semenjači, ekstraembrionalno ili intraembrionalno, a mogu biti i kontaminanti semena. Njihovo prenošenje semenom može izazvati pojavu lokalne ili sistemične zaraze biljaka. S ciljem zaštite semena i biljaka od patogena koji se prenose semenom ili izazivaju bolesti semena, važno je znati lokaciju patogena u semenu. Takođe, značajno je i poznavanje vremena infekcije matične biljke kako bi se proizvelo seme koje nije zaraženo.

U Srbiji su detektovane četiri vrste iz roda *Alternaria* – identifikovane kao patogeni semena biljaka iz familije Apiaceae: *A. dauci*, *A. radicina*, *A. petroselini* i *A. alternata*, koje su prouzrokovale smanjeno nicanje semena mrkve, peršuna, paškanata i celera. *A. dauci*, *A. radicina* i *A. petroselini* pokazali su se kao agresivniji patogeni u odnosu na *A. alternata* (Bulajić et al., 2009). Prema navodima Coles i Wicks (2003), izolacijom patogena iz zaražene biljke dokazano je da *A. radicina* napada mrkvu u svim fazama razvoja izazivajući isušivanje i trulež korena, krune, peteljke i listova. Takođe, utvrđeno je i da je *A. alternata*

patogen semena mrkve. Dokazano je da *A. dauci* izaziva lisnu pegavost i sušenje lista, a *A. radicina* crnu trulež na korenu, listu i semenu mrkve (Bulajić i Krstić, 2007).

Patogeni koji se prenose semenom izazivaju razvoj i širenje bolesti i gubitak prinosa, menjaju hemijski sastav i biološke osobine semena, pre svega klijavost, i utiču na biljku koja nastaje njegovim klijanjem. S ciljem zaštite semena od bolesti, mogu se koristiti mehaničke, fizičke, hemijske i biološke mere. Poslednjih nekoliko decenija, upotreba konvencionalnih pesticida u suzbijanju štetnih agenasa u poljoprivredi bila je standardna praksa. Njihova učestala primena na direktan ili indirektan način šteti okolini, zdravlju ljudi i životinja. Iz ovog razloga, nameće se potreba za pronalaženjem i uvođenjem manje opasnih i otrovnih supstanci u zaštiti biljaka (Klokočar-Šmit et al., 2006). Zahvaljujući novim pravcima, potreba za proučavanjem i primenom etarskih ulja i biljnih ekstrakata u zaštiti gajenog bilja od bolesti se povećava i sve više dobija na značaju. Njihova primena u zaštiti semena gajenih biljaka, može uticati kako na klijanje, tako i na smanjenje zaraze semena patogenima (Karaca et al., 2017). U istraživanjima Montes-Belmont i Carvajal (1998), etarsko ulje pitome nane bilo je testirano u zaštiti semena kukuruza od patogene gljive *Aspergillus flavus*, dok su Karaca et al. (2017) etarsko ulje pitome nane koristili za tretiranje semena pšenice protiv patogenih vrsta iz rodova *Tilletia*, *Alternaria* i *Aspergillus*. Efikasnost etarskog ulja pitome nane ispitivana je i u suzbijanju patogena semena paradajza i rotkvice (Mahdavia i Saharkhiz, 2015).

U istraživanjima Hussain et al. (2010) etarska ulja biljaka iz roda *Mentha* ispoljila su antifungalno delovanje prema vrstama roda *Alternaria* i potencijal da se pored ishrane mogu koristiti i u zaštiti bilja i semena od fitopatogena. Zbog toga je cilj ovog rada bio da se nakon utvrđivanja zdravstvenog stanja semena korijandera, ispita i mogućnost njegove dezinfekcije primenom etarskog ulja pitome nane poznatog hemijskog sastava.

Materijal i metode

Poreklo i ispitivanje zdravstvenog stanja semena korijandera

U istraživanjima je korišćeno seme korijandera dobijeno iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, proizvedeno 2016. godine. Zdravstveno stanje semena korijandera ispitivano je standardnom laboratorijskom metodom na filter papiru. Na prethodno sterilisan (110°C, 1h) i navlažen filter papir postavljeno je nesterilisano seme korijandera. Semena su inkubirana sedam dana u vlažnoj komori, pri temperaturi od 22±2°C. Postavljeno je ukupno 500 semena korijandera (pet ponavljanja po 100). S ciljem poređenja, 100 semena su prethodno sterilisana u 1% rastvoru NaOCl, u trajanju od pet minuta i inkubirana na isti način. Nakon sedam dana inkubacije, obavljen je makroskopski i

mikroskopski pregled semena i izvršena je izolacija gljive na hranljivu podlogu od krompir dekstroznog agra (PDA) (Potato dextrose agar, EMD, Germany).

Izolacija i identifikacija patogena

Izolacija patogena obavljena je iz zaraženih semena i klica nakon sedam dana inkubacije prethodno netretiranog semena na filter papiru u uslovima sobne temperature. Za izolaciju patogena, semena i klice sa simptomima nekroze, sa ili bez prisustva micelije ili spora gljiva, preneti su na PDA hranljivu podlogu. Semena i klice su pre nanošenja na hranljivu podlogu prethodno sterilisana u 70% rastvoru etil alkohola, u trajanju od 1 minuta. Petri kutije su oblepljene parafilmom i inkubirane na sobnoj temperaturi. Nakon sedam dana razvijene kulture gljive su presejane na sterilnu PDA podlogu s ciljem dobijanja čiste kulture. Kod dobijenih izolata identifikacija patogena obavljena je na osnovu makroskopskih (boja i izgled kolonije) i mikroskopskih morfoloških odlika (izgled konidija). Za posmatranje mikroskopskih odlika gljiva koje su se razvile na semenu i u kulturi korišćen je mikroskop Carl Zeiss Axio Lab.A1 (Zeiss, New York, United States), a fotografije su snimljene kamerom AxioCam ErC.5s (Zeiss, Göttingen, Germany).

Poreklo i analiza sastava etarskog ulja pitome nane

U ispitivanju je korišćeno etarsko ulje nadzemnog dela pitome nane (*Mentha x piperita*), poreklom iz Srbije, proizvedeno i nabavljeno na slobodnom tržištu od Herba d.o.o., Beograd. Kvalitativna i kvantitativna analiza uzorka etarskog ulja vršena je primenom gasne hromatografije i dva tipa detektora. Klasične analitičke gasnohromatografske analize urađene su na Agilent Technologies gasnom hromatografu, model 7890A (Agilent, Santa Clara, USA), opremljenom *split-splitless* injektorom povezanim sa HP-5 kolonama (30 m x 0,32 mm, debljine filma 0,25 μ m) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Kao noseći gas korišćen je vodonik (1 ml/min/210°C). Temperatura injektora iznosila je 250°C, detektora 280°C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturskog programiranja od 40 do 260°C (4°/min). Isti analitički uslovi korišćeni su i za potrebe GC/MS analize rađene na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu, s tim što je tu rađeno sa HP-5MS kolonom (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) i što je kao noseći gas korišćen helijum. Temperatura transfer linije iznosila je 260°C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40–400.

U svim slučajevima rastvori uzorka etarskog ulja (1 μ l) u etanolu injektirani su u *split*-režimu (1:30). Identifikacija pojedinačnih komponenata vršena je maseno spektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara (NIST/Wiley), različitih načina pretrage (PBM/NIST/AMDIS) i raspoloživih literaturnih podataka (Adams, 2007). Za kvantifikacione svrhe kao

osnova uzeti su procenti površina pikova dobijeni integracijom sa odgovarajućih hromatograma (GC/FID).

Ispitivanje uticaja etarskog ulja pitome nane na zarazu semena korijandera

Seme korijandera (100 semena po tretmanu) potapano je u rastvore etarskog ulja pitome nane različitih koncentracija (1, 2, 5 i 10%), u kojima je držano u vremenskom trajanju od 1 minuta. Ulje je rastvarano u vodi sa dodatkom 1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Germany). Nakon potapanja semena u rastvor, posuda je povremeno mućkana kako bi se rastvor ulja ravnomerno rasporedio na sve delove semena. Potom je seme korijandera osušeno na filter papiru i postavljeno u Petri kutije, na vlažan filter papir i inkubirano na sobnoj temperaturi u trajanju od sedam dana. U ispitivanjima uticaja tretmana korišćene su tri kontrole: K1 – 1% Tween 20 (s ciljem utvrđivanja delovanja emulgatora na prisutne patogene na semenu), K2 – 1% rastvor NaOCl (s ciljem površinske dezinfekcije semena), i K3 – bez tretmana. Kontrolna semena su inkubirana na isti način kao i tretirana semena. Posle sedam dana posmatrana je pojava zaraze semena i određen je broj zaraženih semena. Procenat inhibicije zaraze semena pod uticajem različitih koncentracija etarskih ulja izračunat je po formuli: % inhibicije = $[(K-T) / K] \times 100$, gde su: K – broj zaraženih semena u kontroli (K1 ili K3) i T – broj zaraženih semena u tretmanu.

Statistička obrada podataka obavljena je metodom analize varijanse. Značajnost razlika između srednjih vrednosti određena je uz pomoć Student-Newman-Keuls testa višestrukih intervala za nivo značajnosti $P \leq 0,05$. Statistička analiza obavljena je korišćenjem programa IBM SPSS Statistics 25.

Rezultati i diskusija

Zdravstveno stanje semena korijandera i identifikacija patogena

Nakon sedam dana inkubacije u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi, na zaraženim semenima pojavili su se uniformni simptomi i znakovi prisustva patogena. Uočena je pojava simptoma nekroze na semenu i klicama, kao i prisustvo tamne micelije i obilne sporulacije maslinastosive boje (slika 1). Nivo zaraze semena iznosio je od 30% do 42%, u proseku 35,2% (zaraza i kontaminacija semena patogenom), dok je procenat zaraze kod semena tretiranog 1% rastvorom NaOCl iznosio 19% (endogena zaraza patogenom).

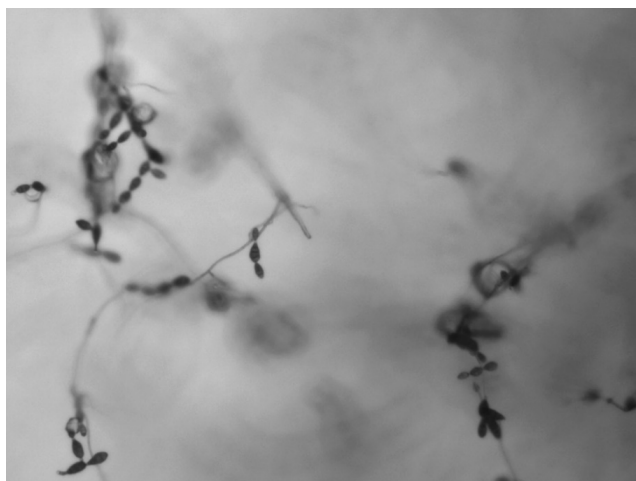
Nakon izolacije dobijeni izolati na PDA podlozi formirali su obilnu, vunastu i tamnu maslinastosivu koloniju. Mikroskopskim pregledom uočeno je da su izolati formirali višecelijske, feodiktiosporne konidije u nizovima (slika 2),

maslinastosmeđe boje, elipsoidnog ili ovalnog oblika sa kratkim koničnim kljunom, sa 2–7 poprečnih i 0–3 uzdužnih septi.



Slika 1. Zaraženo seme korijandera: simptomi nekroze na semenu i klicama i prisustvo tamne micelije i obilne sporulacije.

Figure 1. The infected coriander seed: symptoms of necrosis on seeds and germs and the presence of dark mycelia and abundant sporulation.



Slika 2. *Alternaria* sp.: konidije u nizovima.

Figure 2. Alternaria sp.: conidia in chains.

Na osnovu makroskopskih i mikroskopskih odlika, a poređenjem sa podacima iz literature (Thomma, 2003; Woudenberg et al., 2013; Lawrence et al., 2016), izolati gljiva poreklom sa semena korijandera identifikovani su kao *Alternaria* sp. sekcija *Alternaria*.

Hemijski sastav etarskog ulja

Na osnovu sadržaja glavnih komponenti, etarsko ulje pitome nane, korišćeno u našim istraživanjima, odgovaralo je sadržaju koji propisuje međunarodni standard koji definiše kvalitet ovog ulja (ISO856:2006). Ukupno je identifikovano 38 komponenti u ovom ulju, od kojih su najdominantnije bile mentol, menton, izo-menton, mentil acetat, (Z)-kariofilen i 1,8-cineol, zajedno čineći 80,7% ukupnog sastava ulja. Dominantnu hemijsku klasu ulja predstavljali su oksigenovani monoterpeni (tabela 1).

Tabela 1. Hemijski sastav etarskog ulja pitome nane (*Mentha x piperita*), familija *Lamiaceae*.

Table 1. The chemical composition of the essential oil of *Mentha x piperita*, family *Lamiaceae*.

Komponente/Components	RI	%	Komponente/Components	RI	%
α -pinen	927	0,1	pulegon	1241	1,3
β -pinen	969	0,2	piperiton	1269	0,5
α -terpinen	1013	0,1	neo-mentil acetat	1270	0,3
<i>p</i> -cimen	1019	0,5	mentil acetat	1291	6,6
limonen	1023	2,7	izo-mentil acetat	1303	0,3
1,8-cineol	1025	4,5	dihidrodrokarvil acetat	1308	0,1
γ -terpinen	1053	0,4	β -elemen	1386	2,5
<i>cis</i> -sabinen hidrat	1064	0,2	(Z)-kariofilen	1408	4,4
α -terpinolen	1086	0,1	β -kopaen	1431	0,1
linalol	1097	0,2	aromadendren	1435	0,2
amil izovalerat	1103	0,2	α -humulen	1446	0,3
izo-pulegol	1141	0,1	germakren D	1480	0,6
menton	1151	23,5	biciklogermakren	1498	1,8
izo-menton	1160	6,6	δ -kadinen	1516	0,5
mentol	1173	35,1	<i>trans</i> -nerolidol	1545	0,2
terpinen-4-ol	1176	1,6	spatulenol	1572	0,7
izo-mentol	1179	0,3	kariofilen oksid	1574	1,0
α -terpineol	1187	0,4	globulol	1583	0,8
mentil-formijat	1232	0,1	α -kadinol	1647	0,3
			Monoterpene hydrocarbons		4,0
			Oxygenated monoterpenes		81,9
			Sesquiterpene hydrocarbons		10,4
			Oxygenated sesquiterpenes		2,9
			Total identified (%)		99,2
			Number of identified components		38

Smanjenje zaraze semena može se postići različitim merama zaštite, od mehaničkih, fizičkih, hemijskih do bioloških. Poslednjih nekoliko decenija, zbog posledica učestale primene pesticida, nametnula se potreba za pronalaženjem i uvođenjem u upotrebu manje opasnih i otrovnih supstanci u zaštiti bilja (Klokočar-Šmit et al., 2006). S tim u vezi, primena preparata na bazi biljaka, uključujući i produkte njihovog sekundarnog metabolizma, posebno etarska ulja, sve više dobija na značaju (Marković, 2011). Etarska ulja su aromatična i lako isparljiva, kompleksna prirodna jedinjenja za koje postoje podaci da utiču na inhibiciju zaraze semena gajenih biljaka u manjoj ili većoj meri (Karaca et al., 2017), što je potvrđeno i u ovom istraživanju.

S obzirom na to da se seme koristi u proizvodnji korijandera i u ishrani ljudi i životinja, važno je naglasiti da etarsko ulje *M. piperita*, kojim je seme korijandera tretirano u našem istraživanju, poseduje GRAS status, kao i da se njegove glavne komponente mogu smatrati bezbednim u ishrani (U.S. Food and Drug Administration, 2008). Osim toga, ovo ulje ispoljava i širok spektar antifungalne aktivnosti (Schuhmacher et al., 2003; Matan et al., 2009).

Uticaj etarskog ulja pitome nane na zarazu semena korijandera

Etarsko ulje pitome nane primenjeno u koncentracijama 1, 2, 5 i 10% ispoljilo je negativan uticaj na pojavu *Alternaria* sp. na semenu korijandera (tabela 2). Najveća inhibicija uočena je tretiranjem semena korijandera etarskim uljem koncentracija 5 i 10% (inhibicija 69,33%). Uočeno je i da 1% rastvori Tween 20 (K1) i NaOCl (K2) ispoljavaju negativno delovanje (inhibicija 25,33% i 38,67%), kao i da se njihovo delovanje na pojavu *Alternaria* sp. nije statistički značajno razlikovalo od delovanja etarskog ulja u koncentraciji 1% (inhibicija 30,67%). Kada se delovanje etarskog ulja posmatra u odnosu na delovanje 1% rastvora Tween 20 (K1) uočava se da i etarsko ulje pitome nane u koncentraciji 2% ispoljava antifungalno dejstvo, tj. statistički značajno veću inhibiciju patogena od emulgatora (tabela 2).

U sprovedenim istraživanjima, uočeno je variranje u procentu zaraze ispitivanih semena koje je iznosilo od 30% do 42% kod partije semena korišćene za ispitivanje zdravstvenog stanja, u odnosu na 64% do 84% kod partije semena korišćene za ispitivanje delovanja etarskih ulja. Ovo govori o različitom prisustvu patogena iz roda *Alternaria* kod različitih partija semena i u saglasnosti je sa rezultatima Bulajić et al. (2009) da seme začinskog bilja iz familije Apiaceae ispoljava različit stepen zaraze fitopatogenim gljivama roda *Alternaria*. Zaraza semena *Alternaria* spp. je kod ovih biljnih vrsta veoma značajna, jer dovodi do smanjenja prinosa. Zbog toga je osnovni preduslov za dobar prinos zdrava biljka koja se razvija iz zdravog semena (Bulajić i Krstić, 2007; Bulajić et al., 2009).

Tabela 2. Uticaj etarskog ulja pitome nane na pojavu gljive *Alternaria* sp. na semenu korijandera.

Table 2. The effect of the essential oil of *Mentha x piperita* on the occurrence of the fungus *Alternaria* sp. on the coriander seed.

Tretman semena <i>Seed treatment</i>	Broj zaraženih semena (prosek ± SD) <i>Number of infected seeds (average ± SD)</i>	Inhibicija u odnosu na K3 <i>Inhibition calculated against K3 (%)</i>	Inhibicija u odnosu na K1 <i>Inhibition calculated against K1 (%)</i>
Etarsko ulje <i>Essential oil</i>			
1%	52 ± 7,3 b*	30,67 b	11,91 b
2%	36 ± 8,6 ab	52 ab	35,71 a
5%	23 ± 6,8 a	69,33 a	58,93 a
10%	23 ± 3,8 a	69,33 a	58,93 a
Kontrola <i>Control</i>			
K1 – 1% Tween 20	56 ± 16,7 b	25,33 b	/
K2 – 1% NaOCl	46 ± 18,6 b	38,67 b	/
K3 – netretirano <i>nontreated</i>	75 ± 8,9 c	/	/

*Srednje vrednosti označene istim slovom ne razlikuju se značajno prema Student-Newman-Keuls testu ($P \leq 0,05$).

*Mean values followed by the same letter are not significantly different according to the Student-Newman-Keuls test ($P \leq 0.05$).

Prema rezultatima koje su naveli Moghaddam et al. (2013), 5% Tween rastvor etarskog ulja *M. piperita* poreklom iz Irana (menton 30,6%, mentol 25,16%, mentofuran 6,47%) ispoljio je aktivnost na fitopatogene gljive *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Dreschlera spicifera* i *Macrophomina phaseolina*, mada su mnogo pre istraživači Carta et al. (1996) sugerisali da i druge komponente ulja *M. piperita* pospešuju njegovu sveukupnu antifungalnu aktivnost. U istraživanju koje su sproveli Souza et al. (2014), etarsko ulje *M. piperita* poreklom iz Brazila i njegova glavna komponenta mentol ispoljili su različitu *in vitro* inhibitornu aktivnost na porast micelije *F. oxysporum*, pri čemu je izolovana komponenta mentol ispoljila znatno bolju aktivnost (mentol 100%, a ulje 55% inhibicije). Prema Soković et al. (2009), antifungalna aktivnost 1% Tween rastvora ulja *M. piperita* (mentol 37,4%, mentil acetat 17,4% i menton 12,7%) i ulja *Mentha spicata* (karvon 69,5% i menton 21,9%), ispoljili su različit stepen inhibicije na fitopatogene gljive iz roda *Aspergillus* (*A. niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. flavus*) i *Penicillium* (*P. ochrochloron*, *P. funiculosum*). Prema Freire et al. (2011), 0,1% Tween 20 rastvor ulja *M. piperita* (mentol 54,2%, menton 7,3%, neomenton 6,3%), ispoljio je različitu antifungalnu aktivnost na niz postžetvenih patogena (*A. flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C.*

musae, *F. oxysporum* i *F. semitectum*). Dobru antifungalnu aktivnost na postžetvene patogene prijavili su i Hadian et al. (2008), sa primenom 5% Tween 80 rastvora iranskog ulja *M. piperita* (mentol 36,2%, menton 32,4%) na *Rhizopus stolonifer* i *A. niger*, kao i Edris i Farrag (2003) sa uljem *M. piperita* poreklom iz Amerike (mentol 36,2%, menton 32,4%, izomenton 7,58%), na *Sclerotinia sclerotiorum*, *R. stolonifer* i *Mucor* sp. U poslednjem istraživanju zajedničko delovanje mentona i mentola ispoljilo je snažniju antifungalnu aktivnost od samog ulja. Prema Moghtader (2013), DMSO rastvor etarskog ulja *M. piperita*, takođe poreklom iz Irana (mentol 38,33%, menton 21,45% i mentil acetat 12,49%), ispoljio je jaču antifungalnu aktivnost na *A. niger* u poređenju sa antibiotikom (gentamicin), a autor smatra da je za pomenutu aktivnost bio odgovoran mentol. U istraživanju koje su sprovedi Sellamuthu et al. (2013), ulje *M. piperita* (menton 46,45%, mentol 21,69%) poreklom iz južne Afrike, ispoljilo je antifungalnu aktivnost na *C. gloeosporioides*.

U istraživanju Soković et al. (2009), 1% Tween rastvor etarskog ulja *M. piperita* (mentol 37,4%, mentil acetat 17,4% i menton 12,7%), testiran je u *in vitro* uslovima i na patogenu gljivu *A. alternata* i ispoljio je fungicidno delovanje (MFC 1,0–2,5 µL/mL), dok je u istraživanju França et al. (2018) čisto etarsko ulje *M. piperita* neprikazanog hemijskog sastava, dodato u PDA podlogu (0,4% i 0,8%), ispoljilo inhibitornu aktivnost na porast micelije *A. alternata* (13,27% i 72,45%). Prema Perveen i Bokahri (2020), 0,5% Tween 20 rastvor ulja *M. arvensis* (mentol 69,2%), dodat u PDA podlogu u koncentraciji od 40 µL/mL, ispoljio je potpunu inhibiciju porasta micelije i klijanja konidija *A. alternata*, dok je u istraživanju Plavšić et al. (2020), 0,1% Tween 80 rastvor etarskog ulja *M. piperita* iz Srbije (mentol 39,9%, menton 23,51%, mentil acetat 7,29%), ispoljio fungicidno delovanje na više fitopatogenih gljiva, uključujući *A. alternata* (MFC 1,7–454,5 µL/mL). Prema Reddy et al. (2019), disk impregniran 10% DMSO rastvorom ulja *M. piperita* iz Saudijske Arabije (mentol 36,02%, menton 24,56%, mentil acetat 8,95%), postavljen na hranljivu podlogu, na koju je zasejana *A. alternata*, rezultirao je inhibicijom porasta (MIC 1,50 µg/mL).

Sadržaj glavnih komponenti u *M. piperita* ulju testiranom u ovom radu, u poređenju sa ranije opisanim delovanjem na patogenu gljivu *A. alternata*, bio je različit; mentol je uvek bio nešto niži (35,1%), menton je bio druga najzastupljenija komponenta ulja i bio je često viši (23,5%), dok je sadržaj mentil acetata bio dosta niži (6,6%). Kako u većini istraživanja autori uglavnom sugerišu da su glavne komponente najčešće zaslužne za uspeh antifungalne aktivnosti ulja *M. piperita*, proizilazi da je za postizanje antifungalne aktivnosti nekog ulja njegov hemijski sastav suštinski važan. To je u saglasnosti i sa rezultatima Soković et al. (2009), gde se među nekoliko testiranih izolovanih glavnih komponenti ulja *M. piperita*, mentol izdvojio snažnom antifungalnom aktivnošću ne samo na *A. alternata* već i na ostale ispitivane fitopatogene gljive. Od uticaja etarskih ulja na druge

fitopatogene vrste roda *Alternaria* nije bilo istraživanja sa uljima izolovanim iz biljaka roda *Mentha* L. U istraživanju Parveen i Sharma (2018), efikasnost na *A. solani* ispoljila su ulja *Ocimum basillicum*, *O. sanctum*, *O. tenuiflorum*, *O. citriodorum*, *Cymbopogon citrates* i *Origanum majorana*, pri čemu su samo prva dva ulja ispoljila potpunu inhibiciju porasta micelije. Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju, kao i literaturni podaci, pokazuju da etarsko ulje biljaka roda *Mentha* poseduje dobar antifungalni potencijal prema *Alternaria* spp. Uvođenje etarskih ulja, kao jedne od mera dezinfekcije semena korijandera, može smanjiti pojavu bolesti prouzrokovanih fitopatogenim gljivama roda *Alternaria* i time unaprediti proizvodnju korijandera.

Zaključak

Zaraženo seme je jedan od glavnih izvora inokuluma biljnih bolesti za narednu sezonu. Zbog toga je ispitivanje zdravstvenog stanja semena, utvrđivanje prisustva patogenih semena i mogućnost njegove dezinfekcije, poželjno preparatima na prirodnoj osnovi, važno kako bi se za zasnivanje useva korijandera obezbedilo zdravo seme.

Ispitivanjem zdravstvenog stanja semena korijandera proizvedenog u Pančevu 2016. godine, mikroskopskim pregledom i izolacijom gljiva na PDA hranljivu podlogu, utvrđeno je prisustvo patogenih iz roda *Alternaria* sekcija *Alternaria*. Simptomi su bili u vidu nekroze semena i klica. Jedan odabrani izolat formirao je obilnu, vunastu, maslinastosivu koloniju i višecelijske, feodiktiosporne konidije u nizovima, maslinastosmeđe boje.

Rezultati ovih ispitivanja jasno ukazuju na značaj dezinfekcije semena korijandera u smanjivanju zaraze *Alternaria* sp. Najefikasnije dejstvo ispoljilo je etarsko ulje pitome nane (2, 5 i 10%), ali je smanjivanje zaraze ostvareno i potapanjem semena korijandera u 1% rastvora Tween 20 i NaOCl. Etarsko ulje *Mentha x piperita*, poreklom iz Srbije, po sadržaju glavnih komponenti odgovaralo je ISO standardu koji propisuje njegov kvalitet, mada su ovi sadržaji bili na donjim granicama. Ulje, primenjeno u koncentracijama 5 i 10% (rastvoreno u 1% Tween 20), radi kratkotrajne dezinfekcije semena korijandera, ispoljilo je inhibitornu efikasnost 69,33%, odnosno 58,93% kada se izuzme delovanje Tween 20. Prema tome, povećavanje koncentracije primene etarskog ulja je, nakon prvobitnog trenda rasta, dostiglo najviši nivo efikasnosti pri koncentraciji etarskog ulja od 5%. Za postizanje bolje inhibitorne aktivnosti, verovatno bi bilo korisnije primeniti ulje čiji bi sadržaji glavnih komponenti bili viši od ispitivanog, odnosno bliži gornjim granicama ISO propisa koji definiše kvalitet ovog ulja. Takođe, korisno bi bilo uraditi preciznu identifikaciju patogenih roda *Alternaria* prisutnih na semenu korijandera, s obzirom na pretpostavku da se javljaju u kompleksnim zarazama od više vrsta koje se mogu razlikovati po svojoj osetljivosti prema primenjenom etarskom ulju.

Zahvalnica

Istraživanja u ovom radu su deo projekta 451-03-68/2020-14/200003 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Bulajić, A., & Krstić, B. (2007). Patogeni mrkve (*Alternaria radicina*, *A. dauci*). *Biljni lekar*, 35, 595-604.
- Bulajić, A., Đekić, I., Lakić, N., & Krstić, B. (2009). The presence of *Alternaria* spp. on the seed of *Apiaceae* plants and their influence on seed emergence. *Archives of Biological Science*, 61, 871-881.
- Carta, C., Morotti, M.D.L., & Peana, A.T. (1996). Activity of the oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 399-404.
- Coles, R.B., & Wicks, T.J. (2003). The incidence of *Alternaria radicina* on carrot seeds, seedlings and roots of South Australia. *Plant Pathology*, 32, 99-104.
- Edris, A.E., & Farrag, E.S. (2003). Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/Food*, 47, 117-121.
- França, K.R.S., Silva, T.L., Cardoso, T.A.L., Ugulino, A.L.N., Rodrigues, A.P.M., & de Mendonça, A.F.J. (2018). *In vitro* effect of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) on the mycelial growth of *Alternaria alternata*. *Journal of Experimental Agriculture International*, 26, 1-7.
- Freire, M.M., Jham, G.N., Dhingra, O.D., Jardim, C.M., Barcelos, R.C., & Valente, V.M.M. (2011). Composition, antifungal activity and main fungitoxic components of the essential oil of *Mentha piperita* L. *Journal of Food Safety*, 32, 29-36.
- Hadian, J., Ghasemnezhad, M., Ranjbar, H., Frazane, M., & Ghorbanpour, M. (2008). Antifungal potency of some essential oils in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11, 553-562.
- Hussain, A., Anwar, F., Nigan, P.F., Ashraf, M., & Gilani, A. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1827-1836.
- ISO 856:2006. Oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.)
- Jevtić, S., Milošević, R., Šuput, M., Mustapić, Z., Gotlin, J., Uzunoksi, M., Klimov, S., Đorđevski, J., Spanring, J., & Miletić, N. (1986). *Posebno ratarstvo, Volume II* (pp. 106-107). Beograd: IRO Naučna knjiga.
- Karaca, G., Bilginturan, M., & Olgunsoy, P. (2017). Effects of some plant essential oils against fungi on wheat seeds. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51, 385-388.
- Khare, M.N., Tiwari, S.P., & Sharma, Y.K. (2017). Disease problems in the cultivation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and their management leading to production of high quality pathogen free seed. *The International Journal of Seed Spices*, 7, 1-7.
- Kišgeci, J., & Adamović, D. (1994). *Gajenje lekovitog bilja*. Beograd: Nolit.
- Klokočar-Šmit, Z., Šovljanski, R., Indić, D., & Vuković, S. (2006). Mogućnost ekološke proizvodnje krompira. *IV Međunarodna eko-konferencija zdravstveno bezbedna hrana* (pp. 319-324). Novi Sad.
- Lawrence, D.P., Rotondo, F., & Gannibal, P.B. (2016). Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress*, 15, 3. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1144-x>.

- Mahdavia, F., & Saharkiz, M.J. (2015). Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2, 146-153.
- Marković, T. (2011). *Etarska ulja i njihova bezbedna primena*. Beograd: Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“.
- Matan, N., Woraprayote, W., Saengkrajang, W., Sirisombat, N., & Matan, N. (2009). Durability of rubberwood (*Hevea brasiliensis*) treated with peppermint oil, eucalyptus oil and their main components. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 621-625.
- Montes-Belmont, R., & Carvajal, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*, 61, 616-619.
- Moghaddam, M., Pourbaige, M., Tabar, H.K., Farhadi, N., & Hosseini, S.M.A. (2013). Composition and antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita*) essential oil from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plant*, 16, 506-512.
- Moghtader, M. (2013). *In vitro* antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. *African Journal of Plant Science*, 7, 521-527.
- Parveen, T., & Sharma, K. (2018). Bioassay of botanical oils against *Alternaria solani*. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10, 19-21.
- Pavlović, R., Jevdović, R., Đurić, M., & Jevdović, J. (2002). Starost semena korijandera kao faktor njegove upotrebne vrednosti. *Zbornik III internacionalne konferencije TEMPO-HP* (pp. 168-172). Čačak.
- Perveen, K., & Bokahri, N.A. (2020). Management of *Alternaria* leaf blight in tomato plants by mentha essential oil. *Plant Protection Science*, 56, 191-196.
- Plavšić, D.V., Škrinjar, M.M., Psodorov, Đ.B., Pezo, L.L., Milovanović, I.Lj., Psodorov, D.Đ., Kojić, P.S., & Kocić-Tanackov, S.D. (2020). Chemical structure components and antifungal activity of mint essential oil. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 84, 1-14.
- Reddy, D.N., Al-Rajab, A.J., Sharma, M., Moses, M.M., Reddy, G.R., & Albratty, M. (2019). Chemical constituents, *in vitro* antibacterial and antifungal activity of *Mentha x piperita* L. (peppermint) essential oil. *Journal of King Saud University – Science*, 31, 528-533.
- Schuhmacher, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine*, 10, 504-510.
- Sellamuthu, P.S., Sivakumar, D., & Soundy, P. (2013). Antifungal activity and chemical composition of thyme, peppermint and citronella oils in vapor phase against avocado and peach postharvest pathogens. *Journal of Food Safety*, 33, 86-93.
- Soković, M.D., Vukojević, J., Marin, P.D., Brkić, D.D., Vajs, V., van Griensven, L.J.L.D. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14, 238-249.
- Souza, M.A.A., Lemos, M.J., Brito, D.M.C., Fernandes, M.S., Castro, R.N., & Souza, S.R. (2014). Production and quality of menthol mint essential oil and antifungal and antigerminative activity. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 3311-3318.
- Thomma, B.P.H.J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4, 225-236.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). Page generated October 17, 2008, from <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-updates-everything-added-food-us-inventory>
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M., & Crous, P.V. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.

Primljeno: 14. decembra 2020.

Odobreno: 2. februara 2021.

THE POSSIBILITY OF CORIANDER SEED DISINFECTION WITH THE ESSENTIAL OIL OF PEPPERMINT

Sara D. Mikić^{1*}, Ivana M. Vico², Nataša D. Duduk² and Tatjana Lj. Marković¹

¹Institute for Medicinal Plant Research “Dr Josif Pančić”, Belgrade, Serbia

²University of Belgrade - Faculty of Agriculture, Belgrade - Zemun, Serbia

A b s t r a c t

Seed health testing aims to ensure a healthy crop and to prevent the spread of plant diseases. The need to study and apply both essential oils and plant extracts against seed diseases is growing and becoming more important. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) is an annual herbaceous, aromatic, spicy and medicinal plant from the Apiaceae family, known for its seeds with a characteristic and pleasant odour. In human medicine, coriander is a part of various medicines for the treatment of digestive organs. Phytopathogenic fungi and bacteria are the most common and significant causes of coriander seed disease. The aim of this study was to assess coriander seed health and investigate the possibility of seed disinfection using peppermint (*Mentha x piperita*) essential oil. The health of the seeds was examined by the filter paper laboratory standard method. Different concentrations (1, 2, 5 and 10%) of peppermint essential oil were used for seed disinfection. The composition of the essential oil was determined by gas chromatographic analysis. The results of seed health analysis showed the presence of a fungus after seven days of incubation in a humid chamber at room temperature. The fungus was identified as *Alternaria* sp. (sect. *Alternaria*) based on the symptoms and macroscopic and microscopic features of the fungus (on seed and potato dextrose agar). Immersion treatment of infected seed in peppermint essential oil reduced the presence of *Alternaria* sp. on coriander seeds. The highest disease inhibition, 69,33%, namely 58,93% without the influence of the emulsifier, was shown by oil solution of 5%. Stagnation in inhibition was observed with a further increase in oil concentration. The results of this study show the possibility of disinfecting coriander seeds with peppermint essential oil to reduce infection with *Alternaria* sp.

Key words: seed health, coriander seed, peppermint (*Mentha x piperita*) essential oil, *Alternaria* sp.

Received: December 14, 2020

Accepted: February 2, 2021

*Corresponding author: e-mail: smikic@mocbilja.rs